

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر و تهيئة الساحل

Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



**Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'état
et Master en Sciences de la Mer**

Et en vue de l'obtention du diplôme Start-up-Brevet

Option : Aquaculture

Thème :

**Production, analyse et valorisation de microalgues
(Spiruline)**

Présenté par :

BARKA Hiba

KHELFAOUI Hadil

Soutenu le 12/07/2023 devant le jury composé de :

Mme ALOUACHE S.	Maître de Conférences A	ENSSMAL	Présidente
Mme AMROUCHE N.	Maître assistant A	ENSSMAL	Examinatrice
M. AIT.SAIDI A.	Maître de conférences B	ENSSMAL	Promoteur
Mme MAOUEL.		ENSSMAL	Représentante de l'incubateur
M. DALIBEY		ANVREDET	Expert du secteur socio-économique
M.MIHOUBI		ANADE	Expert du secteur socio-économique

Année universitaire : 2022-2023

Remerciements

Nous tenons à remercier Dieu de nous avoir donné la force et la bonne santé, la patience, la volonté et le courage de mener à bon terme ce modeste travail.

*Il nous est agréable d'exprimer nos sincères remerciements et notre profonde gratitude à notre promoteur **Mr. Ait saïdi** de nous avoir guidé au cours de ce travail, nous lui exprimons notre reconnaissance pour ses précieux conseils qui nous ont aidés dans l'élaboration de ce travail.*

Notre gratitude va particulièrement à tous nos enseignants du département.

Nous tenons à exprimer tout au fond de nos cœurs les reconnaissances à nos familles qui nous ont offert toujours un appui sur leurs encouragements

A tous ceux qu'ont contribués de loin ou de près à la réalisation de ce travail



Dédicaces

Avec tous mes sentiments de respect avec l'expérience de ma reconnaissance, je dédie ma remise de diplôme et ma joie.

*A mon paradis, à la prunelle de mes yeux, à la source de ma joie et mon bonheur, ma lune et le fil d'espoir qui allumer mon chemin, ma moitié maman **Rokaya**.*

*A celui qui m'a fait une femme, ma source de vie, d'amour et d'affection. A mon support qui était toujours à mes côtés pour me soutenir et m'encourager, à mon prince Papa **Wadie**.*

*A mon frère **Baha eddine** pour l'amour qu'il me réserve.*

*A mes petites sœurs, mes coups de cœur **Minate Allah** et **Bayan** qu'elles savait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille.*

*A mon fiancé **Islam** pour son soutien moral.*

*A mon promoteur **Mr Ait saïdi**.*

*Sans oublier mon cher binôme **Hiba** pour son soutien, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.*

A tous mes collègues de promotion de 5^{ème} année aquaculture.

A tous ce qui ont participé à ma réussite et à tous ce qui m'aiment.

Khelfaoui Hadil



Table des matières

Remerciements	
Dédicaces	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction	1
Chapitre I : généralités sur la spiruline	
1-Historique de la spiruline	4
2-Biologie de la spiruline	5
2-1- Présentation de la spiruline	5
2-2-Taxonomie	5
2-3-Morphologie	6
2-4-Reproduction et cycle biologique	7
3 Habitat et répartition géographique	8
4-Composition et valeur nutritionnelle de la spiruline	9
4-1-Protéines	10
4-2-Glucides	10
4-3-Lipides	10
4-4- Vitamines	11
4-5-Les minéraux	12
4-6-Pigments	12
4-6-1-Les caroténoïdes	12
4-6-2-Chlorophylle (pigment vert)	13
4-6-3-Phycocyanine (pigment bleu)	13
5-Applications de la spiruline	14
5-1-En alimentation humaine	14
5-2-En alimentation animale	15
5-3-En médecine	15
5-4-En cosmétique	16
5-5-En agroalimentaire	16
6-Culture de la spiruline	16
6-1-Milieu de culture	16

6-2-Paramètres de culture	17
6-3-Température	17
6-4-Potentiel d'Hydrogène (pH)	17
6-5-Salinité	18
6-6-Lumière	18
6-7-Oxygène et agitation	18
7-Etude microbiologique de la spiruline	18
7-1-Les risques de contamination	18
Chapitre II : Matériels et méthodes	
1-Matériel d'étude	22
1-1-Le matériel biologique	22
1-2-Matériel non biologique	23
1-2-1-Matériel de culture	23
1-2-2-Matériel de laboratoire	24
2-Méthode de culture	24
2-1-Observation microscopique de la souche	24
2-2-Préparation du milieu de culture	25
2-3-Ensemencement	26
2-4-Conditions de culture	30
2-4-1-Température	30
2-4-2-Eclairage	30
2-4-3-Agitation	30
2-4-4-Hygiène et maintenance	31
3-Évolution du développement algal	31
3-1-Observation macroscopique	31
3-2-Suivi des paramètres physico-chimiques	31
3-3-Mesure de la Température	32
3-4-Mesure du pH de la culture	32
3-5-Mesure de la salinité	32
3-6-Observation microscopique de la spiruline	32
4-La récolte	33
5-Le séchage	34
5-1-Séchage traditionnel	34
5-2-Séchage à l'étuve	34
6-Analyses microbiologiques	35
6-1-Préparation des milieux de culture	35

6-2-Préparation de la solution physiologique	37
6-3-Préparation de la suspension mère et des dilutions décimales	37
6-4-Analyse microbiologique de la spiruline cultivée	38
6-4-1-Dénombrement des micro-organismes aérobies	38
6-4-2-Dénombrement des coliformes thermotolérants	39
6-4-3-Dénombrement des Staphylocoques	40
6-4-4-Dénombrement des anaérobies sulfito-réducteurs	42
6-4-5- Recherche de <i>Listeria monocytogenes</i>	43
6-4-6- Recherche des salmonelles	44
6-4-7- Recherche des levures et moisissures	45
Chapitre III : Résultats et Discussions	
1-Observation microscopique de la souche de spiruline à sa réception	47
2-Ensemencement	47
3-Évolution du développement algal	51
3-1- Observation macroscopique	51
3-2-Suivi des paramètres physico-chimiques	52
3-2-1-Température	52
3-2-2-pH	53
3-2-3-Salinité	54
4-Observation microscopique de la spiruline cultivée	54
5-Récolte et séchage	56
6-Analyses microbiologiques	57
6-1-Flore mésophile aérobie totale	57
6-2-Coliformes thermo-tolérants	58
6-3-Staphylocoques	58
6-4-Anaérobies sulfito-réducteurs	59
6-5- <i>Listeria monocytogenes</i>	61
6-6-Salmonelle	61
6-7-Levures et moisissures	61
Conclusion	65
Références bibliographiques	66
Annexes	72

Liste des abréviations :

% :	Pour cent
°C :	Degré Celsius
AJR :	Apport Journalier Recommandé
AFNOR :	Association Française de Normalisation
AFSSA :	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments.
ASR :	Anaérobies Sulfito-réducteurs.
ENSSMAL :	Ecole Nationale Supérieure Des Sciences De La Mer et L'aménagement du littoral.
SP	Solution physiologique
FMAT :	Flore mésophile aérobie totale
ISO:	International organization for standardization
JORA :	Journal Officiel de la République Algérienne
NF :	Norme Française
pH :	Potentiel d'Hydrogène
g :	Gramme
l :	Litre
ml :	Millilitre

Liste des figures

- Figure I.1 :** Les différents aspects de la spiruline. (A) spiralée, (B) ondulée, (C) droite (Ahounou, 2018).
- Figure I.2 :** Cycle de vie de la spiruline (Ciferri,1983)
- Figure I.3 :** Répartition géographique de la spiruline ; (Fox,1999)
- Figure I.4 :** Composition chimique de la spiruline (Lecointre, 2017)
- Figure II.1 :** Localisation géographique de la ferme aquacole ENSSMAL (Google MAPS, 2023)
- Figure II.2:** Souche de spiruline
- Figure II.3:** Produits utilisés pour la préparation du milieu de culture
- Figure II.4 :** Préparation du milieu de culture
- Figure II.5 :** Évaluation de la concentration et ensemencement de la culture.
- Figure II.6 :** Déroulement des ensemencements
- Figure II.7 :** Lancement du premier ensemencement.
- Figure II.8 :** Agitation de la culture à l'aide d'un diffuseur d'air.
- Figure II.9 :** Mesure des paramètres physico-chimiques de la culture (A : conductimètre, B : pH mètre)
- Figure II.10:** Récolte de la spiruline
- Figure II.11 :** Séchage de la spiruline. (A : prise de la biomasse de spiruline à l'aide d'une seringue B : Spiruline extrudée en forme de spaghetti)
- Figure II.12 :** Préparation des milieux de culture.
- Figure II.13 :** Autoclavage des milieux de culture.
- Figure II.14 :** Préparation des dilutions décimales
- Figure II.15 :** Recherche de la FMAT
- Figure II.16 :** Recherche des coliformes thermotolérants
- Figure II.17 :** Recherche des staphylocoques
- Figure II.18 :** Recherche des anaérobies sulfito-réducteurs

- Figure II.19 :** Recherche de *Listeria monocytogenes*.
- Figure II.20:** Recherche des salmonelles
- Figure II.21 :** Recherche des levures et moisissure
- Figure III.1 :** Aspect microscopique de la souche de spiruline aux grossissements : A ($\times 100$), B ($\times 400$).
- Figure III.2 :** Volumes résultants du 1^{er} ensemencement (A : C2, C4 ; B : C1, C3).
- Figure III.3 :** Les cultures au 2^{ème} ensemencement (A : C2, C3 et C4 ; B : C1).
- Figure III.4 :** Disposition des cultures au 3^{ème} ensemencement
- Figure III.5 :** Couleur de la Culture de spiruline (vert foncé) avant chaque ensemencement
- Figure III.6 :** Évolution de la température de la culture.
- Figure III.7 :** Évolution du pH de la culture
- Figure III.8 :** Évolution de la salinité de la culture
- Figure III.9 :** Aspects microscopiques des filaments de spiruline indiquant ses phases de croissance
- Figure III.10:** Courbe de croissance des micro-algues (**Salomez, 2009**).
- Figure III.11 :** Spiruline récoltée (A) et séchée (B)
- Figure III.12 :** Aspect macroscopique des colonies FMAT
- Figure III.13 :** Résultats d'observation sur milieu Baird-Parker (A) et de confirmation sur milieu Chapman (B)
- Figure III.14 :** Aspect des tubes après ensemencement et incubation pour la recherche des anaérobies sulfite-réducteurs
- Figure III.15 :** Résultats de recherche des moisissures (A) et des levures (B) sur milieu sabouraud.

Liste des tableaux :

- Tableau I.1 :** Systématique d'*Arthrospira platensis* (Fox, 1999).
- Tableau I.2 :** Teneur moyenne des vitamines hydrosolubles et liposolubles de la spiruline (Manet, 2016).
- Tableau I.3 :** Teneur moyenne des minéraux et des oligoéléments de la spiruline (Manet, 2016).
- Tableau I.4 :** Teneur moyenne des pigments de la spiruline (Vidalo, 2008 ; Liu et al., 2016 ; Manet, 2016 ; Furmaniak et al., 2017).
- Tableau I.5 :** Composition d'un milieu de culture typique (Fox,1999).
- Tableau I.6 :** Risque de contamination de la spiruline par des cyanotoxines et des cyanobactéries (Anses,2017)
- Tableau I.7 :** Risque de contamination de la spiruline par des bactéries (Anses,2017)
- Tableau II.1 :** Composition chimique du milieu de culture LMK
- Tableau II.2:** Quantités des milieux de cultures utilisées lors des analyses microbiologiques
- Tableau III.1 :** Quantité de souche de spiruline et de milieu de culture utilisées lors des ensemencements
- Tableau III.2 :** Diagnostic basé sur la couleur de la culture. (Fox,1999)
- Tableau III.3 :** Résultats des analyses microbiologiques de la spiruline.

Introduction

Une grande partie des algues pratiquent la photosynthèse et vivent principalement dans des environnements aquatiques. On estime qu'il existe environ 25 000 espèces d'algues différentes sur Terre. Parmi ces espèces, une microalgue bleue particulière se distingue : *Arthrospira platensis*, également connue sous le nom de Spiruline. Cette algue microscopique est apparue il y a environ 3,5 milliards d'années, aux côtés des premiers êtres vivants, et est considérée parmi les aliments naturels les plus complets de notre planète (**Cruchot, 2008**). D'après **SGUERA (2008)**, deux espèces sont particulièrement bien connues ; la première est *Spirulina platensis*, qui a été découverte depuis 1939 en Afrique par le professeur Creac'h dans un marché au Tchad- La seconde espèce est *Spirulina maxima*, originaire d'Amérique centrale et découverte par les Européens lors de leur conquête de l'Amérique.

Les chercheurs ont rapidement montré un intérêt pour les qualités nutritionnelles exceptionnelles de la spiruline. Ils ont mené des expériences scientifiques sur sa culture et ont démontré plusieurs de ses effets bénéfiques. Aujourd'hui, la spiruline est proposée comme un complément alimentaire de haute qualité dans l'alimentation humaine. Elle est également utilisée comme aliment thérapeutique dans le traitement de certaines maladies, ainsi que comme source d'énergie et de nutrition pour les sportifs, et dans bien d'autres applications.

En aquaculture, la spiruline est utilisée pour améliorer la croissance, la qualité nutritionnelle et la coloration des poissons (**Pandey & Singh, 2017**).

Selon l'UNESCO, c'est « l'aliment idéal et le plus complet de demain » ; quant à l'OMS « il s'agit du meilleur aliment pour l'humanité au 21^{ème} siècle » (**Manet, 2016**).

Dans les pays développés, la spiruline fait l'objet de culture intensive ; des fermes industrielles modernes de plusieurs hectares exploitent cette microalgue pour la commercialiser sous forme de nombreux compléments alimentaires. Les nombreuses qualités de la spiruline en font sans nul doute un aliment fonctionnel d'intérêt pour les industries agro-alimentaires et cosmétiques (**Sguera, 2008**).

La production de la spiruline nécessite une compréhension approfondie de son cycle de vie, des conditions de culture optimales et des facteurs environnementaux qui influencent sa croissance. Quant à la microbiologie de la spiruline, elle constitue un aspect crucial de sa production et de sa qualité. En raison de son mode de culture aquatique, la spiruline est en contact étroit avec divers microorganismes qui influencent sa croissance, sa composition et son innocuité comme produit destiné à la consommation humaine.

L'objectif principal de ce mémoire est d'explorer les différentes étapes de la production de la spiruline, de sa culture à sa récolte jusqu'au séchage ; en mettant l'accent sur les méthodes de contrôle de sa qualité.

Les analyses microbiologiques jouent un rôle essentiel dans la détection des contaminants potentiels tels que les bactéries, les moisissures et les levures, qui pourraient compromettre la sécurité alimentaire des produits destinés à la consommation humaine. Ces analyses permettent d'évaluer l'efficacité des procédures d'hygiène, d'identifier les sources de contamination et de mettre en place des mesures correctives appropriées.

Cette étude a permis d'éclaircir quelques questions, dont :

Quelles seraient les meilleures conditions de culture de la spiruline ?

Quelles sont les germes susceptibles de contaminer la spiruline ?

- Le présent travail est organisé en plusieurs parties :
- ❖ Une synthèse bibliographique représentant des généralités sur la spiruline.
- ❖ La deuxième partie de notre étude, décrit le matériel biologique et non-biologique utilisés ainsi que les méthodes utilisées.
- ❖ Dans la troisième partie, les résultats ont été exposés et discutés.
- ❖ L'étude est achevée par une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats obtenus.

Chapitre I

Généralités sur la spiruline

1. Historique de la spiruline

- ✓ **Au XV^{ème} siècle :** Sur les rives du lac de Tchad, la spiruline a été récoltée dans des pots d'argiles, puis égouttée à travers des sacs de tissus ensuite séchée au soleil. Une fois sèche, elle est transformée en galette, baptisée « le dihé » et est vendue sur le marché local (**Gantar & Svirčev, 2008**).
- ✓ **Au XVI^{ème} siècle :** La Spiruline constituait la nourriture principale des Aztèques au Mexique, jusqu'à la conquête espagnole au XVI^e siècle ; ils la récoltaient sous le nom de "tecuitlat", autour du lac de Texcoco, il était ensuite transformé en gâteaux d'une couleur bleu-vert (**Habib et al. 2008**).
- ✓ **À la fin du XVI^{ème} siècle :** le tecuitlat a été délaissé et oublié, probablement après l'assèchement des lacs au profit des développements urbains et agricoles. Le lac Texcoco représente de nos jours le seul vestige de cette époque.
- ✓ **De 1844 à 1959 :**

En 1844, près de Montevideo à l'Uruguay, deux chercheurs, Wittrock et Nordsedt, ont signalé la présence d'une « microalgue » bleu-verte hélicoïdale baptisée *Spirulina jenneri* f. platensis.

C'est en 1852, que sera publié le premier rapport taxonomique rédigé par Stizenberger qui lui donna le nom d'Arthrospira en raison de sa forme en hélice et de sa structure multicellulaire.

Puis en 1940 pendant la seconde guerre mondiale, Creach Y., une pharmacienne française découvra les galettes d'algues séchées appelées dihé. Elle en rapporte quelques échantillons pour les analyser et les identifier (**Vidalo, 2008**).

En France le botaniste Dangeard a rapporté l'expérience d'. Creach Y, et a mentionné pour la première fois l'utilisation de la spiruline en alimentation humaine. Publié pendant la deuxième guerre mondiale, son compte rendu a passé inaperçu (**Paniagua-Michel et al., 1993**).

En 1959 l'anthropologue Max-Yves Brandily publia un article intitulé : « depuis des lustres une tribu primitive du Tchad exploite la nourriture de l'an 2000 » (**Vidalo, 2008**)

La spiruline a été redécouverte accidentellement par un ingénieur Français appelé Hubert Durand Chastel : En partant au Mexique, il a pris la direction de Sosa Texcoco, vers une unité de production de carbonate de soude. Il a tenu informé de l'un des problèmes de l'exploitation : une matière organique qui perturbait la cristallisation des carbonates. En assistant en 1967 à une conférence sur la spiruline, et tenant compte des publications de Max Yves Brandily, il a fait le rapprochement avec cette substance qui le gênait dans sa production. Il débutera la culture d'*Arthrospira maxima* en 1968 et sa commercialisation s'est faite réellement en 1976.

2-biologie de la spiruline :

2-1 – Présentation de la spiruline :

La spiruline est un micro-organisme procaryote de couleur bleu-vert. Elle est capable d'utiliser l'énergie de la lumière pour son activité photosynthétique et produire de l'oxygène (**Jung et al., 2019**). La forme hélicoïdale qui lui donne l'allure d'un minuscule ressort lui a valu son appellation de « Spiruline » (**Charpy et al., 2008**).

Elle se multiplie dès que la température de l'eau dépasse 30 °C. C'est un organisme symbiotique, autotrophe, qui se nourrit uniquement de minéraux contenus dans son milieu aqueux (**Vonshak, 2002**).

Elle est reconnue comme l'un des aliments les plus nutritifs de la planète (**Jung et al., 2019**).

2-2-Taxonomie :

En 1962, **Stanier et Van Niel** ont constaté que cette « algue » bleue verte était dépourvue de compartiments cellulaires, et donc faisait partie des procaryotes ; ils ont proposé d'appeler ce microorganisme « Cyanobactérie ».

Après plusieurs études sur la systématique de la spiruline, une désignation finale en tant que cyanobactérie a été adoptée et acceptée par la suite pour figurer au « *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* » (**Goulambasse, 2018**).

Tableau I.1 : Systématique d'*Arthrospira platensis* (Fox, 1999).

Embranchement	Schizophyte (procaryotes)
Sous embranchement	Cyanoschizophyceae
Classe	Cyanophyceae
Sous classe	Hormogonophycideae
Ordre	Nostocales
Famille	Oscillatoriceae
Genre	Arthrospira
Espèce	<i>Arthrospira platensis</i> (Gomont, 1893)

2-3- Morphologie :

La Spiruline est une « algue » microscopique qui a une longueur moyenne d'environ 250 μm . Elle est composée de filaments mobiles de 10 à 12 μm de diamètre, non ramifiés et enroulés en spirale, généralement en 6 ou 7 spires (Geitler, 1932). Cependant les Spirulines présentent différentes formes ; on trouve des formes spiralées classiques, ondulées et parfois droites.

Cette particularité est en relation directe avec les conditions écologiques rencontrées dans leur habitat.

- La Spiruline est formée de filament ou trichome grâce à sa constitution en cellules transparentes empilées bout à bout, Ce trichome s'enroule sur lui-même suivant le sens des aiguilles d'une montre lorsqu'on regarde au-dessus de la spirale (Figure I.1).

Les facteurs environnementaux, telles les températures, auraient cependant une influence sur l'orientation de l'hélice (Muhling *et al.*, 2003). Cette morphologie la rend capable de se déplacer dans l'eau en adoptant le mouvement d'une vis.

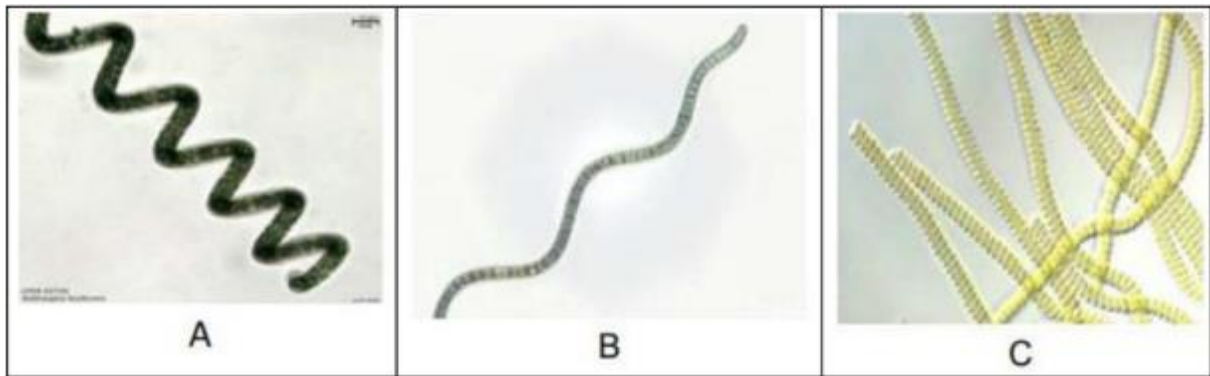


Figure I.1 : Les différents aspects de la spiruline. (A) spirulée, (B) ondulée, (C) droite (Ahounou, 2018).

2-4- Reproduction et cycle biologique :

La spiruline se reproduit suivant un mode végétatif, une multiplication asexuée suivant le principe de la bipartition. C'est donc une scission simple par segmentation des filaments qui s'effectue en plusieurs étapes (**Figure I.2**) :

- Une fois la maturité atteinte, les filaments de la spiruline forment des nécridies, des cellules ayant un aspect concave.
- Il s'ensuit une fragmentation du trichome à partir des nécridies, aboutissant à de nouveaux filaments constitués de 2 à 4 cellules appelées hormogonies.

Ces derniers croissent par division binaire et prennent la forme typique hélicoïdale, chacune des cellules donne deux cellules par scissiparité (**Charpy *et al.*, 2008**).

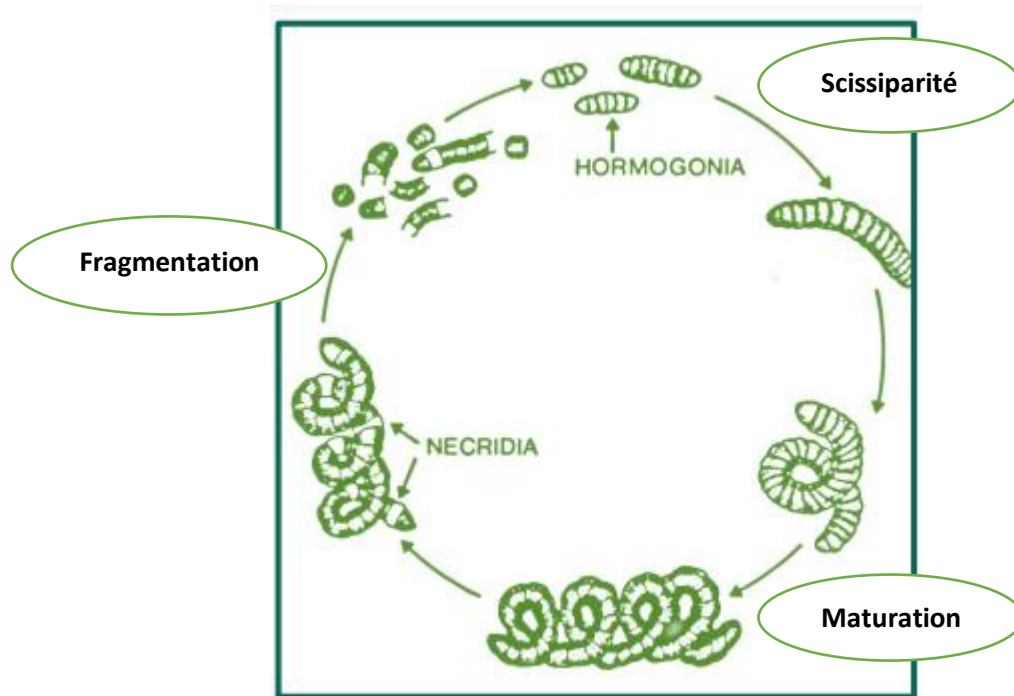


Figure I.2 : Cycle de vie de la spiruline (Ciferri,1983)

3- Habitat et répartition géographique :

La plupart des spirulines se développent dans des eaux chaudes, alcalines et fortement minéralisées (riches en matières azotées et phosphorées).

La spiruline est généralement présente dans les eaux saumâtres, ainsi que dans les lacs salins des régions tropicales et semi tropicales (Goulambasse, 2018). Elle peut également être présente dans les lacs alcalins en Afrique, en Amérique latine, et en Asie du sud. Il s'agit, certes, d'un organisme cosmopolite mais il est beaucoup moins abondant en Amérique du Nord et en Europe (Ahounou, 2018).

En raison de son caractère thermophile et ses besoins importants en lumière, la spiruline peut se développer même dans des lacs volcaniques (lac Quiliotoa, en Equateur) et aux points d'eau des régions désertiques, provenant occasionnellement des montagnes (région de Tamanrasset) (Elyah, 2003)

La spiruline croît naturellement dans la ceinture tropicale du globe, entre les latitudes 35°N et 35°S environ (Figure I.3).

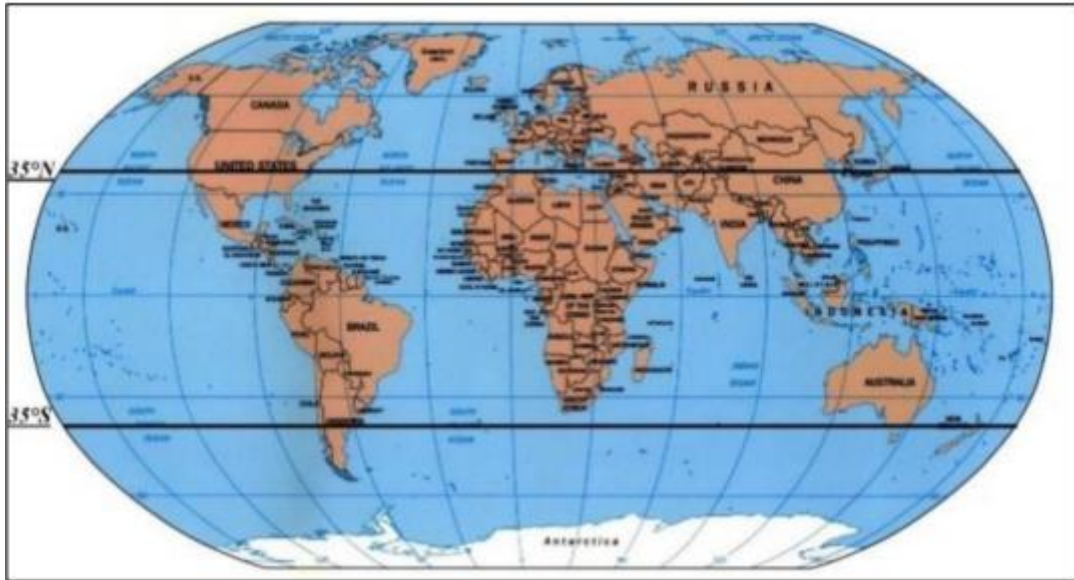


Figure I.3 : répartition géographique de la spiruline ; (Fox,1999)

4-Composition et valeur nutritionnelle de la spiruline :

Contrairement à d'autres micro-organismes, telle que les levures et les chlorelles, la spiruline est riche en micro nutriments facilement assimilables par l'organisme (**Figure I.4**), elle contient pratiquement tous les composants d'un aliment complet, protéine de haute valeur biologique en pourcentage considérable, glucides, sels minéraux, lipides, vitamines, fibres et l'eau (Jessica, 2007 ; Jourdan, 2012).

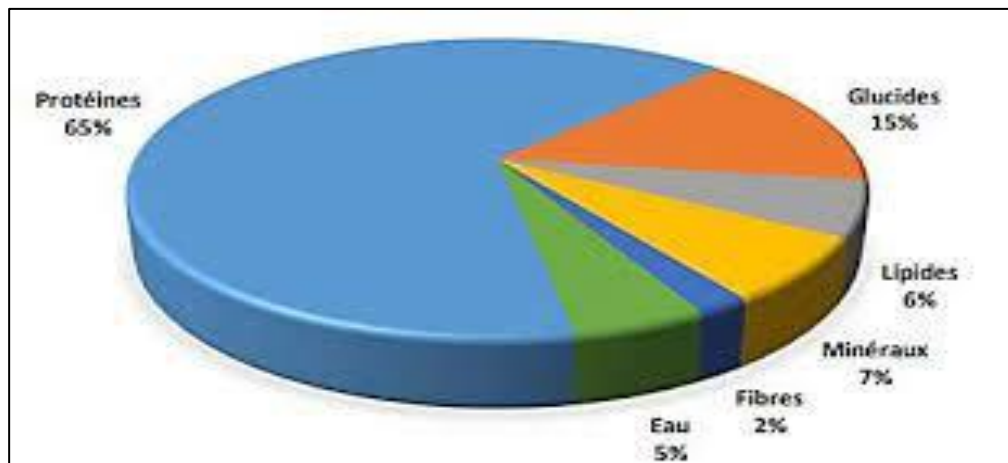


Figure I.4 : Composition chimique de la spiruline (Lecointre, 2017).

4-1- Protéines :

La spiruline est quantitativement plus riche que la plupart des aliments. Elle est particulièrement riche en protéines puisqu'elle représente 50 à 70% de son poids sec (**Fox, 1999**). Elle possède des niveaux protéiques similaires à ceux de la viande et du soja (**Martínez-Galero et al., 2016 ; Lupatini et al., 2017**). Ce pourcentage est bien plus élevé que celui du poisson (25%), du soja (35%), de la poudre de lait (35%) et des céréales (14%) (**Henrikson 1994**).

Il est à noter qu'il y a une variation du contenu en protéines de 10 à 15% selon le moment de la récolte par rapport à la photopériode. Les valeurs les plus fortes sont obtenues lorsque la récolte est effectuée au début de la période lumineuse (**AFSSA, 1982 ; Van Rijn, 1986**).

Les protéines de la spiruline sont considérées complètes, puisqu'elles renferment tous les acides aminés essentiels pour l'homme, représentant 47% du poids total des protéines (**Bujard, 1970**).

4-2- Glucides :

Les glucides constituent la membrane de la spiruline, représentant de 15 à 25% de la matière sèche (**Mahavir, 2016**).

Ces hydrates de carbone contiennent des polysaccharides spécifiques comme le spirulane calcique (Ca-SP) et le spirulane sodique (Na-SP) (**Lee, 1998**) et sont composés de rhamnose, ribose, mannose, fructose, galactose, xylose, glucose, acide glucuronique, acide galacturonique, sulfate et calcium (**Hayashi et al., 1996**). Cependant, les glucides simples ne sont présents qu'en très faibles quantités. Cette faible proportion fait de la spiruline un aliment peu calorique.

4-3- Lipides :

La composition en lipides totaux se caractérise par un bon équilibre entre acides gras saturés et acides gras polyinsaturés. La composition des principaux acides gras révèle la présence d'une forte concentration en acides gras essentiels, incluant des oméga-3 et des oméga-6 ; qui ont un effet bénéfique reconnu, la prévention contre l'accumulation du cholestérol dans l'organisme.

Des systèmes d'extraction permettent d'obtenir des valeurs situées entre 6 et 13% de lipides du poids sec (**Hudson, 1974 ; Cohen, 1997 ; Xue, 2002**).

La spiruline figure parmi les meilleures sources connues d'acide gamma-linolénique représentant 40% de ses acides gras (Ciferri, 1983 ; Cohen, 1993). Cette particularité est à souligner du fait de sa rareté dans les aliments courants et que c'est un précurseur des médiateurs chimiques des réactions inflammatoires et immunitaires (Falquet, 2006).

4-4 - Vitamines :

Etant une algue vitaminée, après la levure de bière, la spiruline est la deuxième source de vitamine B1 (Tableau I.2). Elle contient également une concentration relativement élevée de provitamine A, vitamine B12 et β -carotène (Hélène, 2008).

Tableau I.2 : Teneur moyenne des vitamines hydrosolubles et liposolubles de la spiruline (Manet, 2016).

Type	Vitamines	Teneur moyenne dans 10 g de spiruline (mg)
hydrosolubles	B1 (Thiamine)	0,35 (30% des AJR)
	B2 (Riboflavine)	0,35 (21% des AJR)
	B3 ou PP (Niacine)	1,46 (9% des AJR)
	B5 (Acide pantothénique)	0,5 - 10 (10% des AJR)
	B6 (Pyridoxine)	0,08 (5% des AJR)
	B8 ou H (Biotine)	0,5 μ g (0,5% des AJR)
	B9 (Acide folique)	0,01 (2,5 % des AJR)
	B12 (Cobalamine)	0,12 mg (48% des AJR)
Liposolubles	β -carotène (provitamine A)	0,14 g (230% des AJR)
	Tocophérol (Vitamine E)	1 UI (3% des AJR) : 0,5 à 1,9 mg
	Vitamine D	1200 UI
	K (Phylloquinone)	0,2 (300% des AJR)

4-5 Les minéraux :

Les minéraux spécifiquement intéressants dans la spiruline sont le magnésium, le calcium, le phosphore, le potassium, le fer et le zinc (**Tableau I.3**). Les trois premiers sont présents dans la spiruline à des teneurs comparables à celles trouvées dans le lait (**Falquet et Hurni, 2006**).

Pendant la culture, la spiruline absorbe plusieurs minéraux du milieu. Ainsi, sa teneur en minéraux varie en fonction du milieu de croissance et des minéraux présents dans l'eau (**Henrikson, 1997**).

Tableau I.3 : Teneur moyenne des minéraux et des oligoéléments de la spiruline (Manet, 2016).

Minéraux et Oligoéléments	Teneur moyenne/10g de spiruline (mg)
Calcium	130
Phosphore	67
Fer	7-18
Zinc	0,4
Magnésium	25-50
Sodium	0,09
Potassium	100-200
Sélénium	0,1-2,55
Cuivre	0,1
Manganèse	0,4
Chrome	0,03-0,25

4-6- Pigments :

La Spiruline, une « algue » qu'on dit bleue mais que nous voyons verte, contient toutes sortes de pigments ; comme les chlorophylles dont la chlorophylle a (typique des végétaux), les caroténoïdes dont le β -carotène et les phycobiliprotéines telles la phycocyanine (**Pierlovisi, 2007**).

4-6-1- Les caroténoïdes :

En ce qui concerne les caroténoïdes, le β carotène (pro vitamine A) est un précurseur de la vitamine A. Elle représente 40 à 80% des caroténoïdes de la spiruline. La spiruline est l'un des éléments les plus concentrés en caroténoïdes, Le reste est composé de cryptoxanthine, de

xanthophylle, d'échinénone, de zéaxanthine et de lutéine. **Falquet et Hurni (2006)** ont signalé qu'il est important de considérer la différence entre les procédés de séchage, vu que les caroténoïdes sont très sensibles à l'oxydation.

De plus à cause de la couleur orange des β carotènes, ils sont utilisés en alimentation animale (pisciculture, aquaculture, aviculture pour colorer les écailles), en alimentation humaine (colorant alimentaire, bronzage). La spiruline est l'un des éléments les plus concentrés en caroténoïdes, ils constituent une barrière contre les radicaux libres responsables du vieillissement de la peau (**Evoli Conseil, 2015**).

4-6-2- Chlorophylle (pigment vert)

C'est une molécule de couleur verte commune aux plantes, capable de capter l'énergie lumineuse et intervenant dans les premières étapes de la photosynthèse.

Contrairement à ce que nous savions, de nouvelles recherches ont prouvé que la spiruline contient les deux types de la chlorophylle, la chlorophylle de type a et la chlorophylle de type b, avec un taux très élevé (**Rinawati et al., 2020**). Le taux de chlorophylle contenu dans la spiruline est de 1% (**Tableau I.4**). Le rapport phycobiliprotéines/chlorophylle varie de 2,5 à 4,5 en fonction de la salinité du milieu et des conditions de culture (**Leema et al., 2010**).

Les hautes températures peuvent la détruire ; donc, le séchage doit se faire à faible température (**Manet, 2016**).

4-6-3- Phycocyanine (pigment bleu)

Responsable de la coloration bleue, représente entre 12,6 et 20% du poids sec (**Tableau I.3**) selon les sources (**Patel et Goyal, 2013**).

On estime que la spiruline est une excellente source de ce pigment, puisque sa fraction protéique en contient 200 g/kg (**Lupatini et al., 2017**).

Il s'agit d'une protéine complexe comprenant deux sous-unités α et β qui sont composées de 162 et 172 acides aminés, respectivement (**Liu et al., 2016**).

Couramment utilisée dans l'industrie alimentaire et cosmétique en tant que colorant naturel en raison de sa couleur bleue, elle est aujourd'hui étudiée pour ses propriétés fonctionnelles et thérapeutiques.

Tableau I.4 : Teneur moyenne des pigments de la spiruline (Vidal, 2008 ; Liu *et al.*, 2016 ; Manet, 2016 ; Furmaniak *et al.*, 2017).

Pigments	Teneur moyenne (mg)/10g de spiruline
Caroténoïdes :	
-Lutéine	0,2
-Zéaxanthine	11
- β -carotène	0,14 g (230% des AJR)
Chlorophylle	60
Phycocyanine	100-160

5- Applications de la spiruline :

5-1- En alimentation humaine :

La spiruline a été utilisée comme additif dans divers aliments destinés à la consommation humaine. Aujourd'hui, plus de 70% du marché de la spiruline est destiné à la consommation humaine, principalement comme complément alimentaire en raison de sa forte teneur en protéines, acides aminés essentiels, minéraux, vitamines et acides gras essentiels (**Koru, 2012**).

Donc, la spiruline peut générer plusieurs performances :

- Elle est utilisée par les organisations humanitaires pour réduire la malnutrition, comme poudre médicinale à mélanger avec des céréales ou de l'eau, pour venir en aide aux enfants sévèrement sous-alimentés. Pour pallier aux carences et traiter les effets des maladies causées par la faim, telles que le marasme et le kwashiorkor (**fox, 1999**).
- Également considérée comme une excellente source de vitamines B9 et B12 et de Fer. La Spiruline est idéale pour les femmes enceintes, car elle leur permet l'accès à tous les nutriments essentiels. Grâce à la phycocyanine, qui augmente l'oxygénation musculaire et réduit les contractions utérines, ces femmes peuvent mieux se préparer à l'accouchement et mieux récupérer par la suite après avoir surmonté la fatigue causée par l'allaitement (**Evoli, 2014**).
- Chez les sportifs, la consommation facilite l'effort et permet de meilleurs résultats à la récupération ;
- De par sa composition, la Spiruline convient très bien aux enfants et adolescents, surtout en période de croissance rapide. Trois à cinq grammes par jour suffisent pour éviter les carences et éliminer les toxines associées au fast-food, assez fréquentés par les jeunes.

5-2. En alimentation animale :

La spiruline renforce les défenses naturelles de l'animal comme pour l'homme. Elle joue un rôle important dans le maintien de son système immunitaire et lui permet de se défendre contre certaines maladies.

- **Utilisation de la spiruline en alimentation pour les poissons :** La spiruline est un complément alimentaire couramment utilisé dans l'aquaculture pour améliorer la croissance, la qualité nutritionnelle et la coloration des poissons. (Pandey & Singh, 2017)

Elle a également des effets sur la performance reproductive des poissons et les œufs par sa richesse en acides gras essentiels, l'acide ascorbique et les caroténoïdes (Scabini *et al.*, 2011 ; Zhang *et al.*, 2020)

- **Utilisation de la spiruline en alimentation pour les volailles :** La spiruline est également utilisée comme additif alimentaire pour les volailles, car elle peut améliorer la qualité de la viande et des œufs en augmentant la teneur en acides aminés essentiels et en acides gras polyinsaturés (El-Hack, *et al.*, 2018)
- **Utilisation de la spiruline en alimentation pour les bovins :** La spiruline peut également être utilisée comme supplément alimentaire pour les bovins, en particulier pour les vaches laitières, pour améliorer la production laitière et la qualité du lait (Parra, *et al.*, 2018).

5-3. En médecine :

Pour ses bienfaits sur la santé, la spiruline est consommée comme complément alimentaire dans les pays développés. Les bienfaits les plus importants sont :

- Le renforcement du système immunitaire, grâce aux polysaccharides.
- La lutte contre l'asthénie par son apport en oligoéléments et vitamines.
- Le traitement de certaines affections dermatologiques.
- C'est aussi un partenaire efficace dans le soulagement de la douleur, rhumatismes et arthrose, lutte contre l'ostéoporose, excès de cholestérol, hypertension et allergies. Elle protège le cœur et augmente la régénération des cellules cérébrales (Dupont *et al.*, 2014).
- Activité antivirale : liée au sulfo-quinovosyl-diacyl-glycerol riche en sulfolipides

5-4. En cosmétique :

- La richesse en composés bioactifs naturels rend les extraits d'*Arthrospira* excellents pour une utilisation dans le commerce des cosmétiques.
- Grâce à ses propriétés anti-oxydantes qui empêchent la formation de radicaux libres, la spiruline améliore la souplesse et l'élasticité de la peau et donc retarde son vieillissement et apporte brillance et résistance aux ongles et aux cheveux par les nutriments et les oligoéléments qu'elle concentre (Banks, 2007)

5-5. En agroalimentaire :

Dans l'industrie alimentaire, elle est utilisée comme colorant naturel (la phycocyanine est un des rares colorants bleus naturels), dans les chewing-gums, sorbets, bonbons, produits laitiers, boissons gazeuses. (Charpy *et al.*, 2008).

6-Culture de la spiruline :

6-1-Milieu de culture :

Il s'agit d'une production artificielle d'un milieu dans lequel la Spiruline croît naturellement. C'est donc une solution natronée et alcaline constituée d'un mélange d'eau et de sels minéraux, qui apporte à la Spiruline tous les éléments chimiques qui lui sont nécessaires (Jourdan, 2014) : azote (N), phosphore (P), potassium (K). Le **Tableau I.5** montre la composition chimique d'un milieu de culture typique (Fox, 1999)

Tableau I.5 : Composition d'un milieu de culture typique (Fox, 1999).

Eléments	Concentration en mg/l
Bicarbonate	2800
Phosphate	614
Sulfate	25
Chlore	350
Sodium	3030
Potassium	4380
Magnésium	642
Calcium	10

Ammonium	5
Ammoniac	5
Fer	1

L'eau : Les Spirulines vivent dans une eau à la fois salée et alcaline. L'eau utilisée pour le milieu de culture doit être de préférence potable (mais ne sentant pas fortement le chlore) ou au moins filtrée (sur bougie filtrante ou sable), le plus important étant l'élimination des algues étrangères. L'eau de pluie, de source ou de forage est en général de qualité convenable. Si l'eau est dure, il se produira des boues minérales (plus ou moins abondantes selon la teneur en calcium, magnésium et fer), qui décantent rapidement et ne sont pas particulièrement gênantes pour la culture, à condition toutefois que l'ensemencement initial en spiruline soit assez concentré (**Jordan, 1999**).

6-2 : Paramètres de culture :

L'un des plus grands avantages de la culture de la spiruline comparée aux autres types de cultures est sa croissance dans des conditions extrêmes (salinité et alcalinité), permettant ainsi d'exclure la prolifération de la plupart des autres microorganismes (**Benahmed, 2012**).

6-2-1-Température :

La température optimale pour la culture de la Spiruline se situe entre 30 et 35 °C (**Soni, Sudhakar & Rana, 2017**).

Elle peut croître même entre 20-37 °C (**Fox, 1999**), comme valeurs limites. En dessous de 17°C, le taux de croissance est nul (**Jourdan, 2006 ; Ogbonda et al., 2007**). Au-delà de 40°C, la culture dépérira par un excès de chaleur et devient létale pour la spiruline (**Becker et Venkataraman, 1984**).

6-2-2-Potentiel d'Hydrogène (pH) :

Pour une bonne productivité, le pH doit se situer entre 9 et 11 avec un optimum de 9,5. La spiruline est unique car elle peut croître sous conditions d'alcalinité élevée ; étant donné que les autres micro-organismes ne peuvent se développer dans ces conditions (**Soni, Sudhakar & Rana, 2017**).

L'alcalinité est habituellement apportée par du bicarbonate de sodium (NaHCO_3), mais ce dernier peut être remplacé, en partie ; par de la soude caustique ou du carbonate de sodium (Na_2CO_3) pour relever le pH initial du milieu de culture (**Fox, 1999**).

6-2-3-Salinité :

La croissance de la spiruline semble être liée directement à la concentration du milieu en sels. Elle croît dans des eaux salines à des concentrations variant entre 20 et 70 g/l (**Ciferri, 1983**).

6-2-4-Lumière :

Etant un organisme photosynthétique, pour croître, la spiruline a besoin de lumière avec une intensité comprise entre 30 et 40 klux. Cependant, à de fortes intensités lumineuses, une photolyse peut se produire (**Becker et Venkataraman, 1984**).

6-2-5-Oxygène et agitation :

Comme tout autre microorganisme aérobic, la spiruline a besoin d'oxygène (O₂) pour respirer. Cependant, cet O₂ peut être toxique quand il est en sursaturation lors de la photosynthèse active (**Jourdan, 2006**).

7 - Etude microbiologique de la spiruline :

La qualité microbiologique de la spiruline est un facteur important à considérer lors de son utilisation et de sa consommation.

La spiruline est une microalgue qui est cultivée dans des environnements aquatiques, donc susceptible à la contamination microbiologique si les bonnes pratiques de culture et de traitement ne sont pas respectées.

7-1 -Les risques de contamination :

Quant aux risques de contamination de la spiruline sèche ou fraîche, nous les avons synthétisés sous forme de **Tableaux (I.6 et I.7)** présentés comme suit :

Tableau I.6 : Risques de contamination de la spiruline par des cyanotoxines et des cyanobactéries (ANSES, 2017)

Contaminants		Risque de présence dans la spiruline	Références
Les Cyanotoxines	Les microcystines	Présence avec des teneurs généralement de l'ordre de 0,1 µg/g	(ANSES, 2017)
		La présence de <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> (appelée algue Klamath) provoque une contamination plus élevée (jusqu'à 18µg/g)	(Vichi <i>et al.</i> , 2012 ; Gilroy <i>et al.</i> , 2000 ; Heussner <i>et al.</i> , 2012).
	Les neurotoxines (Difficiles à analyser et à quantifier)	Mortelles à haute dose (DL50 >5000 µg/kg par voie orale chez la souris)	(AFSSA et AFSSET, 2006).
Les cyanobactéries productrices des cyanotoxines	Cyanobactéries identifiées dans les milieux naturels de développement de la spiruline	La présence de cyanobactéries toxiques (<i>Anabaena</i> sp., <i>Anabaenopsis</i> sp., <i>Phormidium</i> sp., <i>Oscillatoria</i> sp., <i>Synechococcus</i> sp.), associées à la présence de cyanotoxines (anatoxine-A, microcystines) a été mise en évidence dans deux lacs kenyans	(Krienitz <i>et al.</i> , 2003).
	Cyanobactéries identifiées en condition de culture	Il existe un risque de présence de cyanobactéries autres qu' <i>Arthrospira</i> , en particulier des genres <i>Anabaena</i> , <i>Anabaenopsis</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Oscillatoria</i> ou <i>Phormidium</i>	(Jourdan, 2011)
	Cyanobactéries identifiées dans des	une contamination par une cyanobactérie productrice d'anatoxines dans des	(Draisci <i>et al.</i> , 2001)

	échantillons commerciaux	échantillons de spiruline commercialisés en Italie a été révélée	
--	--------------------------	--	--

Tableau I.7 : Risques de contamination de la spiruline par des bactéries (ANSES, 2017)

Bactéries	Risque de présence	Références
Bacilles, Streptocoques du groupe D, entérobactéries (Enterobacter, Proteus, Citrobacter) Les diatomées (Navicula, Aristerionella) Les protistes (Stylonichia et Spiromonas)	Présence dans un échantillon Tchadien	(Jacquet, 1975).
Clostridium	Présence dans des compléments alimentaires vendus en Europe à des teneurs > 107 UFC/g	(Hoekstra et al., 2011).
Pseudomonas, Flavobacterium, Vibrio, Aeromonas, Clostridium, Bacillus, Fusobacterium, Enterococcus.	Contamination des échantillons commerciaux de spiruline vendus sur le marché grec	(Vardaka et al., 2016)

Chapitre II : **Matériel et méthodes**

Dans le but de réaliser des analyses de la qualité microbiologique et nutritionnelle, nous avons mis en place une culture de spiruline à petite échelle, dans la ferme aquacole de l'ENSSMAL (École Nationale des Sciences de la Mer et Aménagement du Littoral ; 36°45'18.8"N 2°58'56.3"E) (**Figure II.1**).



Figure II.1 : Localisation géographique de la ferme aquacole ENSSMAL (Google MAPS, 2023)

Pour cela, nous avons utilisé le matériel et les produits qui sont énumérés dans ce qui suit.

1-Matériel d'étude :

1-1 Le matériel biologique :

La souche de spiruline (*Arthrospira platensis*) utilisée dans notre étude (**Figure II.2**), nommée FOXBEHATAM est originaire de Tamenrasset, s'adapte parfaitement aux conditions climatiques d'Alger selon l'étude de **Ait Ouamer & Bouaziz (2020)**.

Les recommandations de **Jourdan (2013)** pour le stockage et le transport d'une souche assez concentrée de spiruline, durant quelques jours, sont surtout l'agitation et l'aération de temps à autre, au risque de sa fermentation et de dégagement de mauvaises odeurs

Dans notre cas, la souche de spiruline, issue d'une ancienne culture au niveau de la ferme aquacole de ENSSMAL, a été subdivisée en quatre volumes équitables (de 400 ml chacune) afin d'éviter le risque de perte de la totalité de la semence.

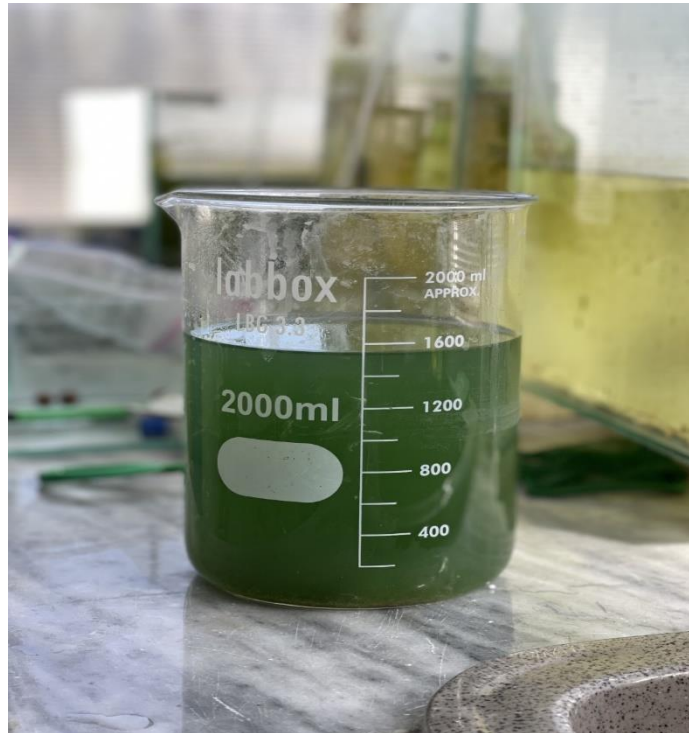


Figure II.2: Souche de spiruline

1-2- Matériel non biologique :

Il correspond à l'ensemble du matériel mis en place pour réaliser la culture, la récolte, le conditionnement et les analyses microbiologiques et nutritionnelles de spiruline.

1-2-1- Matériel de culture :

2 Aquariums (100 × 40 × 30 cm) ;

4 contenants en plastiques transparents (20 l) ;

4 Béchers (2 l) ;

2 Résistances d'aquarium (RS-200W ; 220-240v 50-60Hz) ;

Diffuseur d'air

Tulle pour la couverture de la culture

Toile synthétique pour la filtration.

1-2-2-Matériel de laboratoire :

-Balance de Précision (KERN ABJ-NM/ABS-N).

- pH mètre (INOLAB pH Level1).

- Conductimètre (CONSORT C1020).

- Microscope optique (OPTIKA microscopes ITALIE ; G x100, x400, x1000).

- Etuve (Mettler).

-Autoclave (SANO clav)

-Bain-marie (Mettler)

-Verrerie :

-Erlenmeyer

-Fioles

-Pipettes pasteur

-Entonnoir

- Éprouvettes

-Plaque chauffante et agitatrice

-Lame et lamelle

-Micropipette

-Tubes à essai

2- Méthode de culture :

2-1- Observation microscopique de la souche :

Avant d'entamer la culture de la spiruline, nous avons effectué des observations microscopiques à l'aide d'un microscope optique à différents grossissements (Gr. ×100 et × 400) pour évaluer l'aspect et la morphologie des filaments de la spiruline.

2-2- Préparation du milieu de culture :

Pour un bon développement, la spiruline a besoin d'un milieu de culture adéquat contenant les nutriments nécessaires. Le choix du milieu de culture a été fait en tenant compte, surtout, de la disponibilité de ses ingrédients. Dans notre étude, le milieu utilisé, dit **LMK**, a démontré son efficacité selon l'étude de **Bergoug & Rached (2022)**. Sa composition est détaillée dans le **Tableau II.1**.

Tableau II.1 : Composition chimique du milieu de culture LMK

Produits	Quantité (g) pour 100 l d'eau potable
Chlorure de sodium	1 300
Chlorure de calcium	10
Carbonate de sodium	200
Engrais NPK	200
Urée	50
Phosphate d'ammonium	10
Sulfate de magnésium	10
Sulfate de potassium	50
Sulfate de fer	1

Les ingrédients nécessaires à la préparation du milieu de culture LMK sont des produits chimiques, sous forme de poudre et ont été conservés dans des boîtes hermétiquement fermées (**Figure II.3**).



Figure II.3 : Produits utilisés pour la préparation du milieu de culture.

Après avoir pesé les ingrédients du milieu de culture avec une balance de précision, ils ont été broyés à l'aide d'un mortier, pour faciliter leur dilution (**Figure II.4**). Le mélange préparé, d'un poids équivalent à 1931 g, a été progressivement diluée dans un volume de 100 l d'eau potable.



Figure II.4 : Préparation du milieu de culture

Durant toute la période expérimentale, qui a duré 4 mois, nous avons préparé 2 volumes de 100 l chacun, de milieu de culture précédemment décrit. Après la préparation, le milieu de culture a été conservé dans un fût opaque en plastique de 150 l, hermétiquement fermé et gardé à l'abri de la lumière.

Pour qu'il soit utilisé dans un ensemencement (apport des nutriments nécessaires pour une croissance optimale de la spiruline), le milieu de culture, précédemment préparé, doit être bien mélangé, pour une meilleure homogénéisation et filtré à travers une passoire fine pour l'élimination des débris, accidentellement introduits.

2-3 Ensemencement

L'ensemencement consiste à ajouter une quantité de milieu de culture équivalente à cinq fois le volume de la souche utilisée (selon des recommandations de M. Hiri A. : Fournisseur initial de la souche FOXBEHATAM de Tamenrasset). Initialement au premier ensemencement, le bon état de souche de spiruline (aspect visuel et couleur) a été vérifié.

Quant aux ensemencements qui ont suivi, il était impératif de commencer par une mesure de la concentration de la culture (**Figure II.5**), en se basant sur l'intensité de sa couleur (utilisation du disque de secchi). D'après **Flaquet (1996)**, le disque de Secchi est plongé dans la culture jusqu'au point où il cesse d'être visible, à une valeur de 2 à 3 cm ; qui correspond à une culture prête à un nouvel ensemencement.

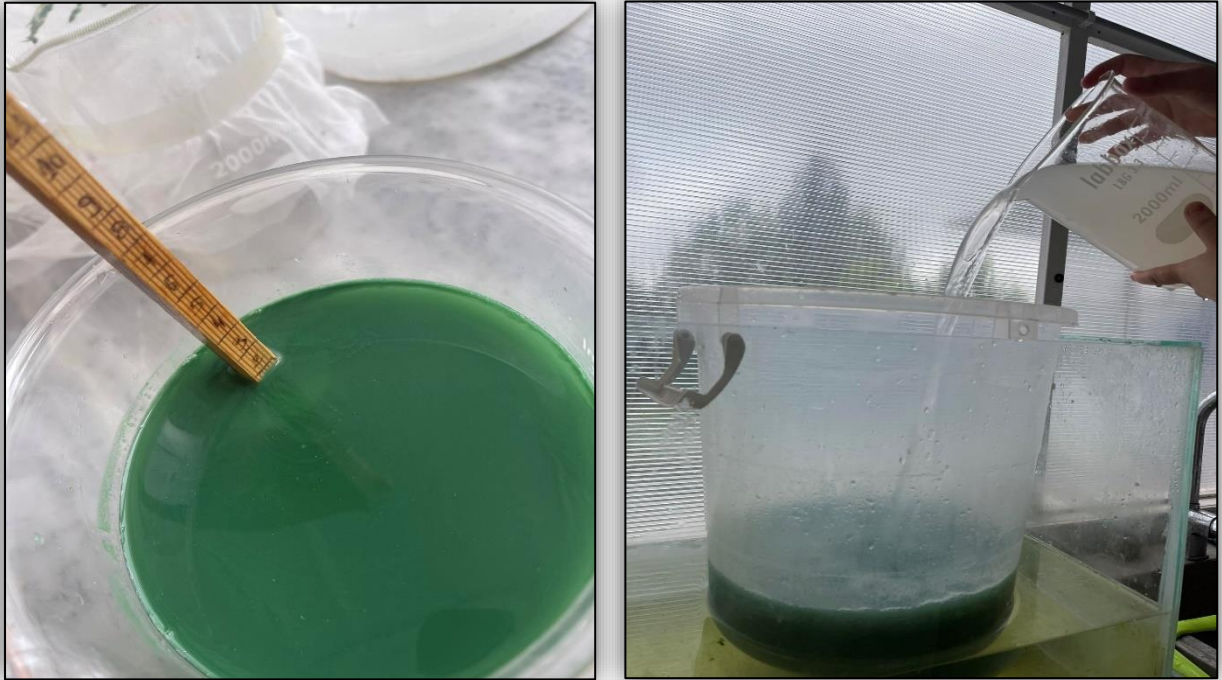


Figure II.5 : Évaluation de la concentration et ensemencement de la culture.

Selon le diagramme représenté dans la **Figure II.6**, Trois ensemencements ont été réalisés :

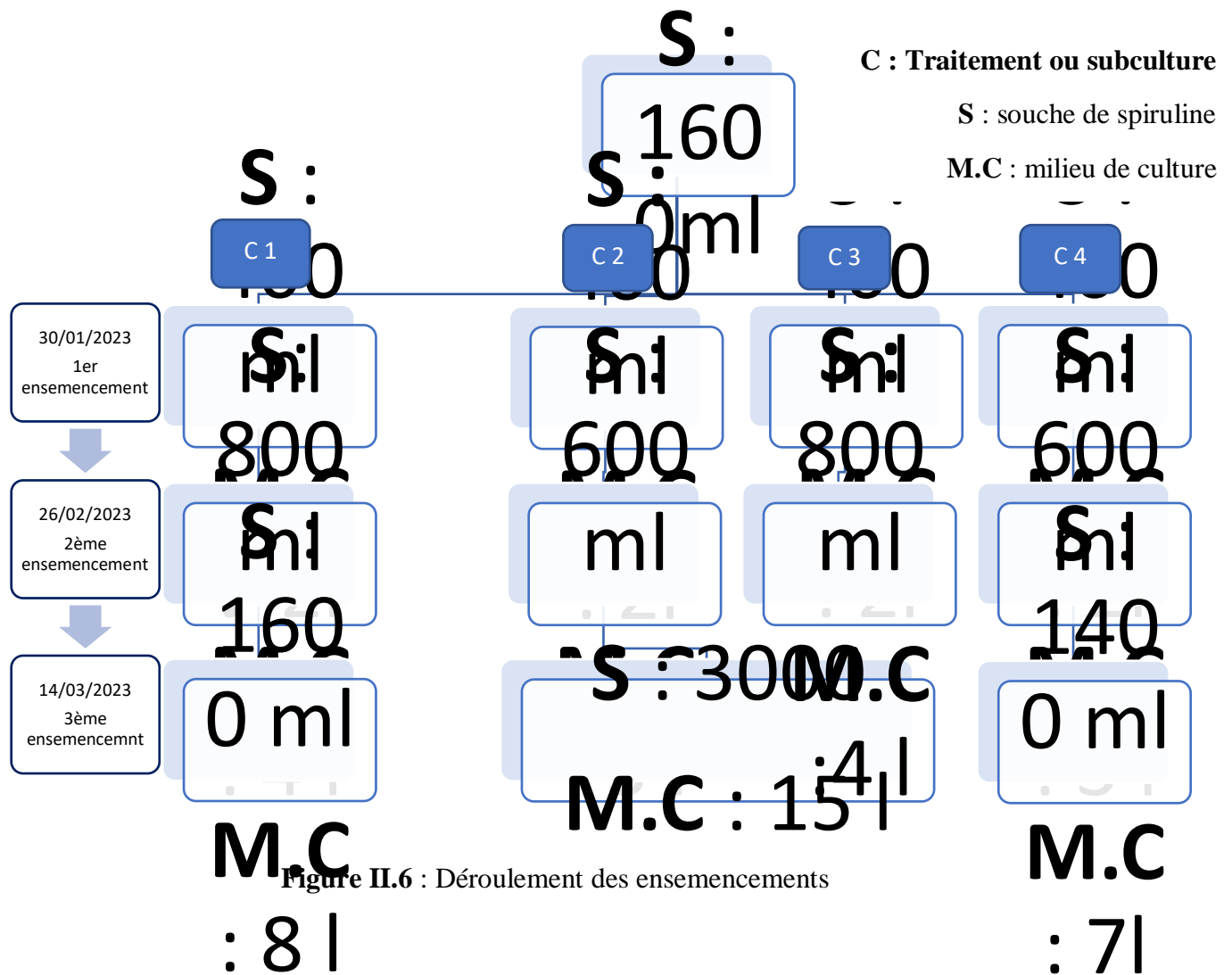


Figure II.6 : Déroulement des ensemencements

1^{er} ensemencement : (date 30/01/2023)

Pour chaque subdivision de souche de spiruline de 400 ml, nous avons ajouté 2 l de milieu de culture, formant 4 béchers de 2,4 l de spiruline dans chacun d’eux (**Figure II.6**). Les quatre béchers ont été placés dans un aquarium (rempli à ¼ de son volume en eau potable), équipé d’une résistance, pour former un bain marie permettant une répartition uniforme de la température.



Figure II.7 : Lancement du premier ensemencement.

2^{ème} ensemencement : (date 26/02/2023)

Un deuxième ensemencement a été réalisé après 26 jours du 1^{er} en suivant le même procédé (un volume de la souche, prélevée du volume total du 1^{er} ensemencement, mélangé avec cinq volumes de milieu de culture) pour obtenir un volume équivalent à six fois le volume initial. Pour cela, on a utilisé quatre contenants en plastique transparent (ouverture très large) de différents volumes.

3^{ème} ensemencement : (date 14/03/2023)

Le troisième ensemencement a eu lieu après 18 jours du deuxième, en suivant la même procédure, mais à une seule différence que deux cultures (C2 et C3) ont été regroupées dans un seul contenant de 20 l (pour pouvoir placer tous les contenants dans un seul aquarium).

2-4 Conditions de culture :

Pour mettre en place une culture de spiruline à petite échelle, des recommandations de (Zarrouk, 1966) en matière de température, d'éclairage et d'agitation, ont été pris en considération dans notre expérience.

2-4-1 Température :

Pour maintenir une température constante et optimale dans la culture (entre 30 et 35 °C), des résistances équipées de thermostats ont été placées dans les aquariums contenant la culture.

2-4-2 Eclairage :

La culture a été exposée à la lumière naturelle durant la journée, aucune énergie lumineuse n'a été fournie pendant la nuit.

2-4-3 Agitation :

L'agitation a été assurée par un diffuseur d'air pour aquarium (**Figure II.7**), actionné 24h /24 tout au long de la période expérimentale. L'agitation était nécessaire pour permettre de :

- Homogénéiser la culture.
- Répartir la lumière.
- Éviter la formation des boues minérales et l'agglomération des filaments de la spiruline.



Figure II.8 : Agitation de la culture à l'aide d'un diffuseur d'air.

2-4-4 Hygiène et maintenance :

Il est impératif de respecter les bonnes pratiques d'hygiène lors de la culture et durant toutes les opérations qui suivent (récolte et conditionnement), notamment en évitant tout contact direct avec le produit, en travaillant à une hauteur suffisante du sol, en utilisant des instruments et des récipients en verre nettoyés et réservés exclusivement à la culture de la spiruline. Quant à la prévention contre l'entrée d'insectes, la culture a été recouverte d'une moustiquaire.

3- Évolution du développement algal :

Durant la phase de culture de la spiruline et lors de chaque ensemencement, les conditions de culture et d'hygiène ont été respectés scrupuleusement. Les paramètres de la culture, comme la couleur, le pH, la température et la salinité, ont été prélevés un jour sur deux.

3-1 Observation macroscopique :

Il est possible d'observer visuellement l'état de la spiruline et de suivre son évolution. La couleur de la culture est un indicateur fiable de l'état de santé de la culture et de la croissance des spirulines. En général, une culture saine présente une teinte verte plus ou moins foncée, selon la concentration de spiruline.

3-2- Suivi des paramètres physico-chimiques :

Il s'agit de suivre l'évolution des paramètres de la culture de la spiruline. Une supervision du dispositif expérimental a été assurée en veillant au bon fonctionnement des agitateurs, ainsi qu'à surveiller la température, le pH de la culture (**Figure II.9**).

3-2-1 Mesure de la Température :

La température a été mesurée à l'aide d'un même dispositif (conductimètre) permettant de relever la température (**Figure II.9.A**) et en même temps la salinité.

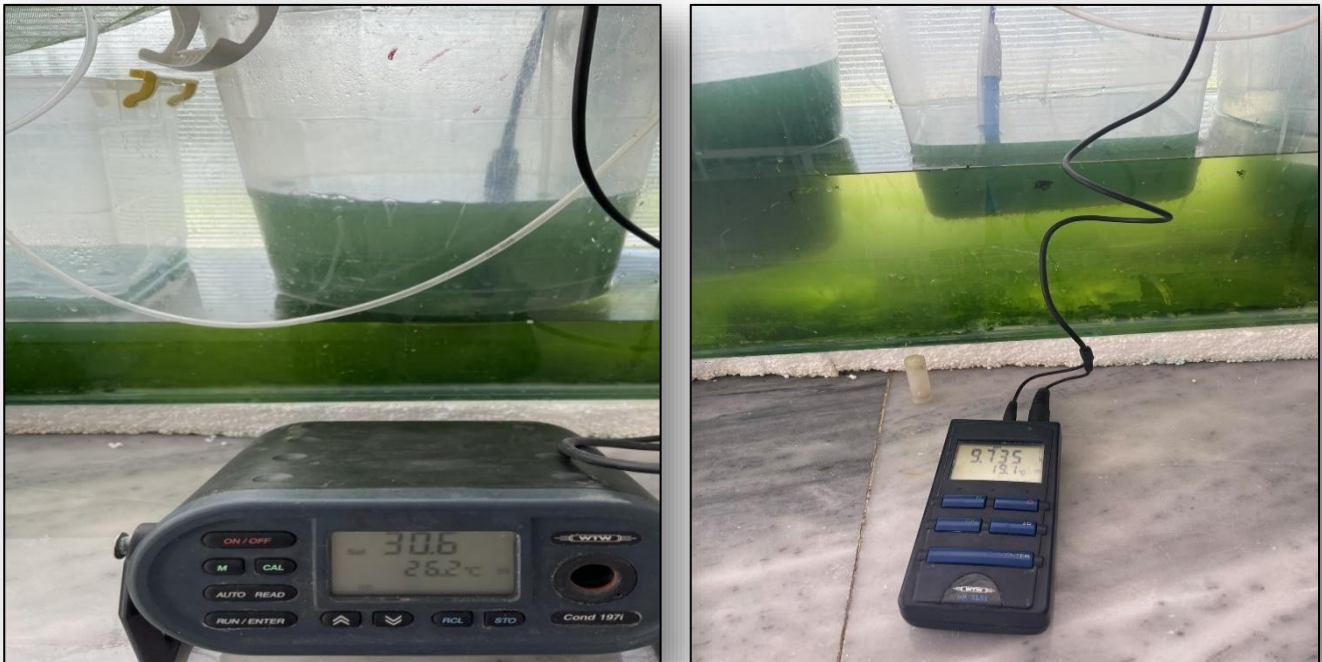
**A****B**

Figure II.9 : Mesure des paramètres physico-chimiques de la culture (A : conductimètre, B : pH mètre)

3-2-2 Mesure du pH de la culture

Le pH de la culture a été mesuré à l'aide d'un pH- mètre (**Figure II.9.B**). On trempe l'électrode de 2 à 3 cm en agitant légèrement, on attend la stabilisation de la lecture ; puis, on note le pH.

3-2-3 Mesure de la salinité :

Elle a été effectuée à l'aide du conductimètre.

3-3 Observation microscopique de la spiruline :

Durant la période de culture, des observations microscopiques ont été effectuées afin de contrôler la qualité des filaments et la concentration de la spiruline.

Chaque semaine, des échantillons de spiruline ont été prélevés à partir des 4 traitements considérés. Chaque échantillon de spiruline prélevé a été observé au microscope optique pour détecter toute contamination éventuelle, pour évaluer la morphologie et l'aspect des filaments de spiruline. Ces observations ont permis de s'assurer de la bonne santé des cultures et de la conformité des filaments de spiruline.

4- La récolte :

La première récolte de la spiruline a eu lieu le 10/04/2023 (après 70 jours du début de la culture). De petits volumes de 50 ou de 100 ml ont été prélevés manuellement de la culture le matin. Ce moment de récolte est préférable, car la teneur en protéine de la spiruline est généralement plus élevée le matin que le soir (**Jourdan, 1999**).

Les volumes prélevés ont été filtrés à travers une passoire pour éliminer les grandes particules telles que les insectes et les débris végétaux, puis à travers une deuxième tulle de filtration (toile synthétique avec Φ des pores de 60 μm) pour récupérer la spiruline (**Figure II.9**).



Figure II.10: Récolte de la spiruline

La durée nécessaire pour récupérer la pâte verte de spiruline sur le filtre varie en fonction de la concentration de la spiruline dans le milieu, généralement entre 30 minutes et une heure.

5- Le séchage :

Pour assurer la conservation et la distribution de la spiruline, deux méthodes de séchage ont été réalisées :

5-1 Séchage traditionnel :

Une partie de la biomasse filtrée a été prélevée à l'aide d'une seringue de 5 ml (**Figure II.10.A**) ; puis, pressé en forme de "spaghetti" sur un tulle en nylon (**Figure II.10.B**), en vue de la sécher. Le séchage a été effectué à l'ombre et à température ambiante (environ 25°C). Sa durée a varié de 5 à 7 heures en fonction de l'épaisseur de la biomasse et de l'humidité ambiante du lieu de séchage.

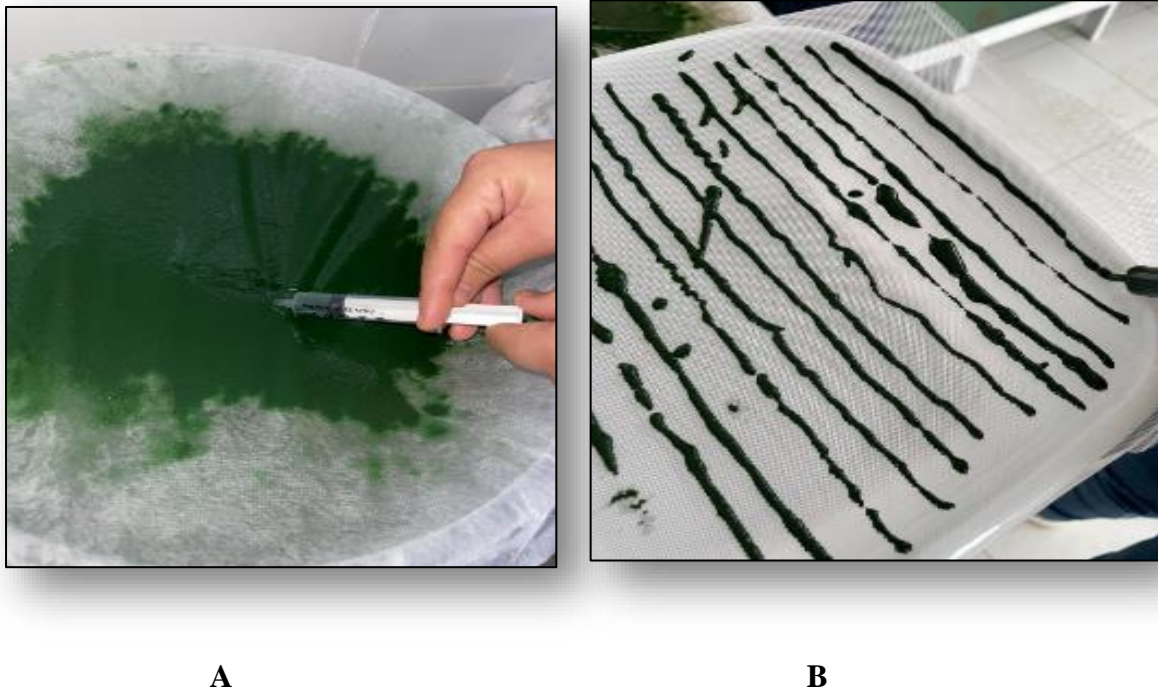


Figure II.11 : Séchage de la spiruline. (A : prise de la biomasse de spiruline à l'aide d'une seringue B : Spiruline extrudée en forme de spaghetti)

5-2 Séchage à l'étuve :

La biomasse extrudée en forme de "spaghetti" sur un tulle en nylon a été étalée à l'intérieur de boîtes de Pétri, puis séchée pendant six heures à une température de 40°C. La spiruline séchée de manière adéquate est craquante et peut être facilement détachée du support de séchage.

6- Analyses microbiologiques :

Pour analyser la qualité microbiologique de la spiruline cultivée, il était nécessaire de passer par différentes étapes ; la préparation des milieux de culture, du matériel et leurs stérilisations et la réalisation de la solution mère et des dilutions décimales.

6-1 Préparation des milieux de culture :

➤ Mode opératoire :

- 1- les instructions sur la bouteille renfermant la poudre ont été suivies.
- 2-la quantité de poudre requise a été pesée.
- 3- la poudre a été déposée dans un erlenmeyer, la quantité d'eau distillée nécessaire a été ajoutée et un barreau magnétique y a été inséré.
- 4-Si la poudre ne contient pas d'agar, de l'agar a été ajouté afin de solidifier le milieu (15 g d'agar dans 1 l).
- 5- l'erlenmeyer a été déposé sur une plaque agitatrice. L'agitation (réglée à 600 tr/min) et la chaleur ont été déclenchées.
- 6- le milieu a été chauffé jusqu'à l'obtention d'une dilution complète et d'une ébullition, pendant un minimum d'une minute.
- 7-À l'aide des gants isothermes, le milieu a été versé dans un flacon (ne pas dépasser la moitié du flacon).
- 8- le milieu a été identifié avec un ruban gommé.



Figure II.12 : Préparation des milieux de culture.

Tableau II.2 : Quantités des milieux de cultures utilisées lors des analyses microbiologiques

Milieu de culture	Quantité de poudre (g)	Volume d'eau distillée (ml)
Gélose nutritive	12	400
Milieu Viande-foie	27.2	400
Gélose desoxycholate	16	400
Milieu Baird-parker	23.2	400
Milieu chapman	44.4	400
Gélose au sang	16	400
Gélose sabouraud	26	400

Après leur préparation, les milieux de culture ont été stérilisés à 120°C pendant 15 minutes. Il faut s'assurer de la fermeture des flacons pour éviter tout débordement, puis ils ont été mis dans un bac à autoclave (**Figure II.13**).



Figure II.13 : Autoclavage des milieux de culture.

6-2 Préparation de la solution physiologique :

La solution physiologique qu'on a préparée a servi pour diluer l'échantillon de spiruline. Pour se faire, nous avons procédé comme suit :

- 9 g de chlorure de sodium ont été pesés et mis dans un erlenmeyer. Une quantité de 1000 ml d'eau distillée a été ajoutée.
- L'erlenmeyer a été déposé sur une plaque d'agitation en insérant un barreau magnétique. L'agitation a été poursuivie jusqu'à obtention d'une dilution complète.

6-3 Préparation de la suspension mère et des dilutions décimales :

La solution mère a été réalisée à partir de 25 g de spiruline qui ont été dilués dans 225 ml de solution physiologique (**Figure II.14**). Le protocole suivi est présenté dans l'**annexe 1**.

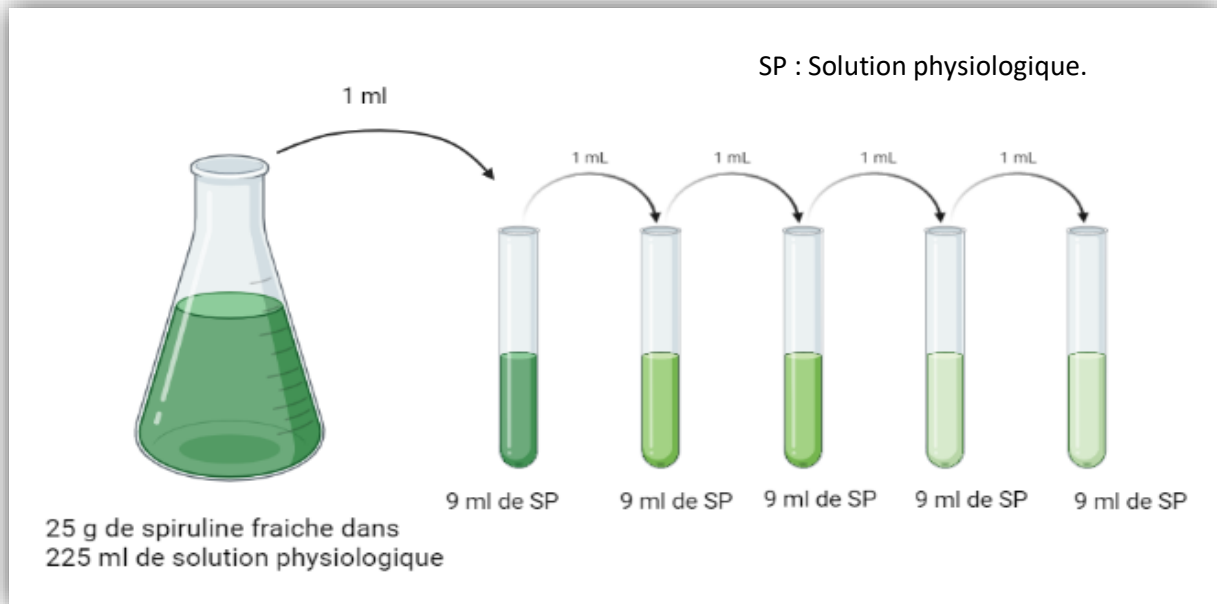


Figure II.14 : Préparation des dilutions décimales.

6-4 Analyse microbiologique de la spiruline cultivée :

Les analyses microbiologiques reposent sur la recherche et le dénombrement des germes les plus significatifs de l'état hygiénique du produit. Les germes recherchés lors de cette étude sont :

- Les micro-organismes aérobies
- Les coliformes thermotolérants
- Les micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs
- Staphylocoques (*Staphylococcus aureus*)
- *Listeria monocytogenes*
- Levures et moisissures

6-4-1 Dénombrement des micro-organismes aérobies (NF 08-051, 1991) [Annexe 2]

❖ Principe

Il s'agit d'une technique de comptage des micro-organismes après incorporation de volumes déterminés d'échantillons ou de ces dilutions dans un milieu gélosé (Delarras, 2007).

Le dénombrement de cette microflore a été réalisé selon la norme française NF V 08-51 par la méthode d'ensemencement en profondeur sur gélose nutritive (Figure II.15).

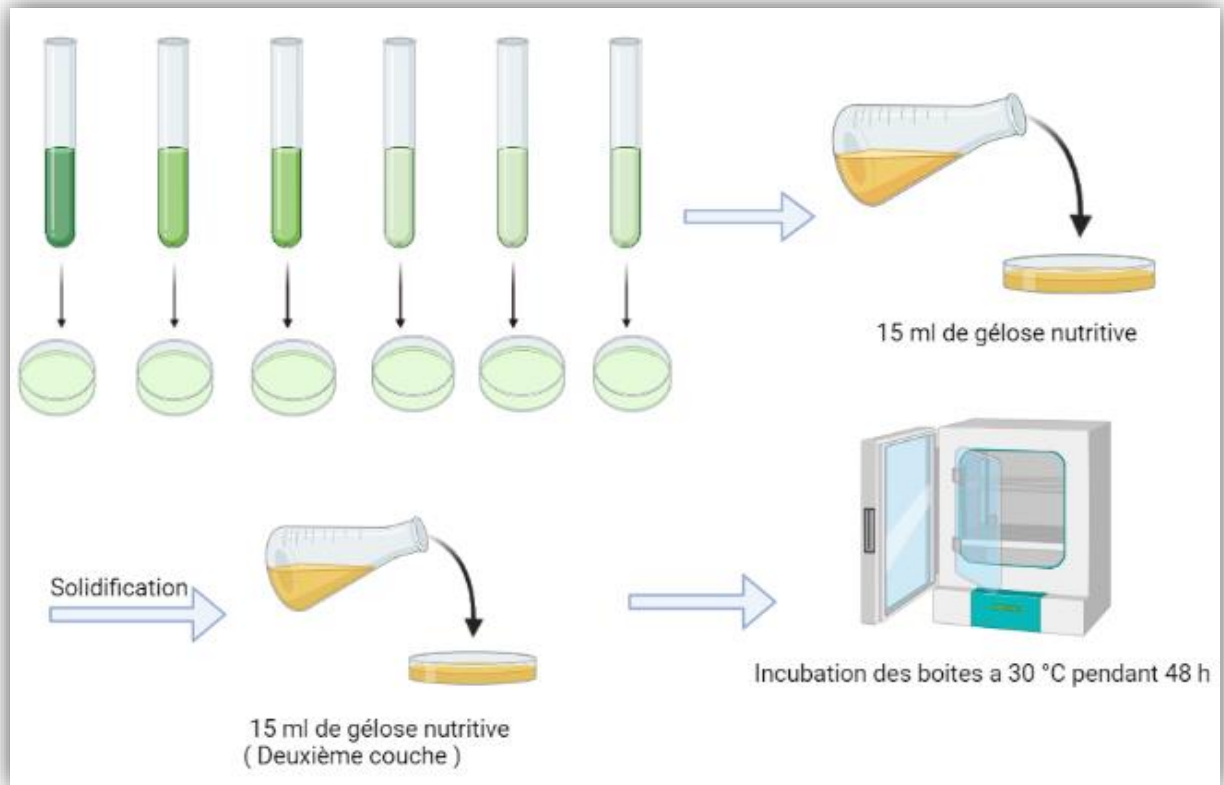


Figure II.15 : Recherche de la FMAT

6-4-2 Dénombrement des coliformes thermotolérants (NF V 08-060, 1996) [Annexe 2]

❖ Principe :

La différenciation des coliformes est fondée sur la capacité de ces germes à fermenter le lactose. Les microorganismes lactose-positif produisent une acidification qui, en présence de rouge neutre, se manifeste par l'apparition de colonies rouges (**Figure II.16**).

Certaines souches de *E. coli* et quelques bactéries opportunistes (*Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*) sont responsables d'infections respiratoires, génito-urinaire ou de septicémie (**Danel, 2017**).

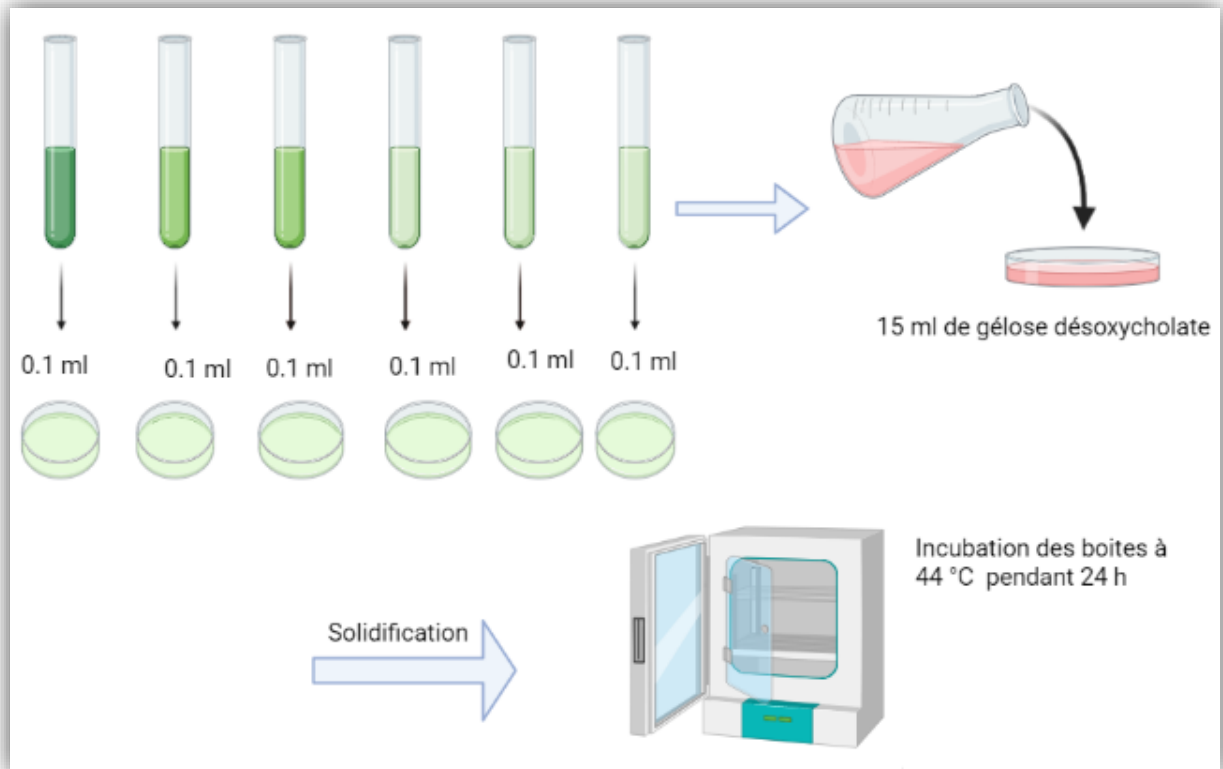


Figure II.16 : Recherche des coliformes thermotolérants

6-4-3 Dénombrement des Staphylocoques : (NF 6888-1, 1999) [Annexe 2]

❖ Principe

Le milieu Baird Parker contient du tellurite de potassium et du jaune d'œuf, qui sont des inhibiteurs de la croissance de nombreuses bactéries, mais qui n'affectent pas la croissance des staphylocoques (**Figure II.17**). En outre, le milieu contient du glycogène, qui est un substrat utilisé par *Staphylococcus aureus* pour produire une enzyme appelée alpha-glucosidase, qui est responsable de la dégradation du glycogène en glucose, et par conséquent, favorise la croissance de la bactérie (**BAM, 2016**).

Les staphylocoques sont recherchés par la méthode d'ensemencement sur boîte de Pétri et pratiqués le plus souvent dans un but d'isolement (**Delarras, 2007**).

La croissance des staphylocoques dans les aliments constitue un risque pour la santé publique parce que certaines souches appartenant principalement à l'espèce *Staphylococcus aureus* produisent des entérotoxines dont l'ingestion provoque une toxi-infection alimentaire, se traduisant par des vomissements violents accompagnés de diarrhées.

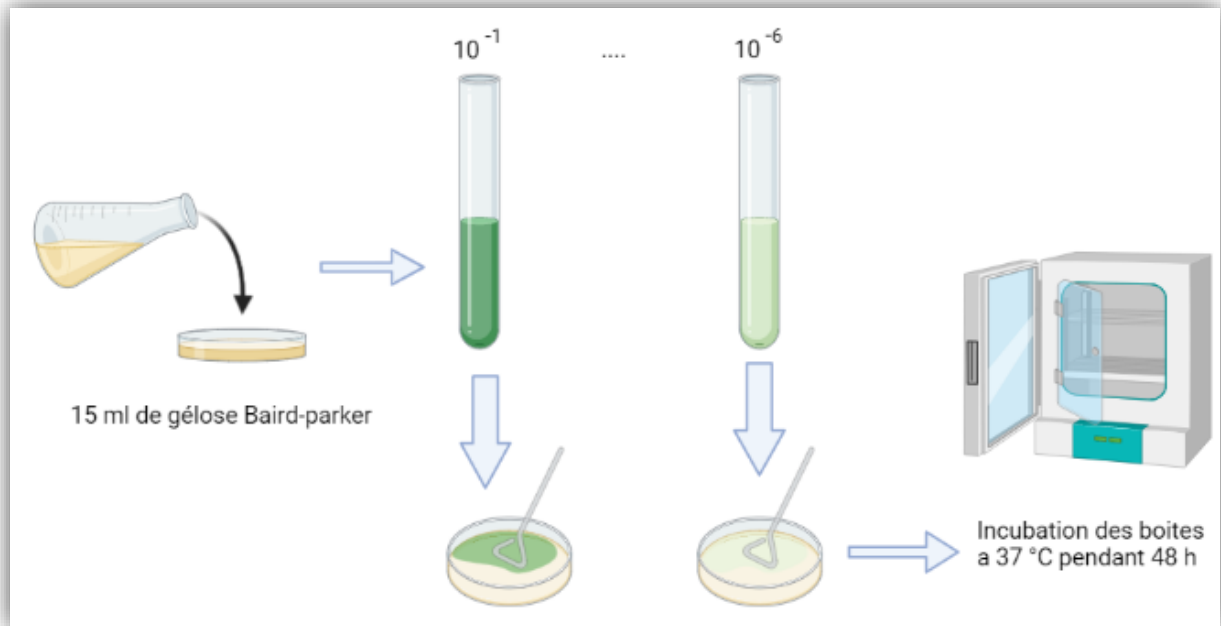


Figure II.17 : Recherche des staphylocoques

Test de catalase : (ISO 7218, 2007) [Annexe 2]

La catalase est une enzyme présente chez les bactéries aérobies strictes, elle permet de détruire des peroxydes formés au cours de réaction de l'oxydation (Delarras, 2003).

L'inoculum bactérien a été placé sur une lame propre et sèche, et une goutte d'eau oxygénée a été ajoutée à l'aide d'une pipette, l'observation a été immédiate, s'il y a apparition de bulles d'oxygène, la réaction est dite catalase positive. A l'inverse, l'absence de bulles d'air se traduit par une réaction négative (catalase négative).

Test de coagulase : (ISO 6888-2, 2003) [ANNEXE 2]

Le test de la coagulase différencie les souches de *staphylococcus aureus* des autres espèces à coagulase négative, la coagulase est une protéine semblable à une enzyme qui provoque la coagulation du plasma en convertissant le fibrinogène en fibrine.

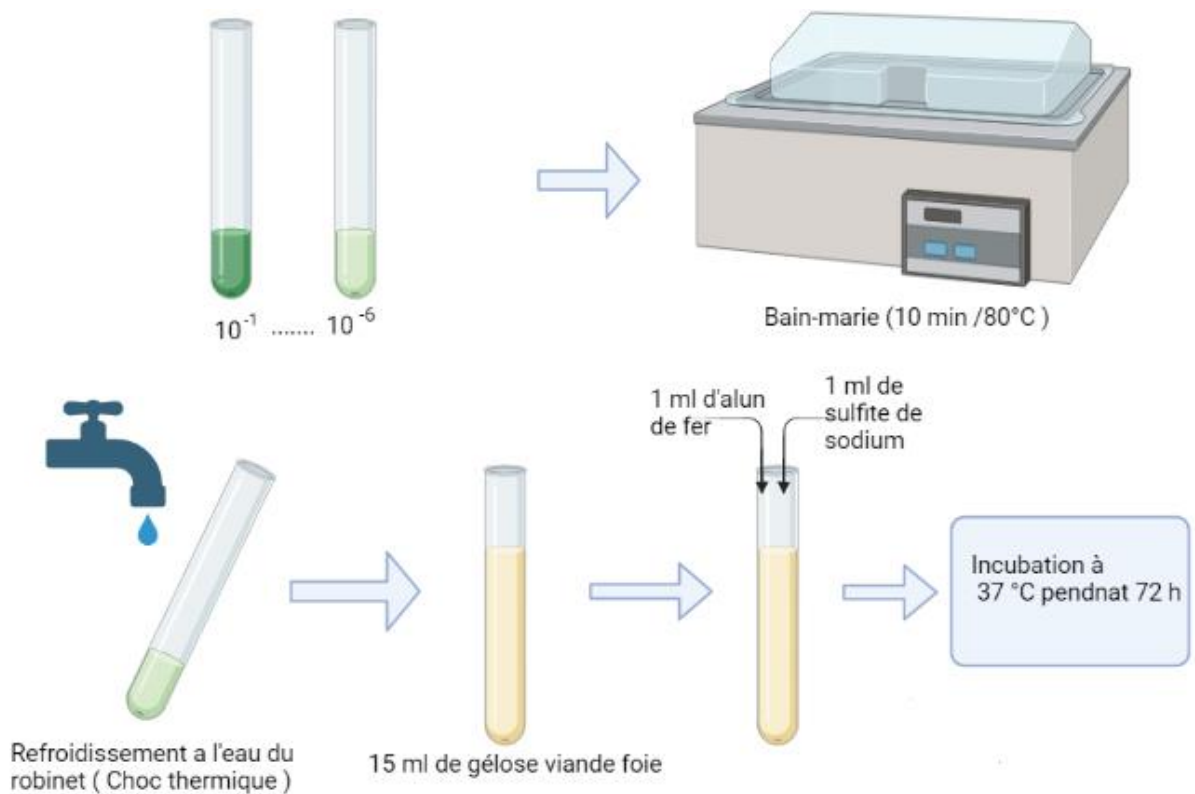
L'inoculum bactérien a été mélangé avec du plasma dans un tube à essai puis incubé à 37 °C pendant 24h.

6-4-4 Dénombrement des anaérobies sulfito-réducteurs (ASR) (NF V 08-061, 1996)

[Annexe 2] :

❖ **Principe**

La recherche de ces micro-organismes indicateurs de contamination se fait par la méthode d'incorporation de gélose en tube (**Figure II.18**) ; dans le but de rechercher et de dénombrer les spores des Clostridium sulfito-réductrices qui se développent en 24 à 48 heures sur une gélose Viande Foie ; en donnant des colonies typiques réduisant le sulfite de sodium (Na_2SO_3) qui se trouve dans le milieu, en sulfure qui en présence de Fe^{+2} donne FeS (sulfure de fer) de couleur noire. Les spores des ASR constituent généralement des indices de contamination ancienne (**Benaissa, 2011**).

**Figure II.18** : Recherche des anaérobies sulfito-réducteurs

6-4-5 Recherche de *Listeria monocytogenes* (NF V 08-055,1997) [Annexe 2]

❖ Principe :

Listeria monocytogenes est capable de produire différentes formes d'hémolyse sur la gélose au sang. Elle peut produire une hémolyse alpha partielle, où la dégradation partielle des globules rouges provoquant une zone de coloration verte autour de la colonie, ou une hémolyse bêta complète, où les globules rouges sont complètement dégradés et la zone autour de la colonie apparaît transparente. Elle peut également ne pas produire d'hémolyse du tout, dans ce cas, on parle d'hémolyse gamma (Todar, 2009).

Listeria monocytogenes est un agent pathogène pour les êtres humains. La listériose, une infection causée par cette bactérie, affecte principalement les femmes enceintes, ce qui peut entraîner des complications telles que des interruptions de grossesse. Les nouveau-nés sont également vulnérables et peuvent développer une infection grave qui est fatale dans environ un tiers des cas. Chez les adultes immunodéprimés, la listériose se manifeste le plus souvent par des méningites, des encéphalites et des septicémies (ANSES, 2012).

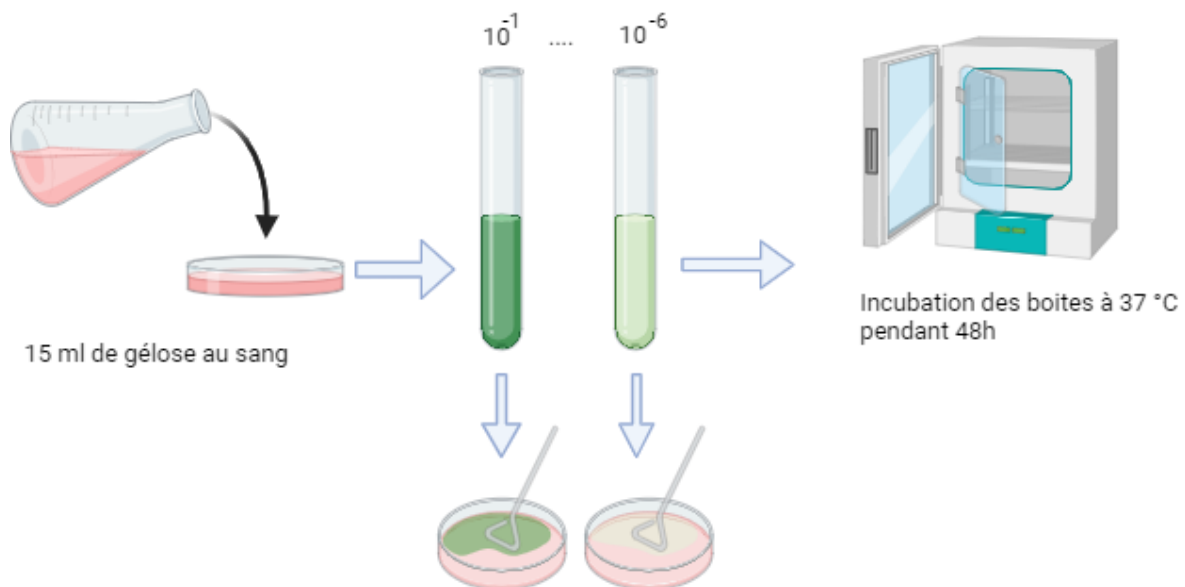


Figure II.19 : Recherche de *Listeria monocytogenes*.

6-4-6- Recherche des salmonelles (NF V 08-052, 1997) [Annexe 2]

Principe : La recherche des Salmonelles est effectuée en trois étapes successives : Pré-enrichissement, enrichissement et isolement (Figure II.21).

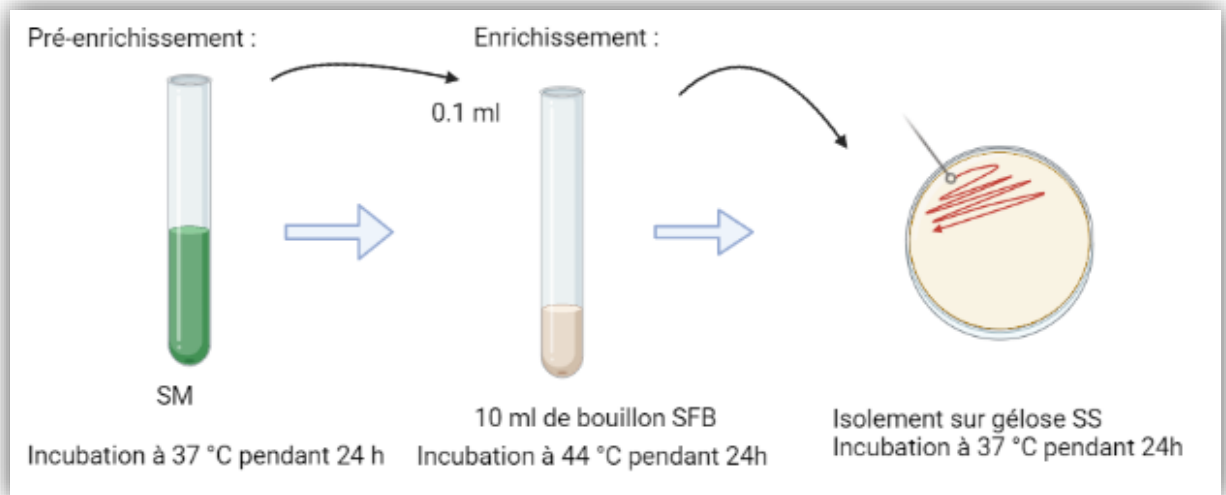


Figure II.20: Recherche des salmonelles

6-4-7 Recherche des levures et moisissures : (NF 7698,1991) [Annexe 2]

❖ Principe :

Il est nécessaire que le milieu utilisé pour la culture bactérienne puisse inhiber la croissance de toutes les bactéries présentes. Pour cela, il doit contenir une substance capable d'inhiber leur développement, comme un antibiotique. Dans le cas du milieu Sabouraud (SBA), la substance choisie pour cet effet est le chloramphénicol, selon **Guiraud (1998)**.

Les levures et moisissures peuvent provoquer des réactions allergiques et des maladies. Il existe un risque d'infection superficielle ou localisée chez les individus en bonne santé et d'infection plus grave et invasives chez les immunodéprimés.

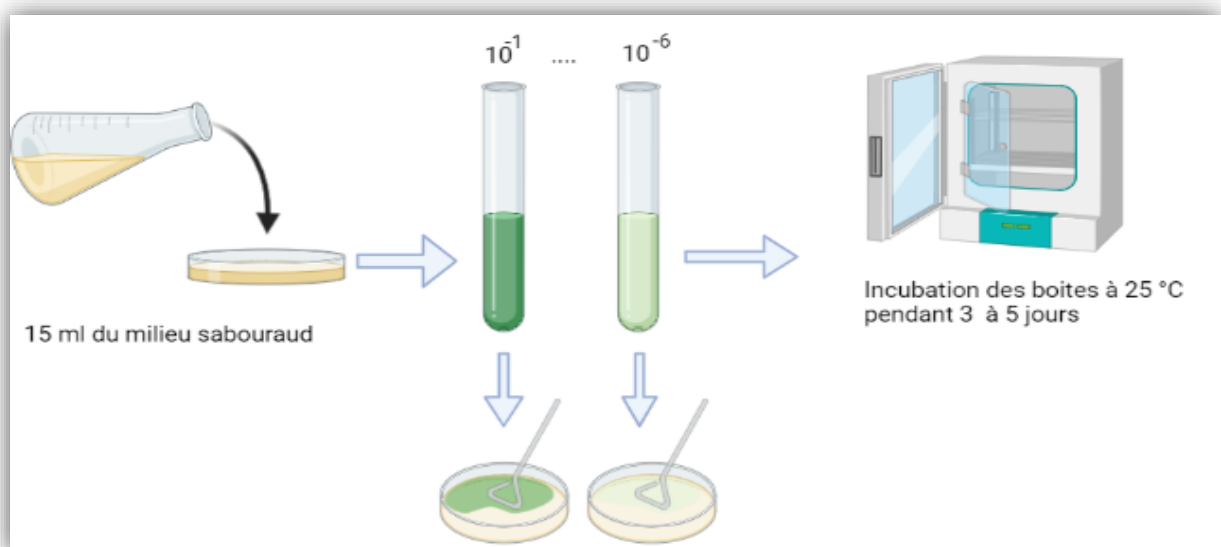


Figure II.21 : Recherche des levures et moisissure

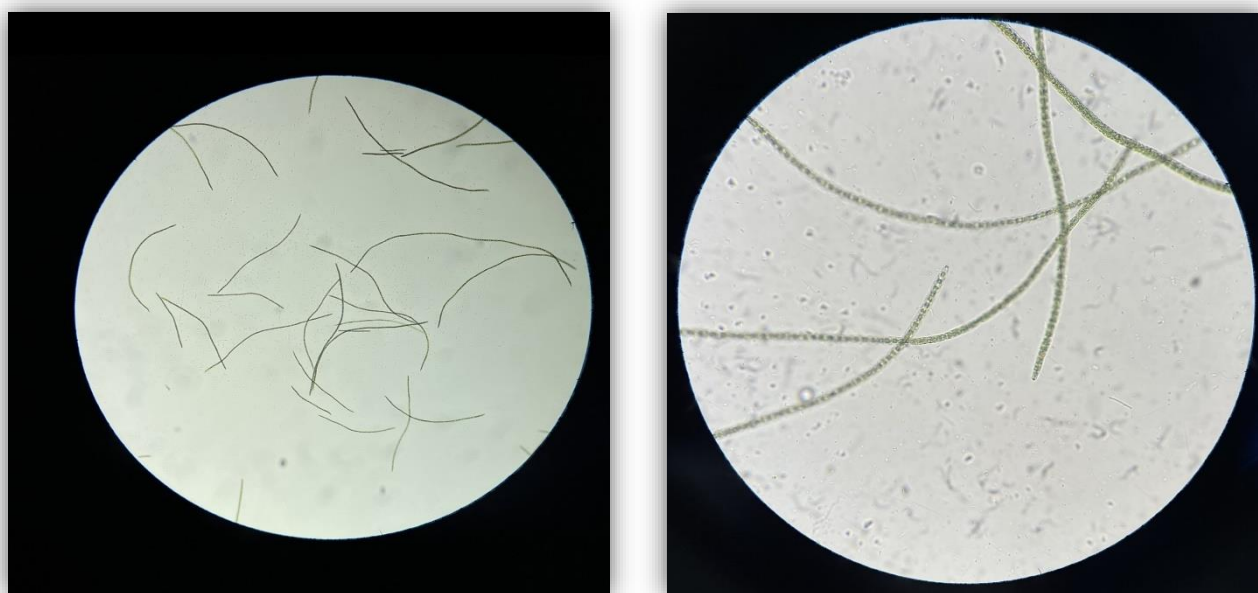
Chapitre III :

Résultats et discussions

Ce chapitre traite des résultats obtenus lors du suivi de la culture de spiruline ; incluant, l'ensemencement, les observations à l'œil nu et au microscope optique, sa productivité, ainsi que le suivi des paramètres physico-chimiques et en fin, les résultats d'analyses microbiologiques pour garantir sa salubrité à des fins de consommation humaine.

1- Observation microscopique de la souche de spiruline à sa réception :

Les résultats de l'examen microscopique aux grossissements $\times 100$ et $\times 400$ ont montré que les filaments de spiruline étaient denses et présentaient une morphologie droite (**Figure III.1**). Aucun type de flore, que soit de bactéries ou de champignons, n'a été observé sous microscope optique dans l'échantillon prélevé. Cela indique que la souche utilisée au début de l'expérience était saine et ne présentait pas de contamination.



A

B

Figure III.1 : Aspect microscopique de la souche de spiruline aux grossissements : A ($\times 100$), B ($\times 400$).

2- L'ensemencement :

Initialement, la souche de spiruline de 1600 ml a été répartie en 4 volumes de 400 ml chacun ; par la suite, trois ensemencements successifs de ces volumes ont été réalisés. Les résultats de ces ensemencements sont présentés dans le **Tableau III.1**

Tableau III.1 : Quantité de souche de spiruline et de milieu de culture utilisées lors des ensemencements

		C1	C2	C3	C4
1 ^{er} ensemencement	Souche de spiruline, ml	400	400	400	400
	Milieu de culture, l	2	2	2	2
	1^{er} Volume total, l	2,4	2,4	2,4	2,4
2 ^{ème} ensemencement	Souche de spiruline, ml	800	600	800	600
	Milieu de culture, l, l	4	3	4	3
	2^{ème} volume total, l	4,8	3,6	4,8	3,6
3 ^{ème} ensemencement	Souche de spiruline, l	1,6	3		1,4
	Milieu de culture, l	8	15		7
	3^{ème} volume total, l	9,6	18		8,4

Lors du premier ensemencement, chaque volume de culture obtenu (C1, C2, C3 ou C4), du mélange de la souche et du milieu de culture, a été maintenu dans les mêmes conditions pendant une période de 26 jours.

Durant la 1^{ère} période de culture, une diminution des volumes (**Figure III.2**) est constatée (de 66,6 à 75,0%), ceci est dû à l'évaporation de l'eau suite aux températures considérables ($\approx 32\text{ C}^\circ$).

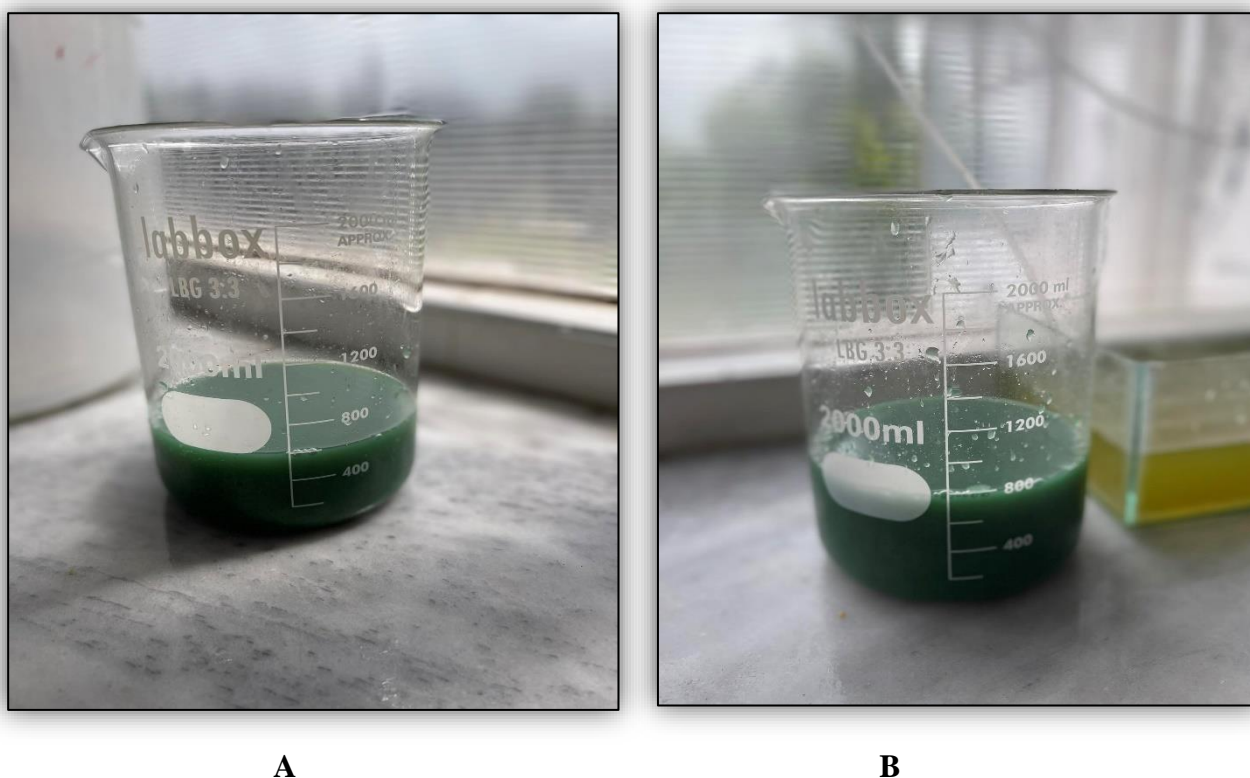


Figure III.2 : Volumes résultants du 1^{er} ensemencement (**A** : C2, C4 ; **B** : C1, C3).

Dans le but d'augmenter le volume de la spiruline, un deuxième ensemencement (**Figure III.3**) a été réalisé au bout du 26^{ème} jour après le 1^{er} ensemencement.

Les mêmes conditions de culture ont été maintenues lors du deuxième ensemencement. La diminution des volumes a également été remarquée au niveau de toutes les cultures (de 61,1 à 67,0%).

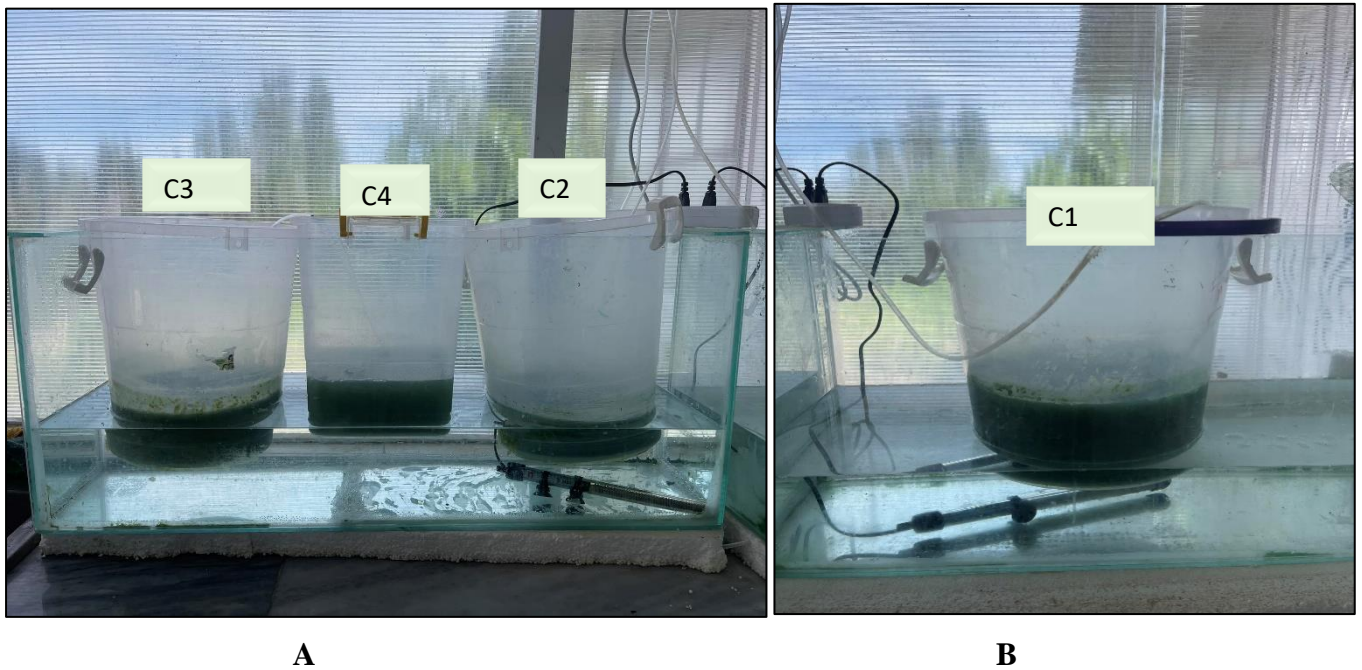


Figure III.3 : Les cultures au 2^{ème} ensemencement (A : C2, C3 et C4 ; B : C1).

Un 3^{ème} ensemencement a eu lieu après le 18^{ème} jour du deuxième. Les deux cultures C2 et C3 ont été regroupées dans un même récipient de volume d'environ 20 l (**Figure III.4**).

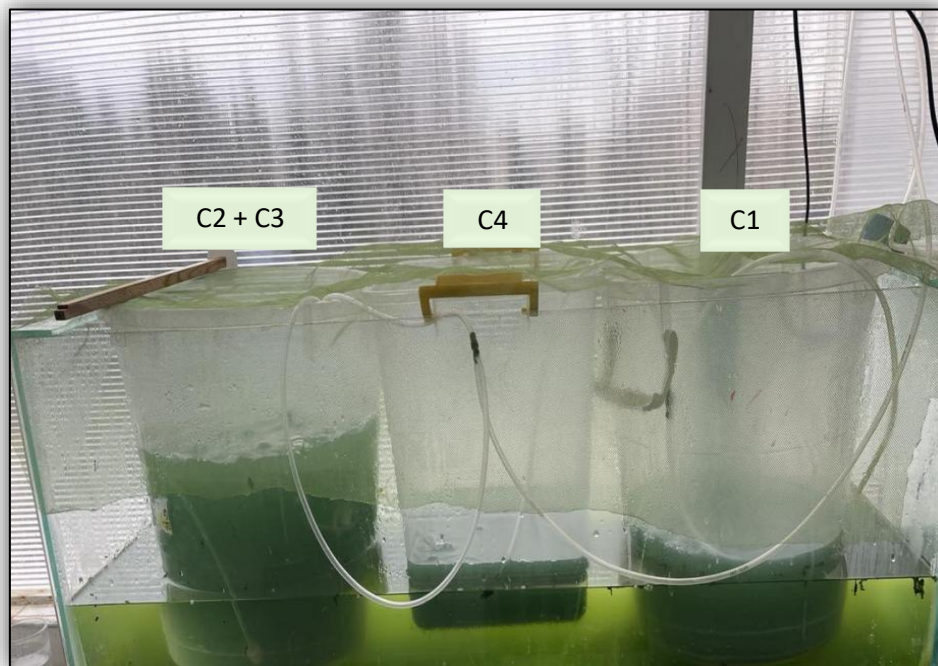


Figure III.4 : Disposition des cultures au 3^{ème} ensemencement

Lors des trois ensemencements, aucune contamination ou perte de spiruline n'a été enregistrée ; étant donné que les quatre volumes appartiennent à la même souche et ont été cultivés dans les mêmes conditions.

3- Évolution du développement algal :

3-1 Observation macroscopique :

La culture était d'une couleur vert foncé (**Figure III.5**), spécialement avant chaque ensemencement. L'observation de la couleur revêt une importance capitale pour l'évaluation de l'état de santé de la culture comme indiqué dans le **Tableau III.2**.



Figure III.5 : Couleur de la Culture de spiruline (vert foncé) avant chaque ensemencement

Tableau III.2 : Diagnostic basé sur la couleur de la culture (**Fox, 1999**).

Couleur de la culture	Bleu Vert foncé	Vert	Jaunâtre	Jaunâtre + écumé	Jaunâtre + grisâtre	Incolore
Diagnostic	Culture ombragée	Forte lumière Culture encore bonne	Forte Lumière Photolyse	Lyse exo-polysaccharide	Contamination bactérienne	Culture précipitée ou dévorée par des prédateurs

3-2 Suivi des paramètres physico-chimiques :

Les conditions optimales d'une culture de micro-algues (la spiruline) ont été déterminées par la mesure des paramètres physiques pour le suivi de son développement.

Les moyennes des paramètres physico-chimiques des quatre contenants (**Annexe 6**) ont été calculées puis présentées dans les graphes ci-après.

3-2-1 Température :

La **Figure III.6** montre les variations moyennes des températures enregistrées pendant la période de la culture.

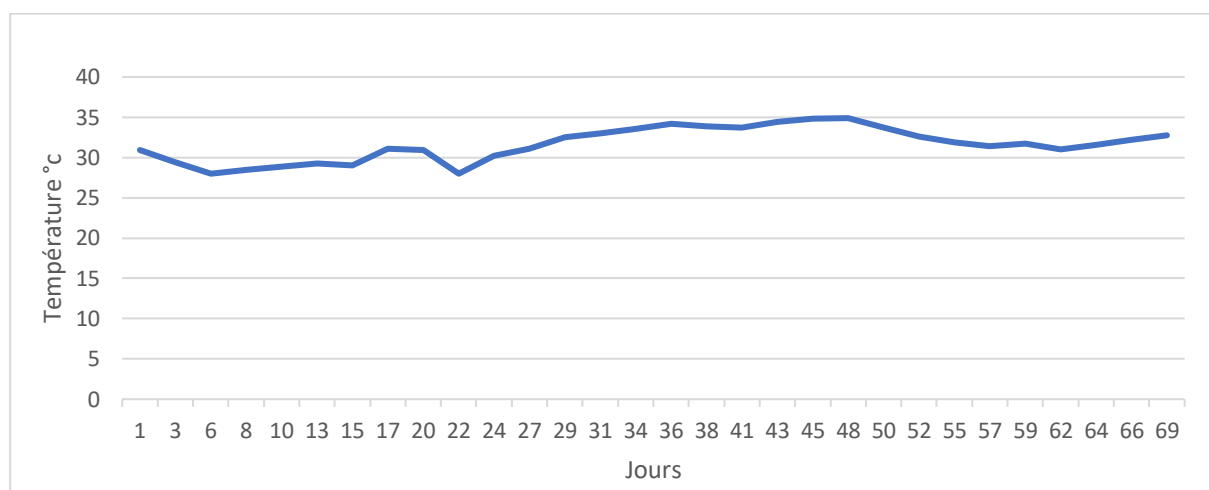


Figure III.6 : Évolution de la température de la culture.

À noter que durant toute la période de culture, les résistances ont été placées directement dans les aquariums et ont été réglées à une température de 31°C.

Selon le graphe de la **Figure III.6**, les valeurs se situent dans une fourchette entre :

- Un minimum de 28,0°C enregistré le 6^{ème} et 22^{ème} jour de la culture.
- Un maximum de 34,9°C enregistré le 48^{ème} jour de la culture.
- Une moyenne générale de $31,6 \pm 2,1$ °C

On remarque une différence entre les valeurs de la température de culture, avec un écart de 2,1 ; cette variation est liée à la température des bains-marie et à celle de l'air dans la ferme.

À partir de 1^{er} jour (30/01/2023) jusqu'à 29^{ème} jour (27/02/2023), les températures étaient comprises entre 28 et 32°C ; après, on observe une légère augmentation pour la suite de la

période de la culture, mais reste proche de l'intervalle recommandé par **Belay (2007)** ; entre 35° et 38 °C pour une production optimale ; mais sont considérés acceptables comme pour les résultats de **BERGOUG & RACHED (2022)** et **AIT OUAMER & BOUAZIZ (2021)**. Ces valeurs ont été suffisantes pour favoriser le bon développement de la culture.

3-2-2 pH :

La **Figure III.7** représente les valeurs de pH mesurés durant la période de la culture.

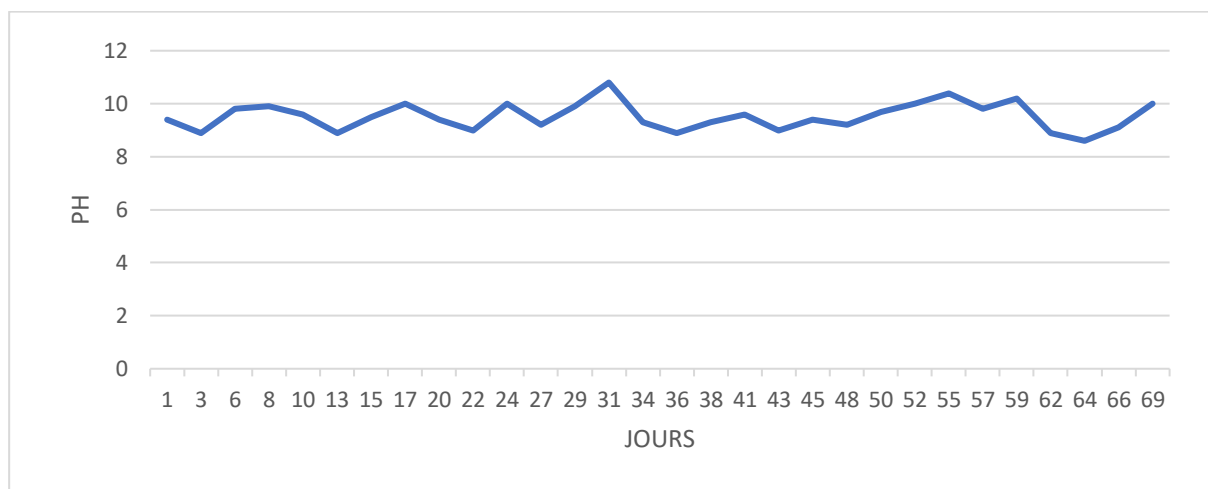


Figure III.7 : Évolution du pH de la culture

Les valeurs de pH mesuré variaient entre un minimum de 8,6 (64^{ème} jour) et un maximum de 10,8 (31^{ème} jour) avec une moyenne générale de 9,52.

On remarque qu'elles sont presque toutes proches (8,9 ; 9,4 ; 9,9 ...) avec un écart type faible de l'ordre de 0,5 ; cette fluctuation du pH est due à l'évaporation de la culture probablement causée par la température dans le bain-marie.

3-2-3 Salinité :

La **Figure III.8** montre la variation de salinité enregistrée durant la période de la culture.

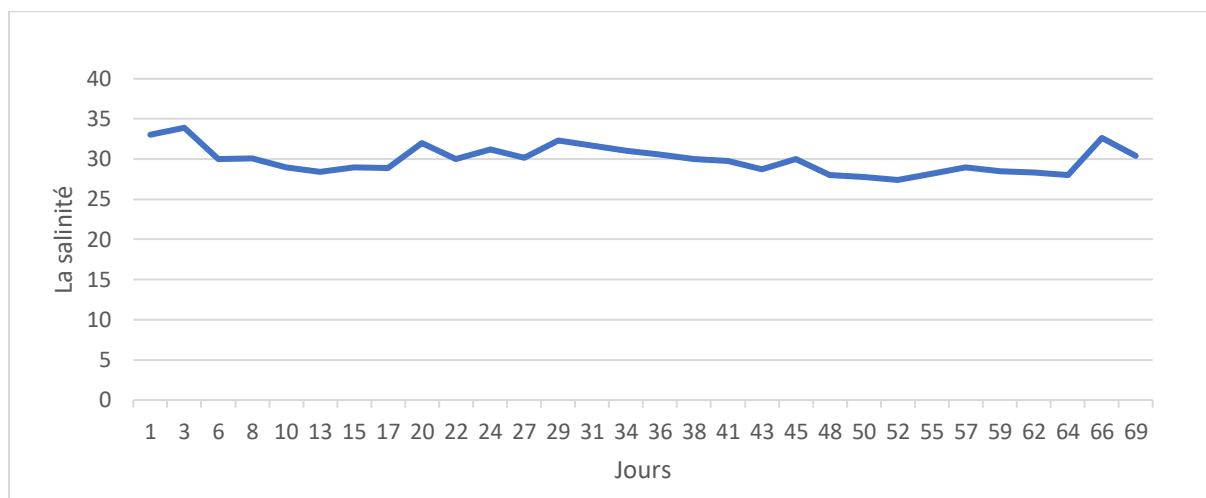


Figure III.8 : Évolution de la salinité de la culture

D'après ce graphe, les valeurs de la salinité enregistrées sont comprises entre un minimum de 27,4 g/l (52^{ème} jour) et un maximum de 33,9 g/l (2^{ème} jour), en moyenne 29,9 g/l avec un écart estimé à 1,7.

Une augmentation régulière observable des valeurs de la salinité (J1 : 33,9 g/l /J29 : 32,3 g/l/J45 : 30 g/l) due à la réalisation des ensemencements (ajout de milieu de culture riche en sels nutritifs).

4-Observation microscopique de la spiruline cultivée :

Les observations microscopiques réalisées durant cette expérience (1 fois par semaine) nous ont permis de constater l'état d'avancement de la culture, de surveiller la morphologie de la spiruline (**Figure III.9**) ; et aussi, de détecter des contaminations pouvant affecter sa qualité microbiologique.

Selon les observations microscopiques de la culture de spiruline et la courbe de **Salomez (2009)**, notre culture a présenté une continuité lors des ensemencements et a traversé les trois phases successives (**Figure III.10**) en fonction de la concentration des filaments de spiruline.

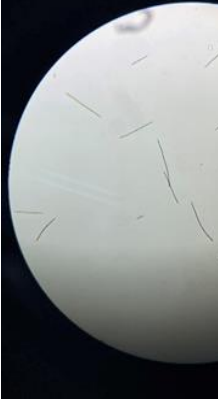



<p>Observation microscopique G (x100)</p>				
<p>La signification</p>	<p>Culture de spiruline a faible concentration</p>	<p>Concentration moyenne de spiruline</p>	<p>Forte concentration de spiruline</p>	<p>Très forte concentration de spiruline</p>
<p>Phase de division cellulaire</p>	<p>Phase de latence</p>	<p>Phase de croissance exponentielle</p>	<p>Phase de croissance exponentielle</p>	<p>Phase stationnaire</p>

Figure III.9 : Aspects microscopiques des filaments de spiruline indiquant ses phases de croissance

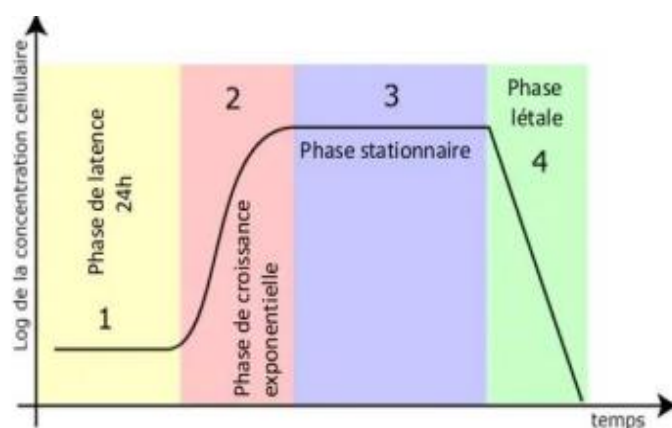


Figure III.10: Courbe de croissance des micro-algues (Salomez, 2009).

5-Récolte et séchage :

La texture de la biomasse recueillie nous renseigne sur l'état de santé de la culture de spiruline. Une culture récente offre une biomasse facile à récupérer, car elle s'agglomère bien, tandis qu'une culture plus ancienne ou en mauvais état produit une pâte très liquide contenant une grande quantité d'eau (**Zarrouk, 1966**).

Après filtration, la spiruline a été facilement récupérée de la toile synthétique ; puis, séchée et broyée (**Figure III.11**).

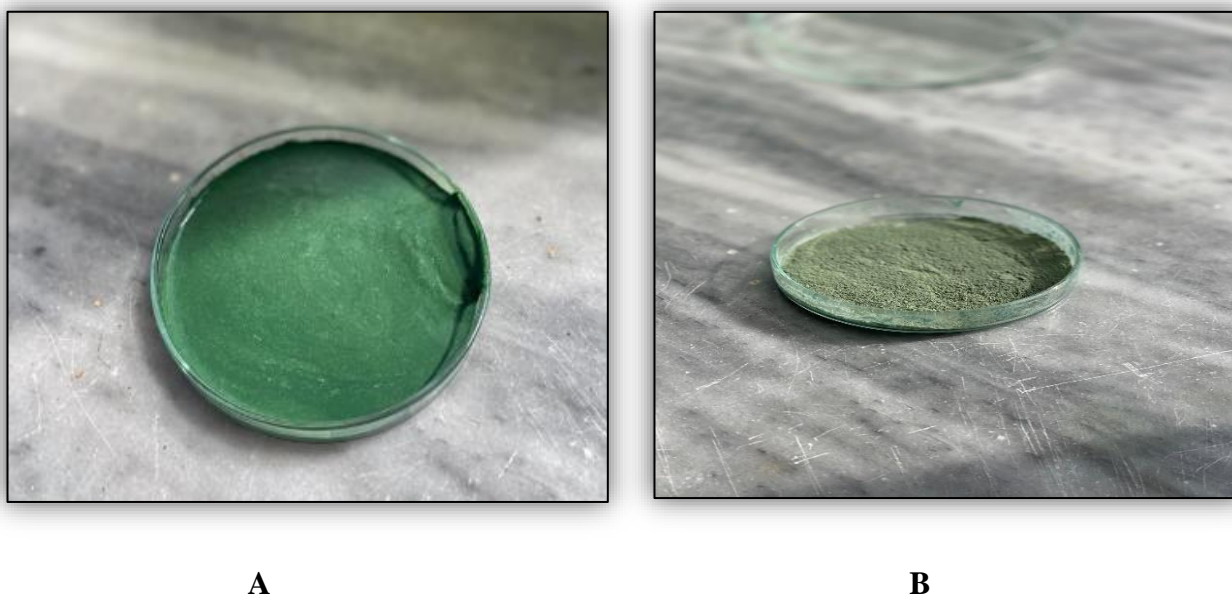


Figure III.11 : Spiruline récoltée (A) et séchée (B)

À partir du 10^{ème} jour après le 3^{ème} ensemencement, la culture qui a montré un niveau inférieur à trois dans le disque de secchi a été récoltée. La productivité de la biomasse de spiruline par unité de volume était de 1,05 g/l, dans le contenant C4. Dans l'ensemble des contenants, la quantité de biomasse d'*Arthrospira platensis* était comprises entre 0,4 et 1,4 g/l. Comme résultats documentés, la valeur 1,3 g/l a été obtenue par **Jarisoa (2005)** tandis que **Zarrouk (1966)** a enregistré une valeur de 1,2 g/l.

6- Analyses microbiologiques :

Toutes les analyses microbiologiques ont été réalisées au niveau du laboratoire de microbiologie de ENSSMAL, comme prévu. Les résultats de recherche de chaque germe sont donnés ci-après et comparés aux seuils de référence selon **AFSSA (2007)**.

6-1- Flore mésophile aérobie totale :

-Lecture :

Les colonies sont présentées sous forme lenticulaire en masse, observées dans les boîtes ayant 30 à 300 colonies dénombrables.

- Caractéristiques macroscopiques :

La forme des colonies de la FMAT obtenues sur les boîtes de pétri est lenticulaire en masse, de petite taille et de couleur blanchâtre (**Figure III.12**).



Figure III.12 : Aspect macroscopique des colonies FMAT

Le nombre de germes par gramme (N) de produit est obtenu selon la formule suivante (JORA, 2014) :

$$N = \frac{\Sigma C}{V (n1 + 0.1 n2) \times d}$$

N= nombre de germes par gramme de produit.

ΣC = somme des colonies caractéristiques sur les deux boites retenues.

V= volume de l'inoculum appliqué à chaque boite (en ml).

d= taux de dilution correspondant à la première dilution retenue.

n1= nombre de boites lu à la 1^{ère} dilution.

n2= nombre de boites lu à la 2^{ème} dilution.

6-2 Coliformes thermo-tolérants :

-Lecture :

Ces coliformes apparaissent en masse sous forme de petites colonies de couleur rouge et foncé de 0,5 mm de diamètre, ou plus et parfois entourées d'une zone rougeâtre due à la précipitation de sels biliaires.

Le nombre de colonies dans une boîte dénombrable doit être compris entre 30 et 300.

- Caractéristiques macroscopiques :

Aucune colonie caractéristique des coliformes n'est apparue dans les boîtes.

6-3 Staphylocoques :

- Lecture :

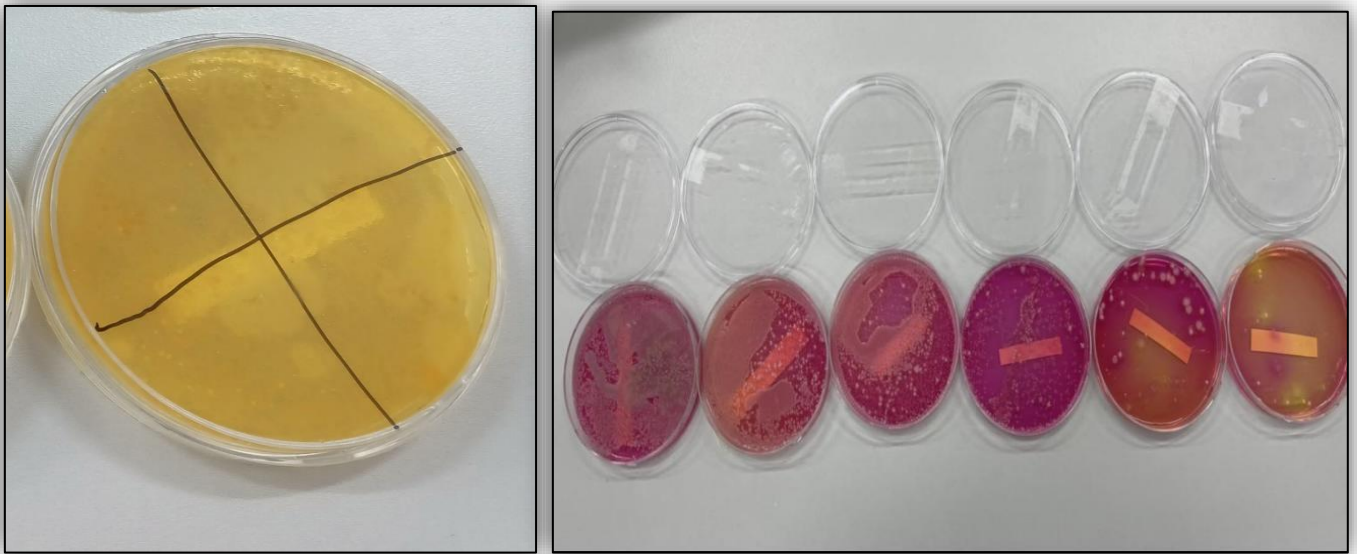
Les colonies de *Staphylococcus aureus* apparaissent sur le milieu Baird-Parker de couleur noir brillant avec une bordure blanche et mince, entourée d'un halo clair.

Les boîtes considérées positives doivent présenter les aspects suivants :

- Sur gélose Baird-parker : des colonies rondes de couleur jaune.
- Sur gélose Chapman : des colonies rondes blanchâtres.

- Caractéristiques macroscopiques :

Absence de colonies noires brillantes entourées d'un halo jaune clair sur milieu Baird-Parker dans la boîte de Pétri (**Figure III.13**), qui peuvent indiquer la présence de *Staphylococcus aureus*.



A

B

Figure III.13 : Résultats d'observation sur milieu Baird-Parker (A) et de confirmation sur milieu Chapman (B)

Les tests de confirmation (catalase et coagulase) ont révélé les résultats suivants :

- Dans le test de catalase, après l'ajout de l'eau oxygénée, il n'y a pas eu d'effervescence donc absence de *staphylococcus aureus*
- Dans le test de coagulase, il n'y a pas eu de coagulation dans le tube ensemencé à partir des boîtes Chapman.

6-4 Anaérobies sulfito-réducteurs :

-Lecture :

L'apparition de colonie de couleur noire indique la présence des ASR, toute colonie noire de 0,5 mm de diamètre pouvant aller jusqu'à 5 mm, est dénombrée

-Caractéristique macroscopique :

Les spores des ASR ont été absentes dans tous les tubes (**Figure III.14**).

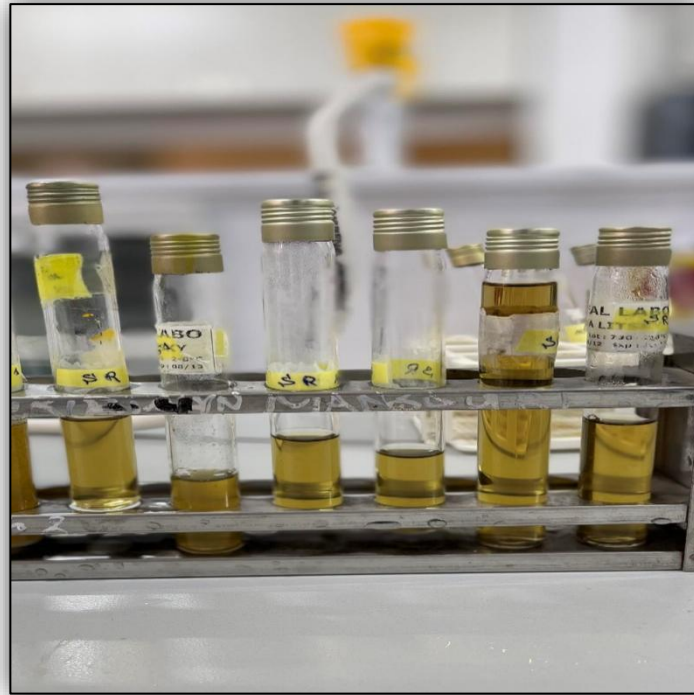


Figure III.14 : Aspect des tubes après ensemencement et incubation pour la recherche des anaérobies sulfito-réducteurs

6-6 - *Listeria monocytogenes* :

-Lecture :

Les colonies de *Listeria* apparaissent sous forme gris verdâtre luisants, de 1 mm de diamètre environ, entourées d'un halo brun-noir. Après 48 heures, le diamètre devient de 2 mm, les colonies sont incrustées dans la gélose et présentent une dépression centrale

-Caractéristique macroscopique :

Absence des colonies gris verdâtre luisantes, entourées d'un halo brun noir.

6-7-Salmonelle :

La recherche de salmonelle n'a pas pu être réalisé par manque de quantité de spiruline

6-8-Levures et moisissures :

- Lecture :

Colonies à aspect velouté, de couleur blanche ou pigmentée de grandes tailles, les moisissures se distinguent des levures par leur morphologie, car elles ont un aspect duveteux.

-Caractéristiques macroscopiques :

Les moisissures apparaissent sous forme duveteuse tandis que les levures prennent une forme de petites colonies de formes rondes et une couleur blanche (**Figure III.16**).

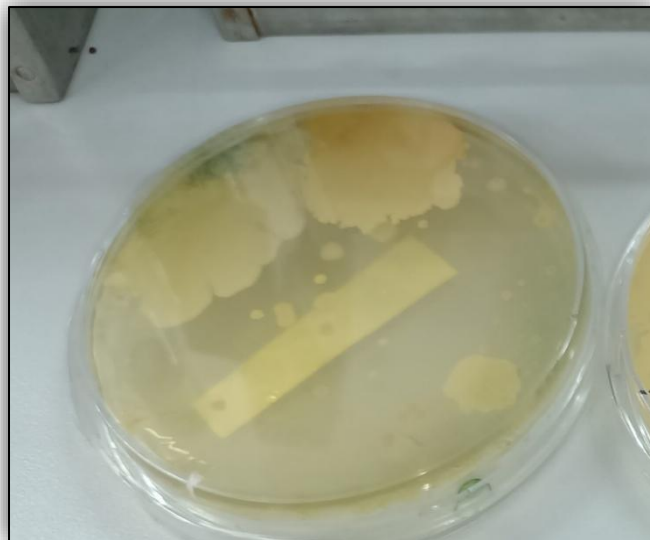


Figure III.15 : Résultats de recherche des moisissures et des levures sur milieu sabouraud.

Dans le **Tableau III.3**, une synthèse des résultats d'analyses microbiologiques pour la détection des germes recherchés comparés aux seuils de référence selon **AFSSA (2007)**.

Tableau III.3 : Résultats des analyses microbiologiques de la spiruline.

Germes recherchés	Résultats, UFC/g	Normes françaises (AFSSA, 2007), /g
Flore mésophile aérobie	189	<100 000
Coliformes thermotolérants	Absence	<10
Staphylococcus aureus	Absence	<100
Anaérobies sulfitoréducteurs	Absence	<100
Levures et moisissures	<20	<100
Listeria monocytogenes	Absence	<100

Les analyses de la qualité microbiologique de la spiruline montrent l'absence des germes pathogènes, cela s'explique par les conditions de cultures extrêmes (pH = 9,5 ; Salinité = 29,9) qui ne favorisent pas leurs proliférations.

Toutefois, nous avons observé la présence de la flore mésophile totale et des levures et moisissures mais qui reste au-dessous des seuils limites autorisés.

Ces résultats sont semblables à ceux obtenus par **Aouir (2007)** et par **Lounici (2010)**, ayant utilisés la même souche de spiruline avec le même mode de culture, indiquant l'absence de germes pathogènes dans des échantillons de spiruline séchée.

Conclusion

Après des siècles de consommation, la spiruline a acquis une réputation de superaliment en raison de ses nombreuses propriétés uniques, tant sur le plan nutritionnel que sur le plan thérapeutique. Ce travail s'est concentré sur la description approfondie de tous les aspects biologiques de l'*Arthrospira platensis*, incluant sa morphologie, sa taxonomie, son cycle biologique et son écologie. Grâce à cette description détaillée, nous avons pu observer son adaptation exceptionnelle à des environnements extrêmement variés et souvent hostiles en termes de température, d'alcalinité et de salinité élevées.

Les analyses nutritionnelles documentées révèlent que la spiruline présente des concentrations élevées de nutriments et d'oligo-éléments qui sont bénéfiques tant pour les êtres humains que pour les animaux.

Nous avons effectué une culture à petite échelle au niveau de la ferme expérimentale de l'ENSSMAL, dans le but d'améliorer les conditions de culture et de surmonter les divers obstacles tels que la contamination, il est essentiel de maîtriser les méthodes de séchage et de conditionnement de la spiruline, ainsi que l'appréciation de leur qualité microbiologique par le dénombrement des germes suivants : FTAM, coliformes, *Staphylococcus aureus*, anaérobies sulfite-réducteurs, flore fongique.

Les résultats obtenus mettent en évidence que la gestion optimale des paramètres physico-chimiques tels que la température, le pH et la salinité, ainsi qu'un climat chaud, sont des facteurs essentiels pour garantir une rentabilité satisfaisante.

Les analyses ont été réalisées sur un échantillon de spiruline fraîche qui est plus susceptible d'être contaminé qu'un échantillon sec ; puisque l'humidité constitue une condition favorable pour le développement des microorganismes ; mais nos résultats ont répondu aux normes et ont été similaires à ceux réalisés sur des échantillons de spiruline sèche de même type de souche

Les résultats des analyses microbiologiques ont confirmé l'innocuité de la spiruline pour les consommateurs. On témoigne l'absence de germes tels que les coliformes thermotolérants, *Staphylococcus aureus*, Anaérobies sulfite-réducteurs, *Listeria monocytogenes*, et un résultat de 189 pour les germes aérobies et < 20 pour les levures et moisissures.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

ANSES. (2012). L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. Conclusions de l'autosaisine sur la méthodologie de l'évaluation qualitative des risques liés à la présence de *Clostridium perfringens* dans les Matières Fertilisantes et les Supports de Culture. Maisons-Alfort. 18p

ANSES. (2017) AVIS de l'ANSES relatif aux "risques liés à la consommation de compléments alimentaires contenant de la spiruline." Maisons-Alfort: 2017. [En ligne] [Consulté le 20.04.2023] Disponible sur <https://www.anses.fr/fr/system/files/NUT2014SA0096.pdf>

AFSSA, (2006). Agence Française de Sécurité Sanitaire Des Aliments, *Clostridium perfringens*, Agent de toxi-infection alimentaire. 25p

AFNOR, 1984. Microbiologie alimentaire. Direction générale pour les examens pour le dénombrement de *Staphylococcus aureus*. Méthode pour le comptage des colonies NFV 08-014, 1506888, AFNOR, p.p. :113-120.

AHOUNOU, M. (2018) La spiruline : un complément alimentaire en conseil à l'officine. Enquête d'utilisation, Thèse de doctorat spécialité Pharmacie, France : La spiruline : un complément alimentaire en conseil à l'officine. Enquête d'utilisation, p.p. 1-172.

BALDE, J., (2002). Etude de la qualité microbiologique des repas servis à l'hôpital principal de Dakar. Thèse doctorale. 4-8p ; 17p ; 44p.

BOCAR KALIDOU M'BAYE, BAIDY LÔ ET EMMANUEL BASSENE. (2011). Etude quantitative de quelques pigments de la Spiruline cultivée en Mauritanie en vue d'une valorisation nutritionnelle. 5(5):p.p. 2035-2038

BELLAHCEN T.O., BOUCHABCHOUB A., MASSOUI M. ET YACHIOUI M.E. (2013). « Culture et production de *spirulina platensis* dans les eaux usées domestiques », LARHYSS J. ISSN, no 14.p.p. 1112- 3680

BOUDAUD S. (2016) : L'incorporation de la spiruline sur les qualités nutritionnelles, organoleptiques et technologiques du couscous artisanal. Mémoire de master en Technologie des industries agro-alimentaires. Tlemcen, Université Abou Bekr Belkaid- p.p.112- 120

BENAISSA A., 2011. Étude de la qualité microbiologique des viandes cameline et ovine conservées selon différents modes. Ouargla. Université Kasdi Merbah. Mémoire de magister :141 p

COSSART, P. (2011). Illuminating the landscape of host–pathogen interactions with the bacterium *Listeria monocytogenes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(49), p.p.19484-19491.

CHARPY, L., LANGLADE, M. J., & ALLIOD, R. (2008). La Spiruline peut-elle être un atout pour la santé et le développement en Afrique.marseille. Rapport d'expertise pour le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche. 67p

CIFERRI, O. 1983. Spirulina, the edible organism. *Microbiological. Rev.* 47: p.p.551-578.

CULOT,A. (2017) Optimisation de la production de Spiruline en biofilm par construction d'une communauté microbienne. Université de rennes. 39 p

CHRISTOPHE HUG & DENIS VON DER WEID (2011).La spiruline dans la lutte contre la malnutrition.Geneve.30p

DELARRAS C., 2007. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Edition. Lavoisier: Tec & Doc. Paris : 463 p.

DENG,R., CHOW,T.J (2010) Hypolipidemic, Antioxidant and Antiinflammatory Activities of Microalgae *Spirulina* cardiovascular therapeutics [28\(4\): e33–e45.](#)

ELYAH. A (2003) "Quel avenir pour la spiruline ?", Desta promotion, [En ligne] [Consulté le 10/02/2023]. Disponible sur le web :

http://data0.eklablog.com/acdnm/perso/doc%20a%20telecharger/26_biblio_spiruline.pdf

EL MARNISSI B., BENNANI L., EL OULALI LALAMI A., AABOUCH M., BELKHOUS R. (2012). Contribution à l'étude de la qualité microbiologique des denrées alimentaires commercialisées à Fès-Boulemane. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.* 6(1) : p.p. 98-117

FALQUET, J., HURNI, J. P. (2006). Spirulina, Nutritional Aspects. Antenna Technologies, Geneva.

FALQUET J (1996) Spiruline, Aspects Nutritionnels. Antenna Technologies. 22 p.

FALQUET, J., & HURNI, J. P. (1986). Spiruline: aspects nutritionnels. Flamant vert.

FDA BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL. (2016). Chapter 12: Staphylococcus aureus. [En ligne][Consulté le 14.05.2023] Disponible sur le web :<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-12-staphylococcus-aureus>

FOX, D., (1999). « Spiruline: technique pratique et promesse », Aix en Provence : Edi. Sud, p246.

GUIRAUD J., GALZY P., 1980. L'analyse microbiologique dans les industries alimentaire.Edition. L'Usine Nouvelle : 239 p.

HASSAN, R., ABDULLAH, S., & RADU, S. (2015). Prevalence and Risk Factors of Clostridium perfringens in Meat and Meat Products: A Review. International Journal of Food Science, 203p. doi: 10.1155/2015/675808.

HUDSON B.J.F. KARIS I.G., 1974. The lipids of the Alga Spirulina Bull, tell. 12p.

ISO 6888-2/A1:2003, Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (Staphylococcus aureus et autres espèces) — Partie 2: Méthode utilisant le milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène — Amendement 1: inclusion des données de fidélité

IZQUIERDO, M. S. (2011). Reproductive performance of gilthead seabream (*Sparus aurata* L., 1758) fed two combined levels of carotenoids from paprika oleoresin and essential fatty acids. Aquaculture Nutrition, 17(3), p.p.304-312

ILTIS, A. (1974). Le phytoplancton des eaux natronées du kanem (Tchad). Influence de la teneur en sels dissous sur le peuplement algal. 407p

JOURDAN, J. P (2006) Cultivez votre spiruline. Edt. Antenna Technologie: 146p. [En ligne] [Consulté le 09/02/2023].Disponible sur le web : https://antenna.ch/wp-content/uploads/2017/04/Manuel_Cultivez_votre_spiruline_REVISION_2013.pdf

JOURDAN, M., MINÁR, J., BRAUN, J., KRONENBERG, A., CHADOV, S., BALKE, B., & KLÄUI, M. (2014). Direct observation of half-metallicity in the Heusler compound Co₂MnSi. Nature communications, 5(1), p.p.1-5.

JARISOA, T. (2005). Adaptation de la spiruline du sud de Madagascar a la culture en eau de mer. Mise au point de structures de production a l'échelle villageoise. Université de Toliara. 172p

JORA (Journal officiel de la République algérienne). (2014). Arrêté ministériel N°68 du 21 Mai 2014 : rendant obligatoire la méthode de dénombrement de staphylocoques à coagulase positif (*Staphylococcus aureus* et autres espèces), 17p.

JORA. 2016. Arrêté ministériel N° 63 du 25Aout 2016 : rendant obligatoire la méthode de préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique des produits autres que les produits laitiers, les produits carnés et les produits de la pêche, 21p.

KUMAR, M., KULSHRESHTHA, J., SINGH, G.P.(2011), Growth and bio pigment accumulation of cyanobacterium spirulina platensis at different light intensities and temperature. Brazilian Journal of Microbiology, 42(3), p.p.1128–1135.

LE LOIR Y., BARON F., GAUTIER M. 2003. Staphylococcus aureus and food poisoning. Genet Mol Res 2(1) : p.p.63-76

MANET, A. (2016). La spiruline : indications thérapeutiques, risques sanitaires et conseils à l'officine (Doctoral dissertation, Thèse présentée pour l'obtention du titre de Docteur en pharmacie, Diplôme d'état). [en ligne] [consulté le 14.02.2023] Disponible sur le web :

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01346709/document>

NIANGORAN N'GORAN URBAIN FLORENT. (2017). Optimisation de la culture de la spiruline en milieu contrôlé : éclairage et estimation de la biomasse. Université Toulouse 3 Paul Sabatier. p.p. 1-176

PIERLOVISI, C. (2007). L'homme et la spiruline, un avenir commun? Composition chimique, intérêts alimentaires et activités biologiques (Doctoral dissertation) 66p

PANDEY, J.P., PATHAK, N., TIWARI, A., (2010), Standardization of pH and light intensity for the biomass production of *Spirulina platensis*. Journal of Algal Biomass Utilization, p.p.93-102.

SPERBER W. H. & DOYLE M. P. 2009. Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages, food microbiology and food safety. Springer Science & Business Media, New York. 380p

SCABINI, V., FERNANDEZ- PALACIOS, H., ROBAINA, L., KALINOWSKI, T., & SONI, R. A., SUDHAKAR, K., & RANA, R. S. (2017). Spirulina From growth to nutritional product: A review. Trends in food science & technology, p.p.157-171

SARRA, B., AMEL, D. , LYNDA ,B., HUSSEEN,M. , ILARIA,P. , KADDOUR,B. , ALI,K. AND ASMA,B. (2015).The nutritional quality of Spirulina platensis of Tamanrasset, Algeria p.p.1649-1654.

SELMI, C., LEUNG ,P., FISCHER, L., GERMAN,B., YANG C.Y ,KENNY T.P , GERSHWIN ,M. (2011). The effects of Spirulina on anemia and immune function in senior citizens 8(3):p.p.248-54.

TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., & CASE, C.L. (2015). Microbiology: An Introduction, 12th Edition. Pearson Education, Inc.

TODAR, K. (2009). Listeria monocytogenes: The Bacterium, Pathogenesis, and Laboratory Diagnosis. University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology.75p.

VONSHAK, 2002. Spirulina platensis: physiology, cell-biology and biotechnology.

VICAT, J, P., DOUMNANG, J, C., NDJADODE, N., GUIDEAL, R., BELLION, Y. (2016) Teneurs en éléments majeurs et traces de spirulines (*Arthrospira platensis*) originaires de France, Madagascar, Inde, Costa Rica et Equateur.4:2, p.p.292-298

WU, Q., LIU, L., MIRON, A., KLÍMOVÁ, B., WAN, D., & KUČA, K. (2016). The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of Spirulina: an overview. Archives of toxicology, 90(8), p.p.1817-1840.

ZARROUK C. (1966). Contribution à l'étude d'une cyanophycée: Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de Spirulina maxima. Thèse de Doctorat, Université des Sciences de Paris, France,96p

ANNEXES

Annexe 1 :

Préparation des dilutions décimales :

La préparation de la solution mère a impliqué de peser 25 g de spiruline de manière aseptique à l'aide d'une balance de précision, l'ajout 225 ml de solution physiologique et l'homogénéisation du contenu pendant 5 minutes. Ensuite la solution a été récupérée dans un flacon ou un bécher stérile en respectant des conditions d'asepsie strictes.

À l'aide d'une pipette pasteur stérile, 1 ml de la dilution 10^{-1} (Solution mère) précédente a été prélevé et introduit dans un tube contenant 9 ml de solution physiologique.

le tube a été agité manuellement pour rendre la dilution homogène obtenant ainsi une dilution de 1/100ème ou 10^{-2} . la pipette utilisée a été jetée après usage.

des dilutions successives ont été réalisées jusqu'à la dilution 10^{-6} .

Annexe 2 :

Protocoles des analyses microbiologiques :

Recherche de la flore mésophile aérobie totale :

Aseptiquement, 0.1 ml de chaque dilution décimale allant de 10^{-1} à 10^{-6} ont été introduits dans deux boîtes de pétri stériles et vides

Environ 15 ml de gélose nutritive ont été ajoutés, puis des mouvements circulaires en forme de 8 ont été réalisés pour permettre à l'inoculum de se mélanger avec la gélose

Les boîtes de pétri ont été laissées à solidifier sur la paillasse près des becs bunsen allumés, puis une deuxième couche de la même gélose a été ajoutée.

Les boîtes de pétri ont été incubées à l'envers à 30°C pendant 48 heures.

Recherche des coliformes thermotolérants

0.1 ml de chaque dilution (10^{-1} , 10^{-2} ... 10^{-6}) a été prélevé etensemencé dans des boîtes de pétries stériles.

Environ 15 ml de gélose désoxycholate à 1‰ fondue et refroidie ont été ajoutés, puis des mouvements circulaires ont été effectués pour permettre le mélange de l'inoculum avec la gélose.

Après refroidissement, les boîtes ont été incubées à 44°C pendant 24 h.

Recherche des staphylocoques

À l'aide d'une pipette stérile 0.1ml des dilutions a été déposé à la surface de la gélose baird-parker préalablement fondue et refroidie.

Un râteau a été réalisé avec une pipette pasteur

L'inoculum a été étaler avec le râteau

Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 48 h.

Test de catalase :

- Une colonie a été prélevée à l'aide d'une anse de platine et déposé sur une lame.
- A l'aide d'une pipette pasteur, une goutte d'eau oxygénée (= peroxyde d'hydrogène) a été mise sur la colonie.

Test de coagulase :

- Mettre du plasma dans un tube à essai, y ajouter la colonie
- Le tube a été bien agité puis incubé à 37°C pendant 24h.

Recherche des anaérobies sulfite-réducteurs :

1 ml de chaque dilution décimale a été déposé dans un tube à essai.

Les tubes à essai ont subi un chauffage à 80°C au bain-marie pendant 10 mins puis ils ont été refroidis sous un jet de robinet.

15 ml du milieu viande-foie ont été ajoutés aux tubes.

1 ml d'alun de fer, 1 ml de sulfite de sodium et une mince couche de paraffine ont été ajoutés.

Les tubes ont été incubés à 37 °C pendant 48h.

Recherche de *listeria monocytogenes*

À l'aide d'une pipette stérile, 0.1 ml des dilutions a été déposé dans des boîtes de pétri contenant environ 15 ml de gélose au sang.

L'inoculum a été étalé à l'aide d'un râteau

Les boîtes ont été laissées à solidifier, puis incubées à 35°C pendant 48h.

Recherche des levure et moisissure

À partir des dilutions décimales, 0.1 ml a étéensemencé aseptiquement dans des boîtes de pétrie contenant de la gélose Sabouraud.

Cette suspension a été étalée à l'aide d'un râteau stérile.

Ensuite l'incubation a eu lieu à 25°C pendant 3 à 5 jours.

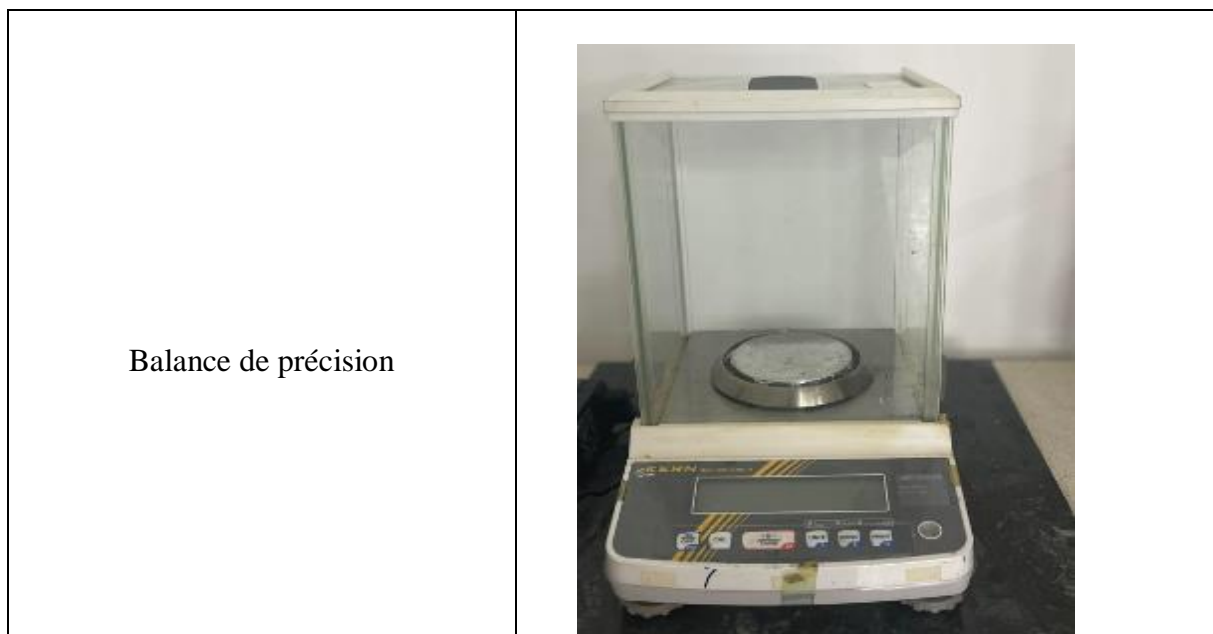
Recherche des salmonelles :

Pré-enrichissement : la solution mère à 37°C est incubée pendant 24 heures.

Enrichissement : 0.1 ml de la solution de pré-enrichissement est porté aseptiquement dans des tubes contenant 10ml de bouillon SFB Après homogénéisation, les tubes ont été incubés à 37°C pendant 18 à 24 heures L'isolement a été réalisé par ensemencement en surface sur gélose SS à partir du bouillon d'enrichissement. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24h.

Annexe 3 :

Les appareils utilisés durant l'expérience :

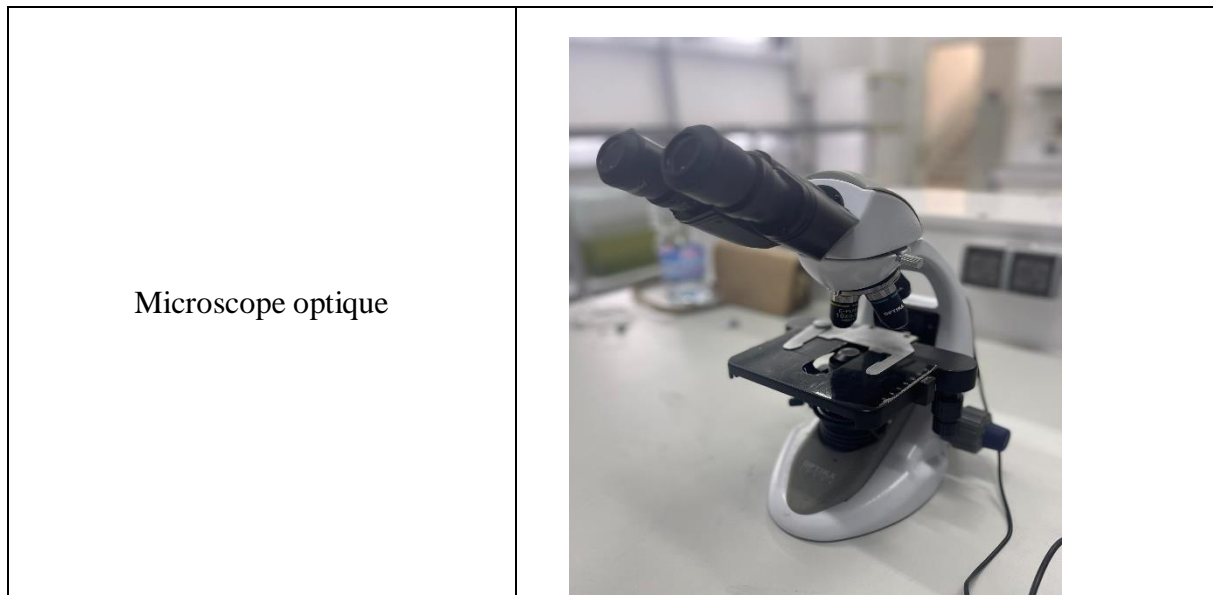


Ph mètre



Conductimètre





Annexe 4 :

Evolution des paramètres physicochimiques de la culture :

	JOURS	PH	T (°C)		Salinité (mg/l)
30/01/2023	J01	9,4	30,9		33
01/02/2023	J03	8,9	29,4		33,9
04/02/2023	J06	9,8	28		30
06/02/2023	J08	9,9	28,5		30,1
08/02/2023	J10	9,6	28,9		29
11/02/2023	J13	8,9	29,3		28,4
13/02/2023	J15	9,5	29		29
15/02/2023	J17	10	31,1		28,9

18/02/2023	J20	9,4	30,9		32
20/02/2023	J22	9	28		30
22/02/2023	J24	10	30,2		31,2
25/02/2023	J27	9,2	31,1		30,2
27/02/2023	J29	9,9	32,5		32,3
01/03/2023	J31	10,8	33		31,7
04/03/2023	J34	9,3	33,6		31
06/03/2023	J36	8,9	34,2		30,6
08/03/2023	J38	9,3	33,9		30
11/03/2023	J41	9,6	33,7		29,8
13/03/2023	J43	9	34,4		28,7
15/03/2023	J45	9,4	34,8		30
18/03/2023	J48	9,2	34,9		28
20/03/2023	J50	9,7	33,7		27,8
22/03/2023	J52	10	32,6		27,4
25/03/2023	J55	10,4	31,9		28,2
27/03/2023	J57	9,8	31,4		29
29/03/2023	J59	10,2	31,7		28,5
01/04/2023	J62	8,9	31		28,3
03/04/2023	J64	8,6	31,6		28
05/04/2023	J66	9,1	32,2		32,6
08/04/2023	J69	10,00	32,80		30,4
Ecartype		0,52	2,06		1,69
Moyenne		9,52	31,64		29,93

Annexe 5 :

Composition des milieux de cultures utilisés pour les analyses microbiologiques :

Gélose nutritive : Amidon (10g) Peptone (5g) Extrait de viande (1g) Extrait de levure. (2g) Na Cl (5g) Agar (15g) Eau distillée (1000 ml) PH=7.5	Gélose viande foie (VF) : Extrait viande –foie (30g). Glucose (2g). Amidon (2g). Gélose (12g). Eau distillée (1000ml). pH = 7,6
Gélose Baird Parker:	Sabouraud :

<p>Peptone (10,0g). Extrait de viande de bœuf (4,0g). Extrait de levure (2,0g). Pyruvate de sodium (10,0g). Glycocolle (12,0g). Chlorure de lithium 5,0g. Agar-agar (20,0g). Eau distillée (1000ml) pH = 7,2</p>	<p>Peptone de gélatine (10g). Glucose (20g). Agar (17). Eau distillé (1000ml). pH= 5.6 P</p>
<p>Gélose désoxycholate : Peptone bactériologique (10g) Chlorure de sodium (5g) Phosphate dipotassique (2 g) Lactose (10 g) Citrate ferrique (1 g) Citrate sodium (1 g) Désoxycholate de sodium (1 g) Rouge neutre (1 g) Agar (15 g) Eau distillé (1000 ml)</p>	<p>Gélose au sang : Mélange de peptone 16 g Extrait de levure 2,0 g D-glucose 0,5 g Chlorure de sodium 7,0 g Sang 50 ml Agar 12,0 g pH:7,3</p> <p>Gélose SS : Peptones (5 g) Extrait de viande de bœuf (5 g) Sels biliaires (4,2 g) Citrate de sodium (10 g) Thiosulfate de sodium (8,5 g) Citrate de fer (2 g) Lactose (10 g) Rouge neutre (0.025 g) Vert brillant (0.0003 g) Agar (12 g) pH : 7</p>

Résumé :

La spiruline du nom scientifique : "*Arthrospira platensis*" est une cyanobactérie qui a un grand intérêt thérapeutique et alimentaire grâce aux propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires de ses composants telles que les omégas3, la Vitamine E, la Phycocyanine et le B-carotène.

L'objectif de notre étude était de réaliser une culture à petite échelle et d'analyser sa qualité microbiologique après récolte. Nous avons cultivé de la spiruline dans un milieu nutritif approprié et suivi sa croissance, en tenant compte des conditions physiques et chimiques, et réalisé une récolte qui a fait objet d'analyses microbiologiques.

Les résultats d'analyses microbiologiques de la spiruline fraîche ont montré l'absence des germes pathogènes. La Flore totale a été présente mais à un taux inférieur aux indications sanitaires.

L'ère de la nutrition-santé n'en est qu'à ses débuts, l'intérêt pour la spiruline et plus généralement pour les microalgues va rapidement croître dans les années à venir.

Mots clés : *Arthrospira platensis*, Spiruline, Production de spiruline, analyse microbiologique, qualité microbiologique.

Abstract:

Spirulina, whose scientific name is "*Arthrospira platensis*", is a cyanobacterium of great therapeutic and dietary interest, due to the antioxidant and anti-inflammatory properties of its components such as omega-3, Vitamin E, Phycocyanin and B-carotene.

The aim of our study was to carry out a small-scale culture and analyze its microbiological quality after harvesting. We cultivated spirulina in a suitable nutrient solution and monitored its growth, taking into account physical and chemical conditions, and harvested it for microbiological analysis.

Microbiological analyses of fresh spirulina showed the absence of pathogenic germs. Total flora was present, but at a lower level than the health guidelines.

The era of healthy nutrition is still in its infancy, and interest in spirulina and microalgae in general will grow rapidly in the years to come.

Keywords: *Arthrospira platensis*, Spirulina, Spirulina production, microbiological analysis, microbiological quality, FMAT.

المخلص

سبيرولينا ، واسمها العلمي "*Arthrospira platensis*" ، هي بكتيريا زرقاء ذات فائدة علاجية وغذائية كبيرة ، وذلك بفضل الخصائص المضادة للأكسدة والمضادة للالتهابات لمكوناتها مثل أوميغا 3 وفيتامين إي وفيكوسيانين وبي-كاروتين. كان الهدف من دراستنا هو إجراء زراعة صغيرة وتحليل جودتها الميكروبيولوجية بعد الحصاد. قمنا بزراعة السبيرولينا في وسط غذائي مناسب وراقبنا نموها، مع مراعاة الظروف الفيزيائية والكيميائية، وحصدناها للتحليل الميكروبيولوجي.

أظهرت التحليلات الميكروبيولوجية للسبيرولينا الطازجة عدم وجود الجراثيم المسببة للأمراض. كانت النباتات الكلية موجودة، ولكن بمستوى أقل من الإرشادات الصحية.

لا يزال عصر التغذية الصحية في مهده ، وسيزداد الاهتمام بسبيرولينا والطحالب الدقيقة بشكل عام بسرعة في السنوات القادمة.

الكلمات المفتاحية : *Arthrospira platensis* ، إنتاج السبيرولينا، التحليل الميكروبيولوجي، الجودة الميكروبيولوجية.

Annexe 6 (Start-up) :

Nom du produit: *Spira Pro*

Notre projet de PFE est axé sur trois volets, visant à: **1-** produire de la spiruline dans des conditions intensives et extensives; **2-** Analyser sa composition chimique et sa qualité microbiologique et, **3-** proposer une méthode de valorisation par amélioration de la qualité protéinique d'un aliment.

Dans le cadre du 3ème volet, les formes de spiruline mises en marché actuellement, sous forme de pastilles, poudre, paillettes ne sont pas assez attractives (vendue sous forme brute, tendance à la consommer comme complément sans tenir compte de la qualité gustative)

Une fois la spiruline est produite et son innocuité est garantie, l'idée du projet est de la valoriser efficacement, par incorporation dans une boisson (jus naturel ou soupe préparée) afin d'enrichir ce produit en protéines.

Pour une meilleure utilisation de la spiruline fraîche, il était clair pour nous qu'il fallait créer un produit pour le public (ex. sportifs, personnes sous régime etc.) à base de spiruline fraîche (boisson détox énergétique, complètement naturelle à saveurs exotiques et enrichie en spiruline).

Du point de vue gustatif, la spiruline n'est pas du goût de tout le monde, mais dans un jus, son goût ne se distingue souvent plus. En plus, le fer contenu dans la spiruline est en quantité assez importante, est mieux assimilé en présence de vitamine C. Il est intéressant de produire des jus à base de fruits riches en vitamine C (ex. orange, citron, kiwi) et d'autres fruits et légumes, et de leur ajouter la spiruline fraîche, pour faire découvrir des goûts authentiques et compléter les apports nutritionnels.

On peut combler une partie de manque en éléments nutritionnels (ex. déficience en protéines) par ce jus plus riche, plus nutritif et assez savoureux.

Elle a été pensée comme un aquadrink à boire quotidiennement (snacking healthy food).

1. Étude de marché:

L'étude de marché vise à évaluer le potentiel du marché des compléments alimentaires à base de spiruline sous forme de jus. Elle examine les tendances actuelles, la demande des consommateurs, la concurrence, ainsi que les opportunités et les défis du marché.

1.1. Taille du marché et tendances:

- Le marché mondial des compléments alimentaires devrait connaître une croissance significative au cours des prochaines années, en raison de l'augmentation de la prise de conscience de l'importance d'une alimentation saine et de la demande croissante de produits naturels.
- La spiruline est de plus en plus reconnue comme une source riche en nutriments et ses bienfaits pour la santé suscitent un intérêt croissant.
- La demande de jus à base de spiruline est en hausse, car les consommateurs recherchent des solutions pratiques et faciles à intégrer dans leur routine quotidienne.

1.2. Segmentation de la clientèle:

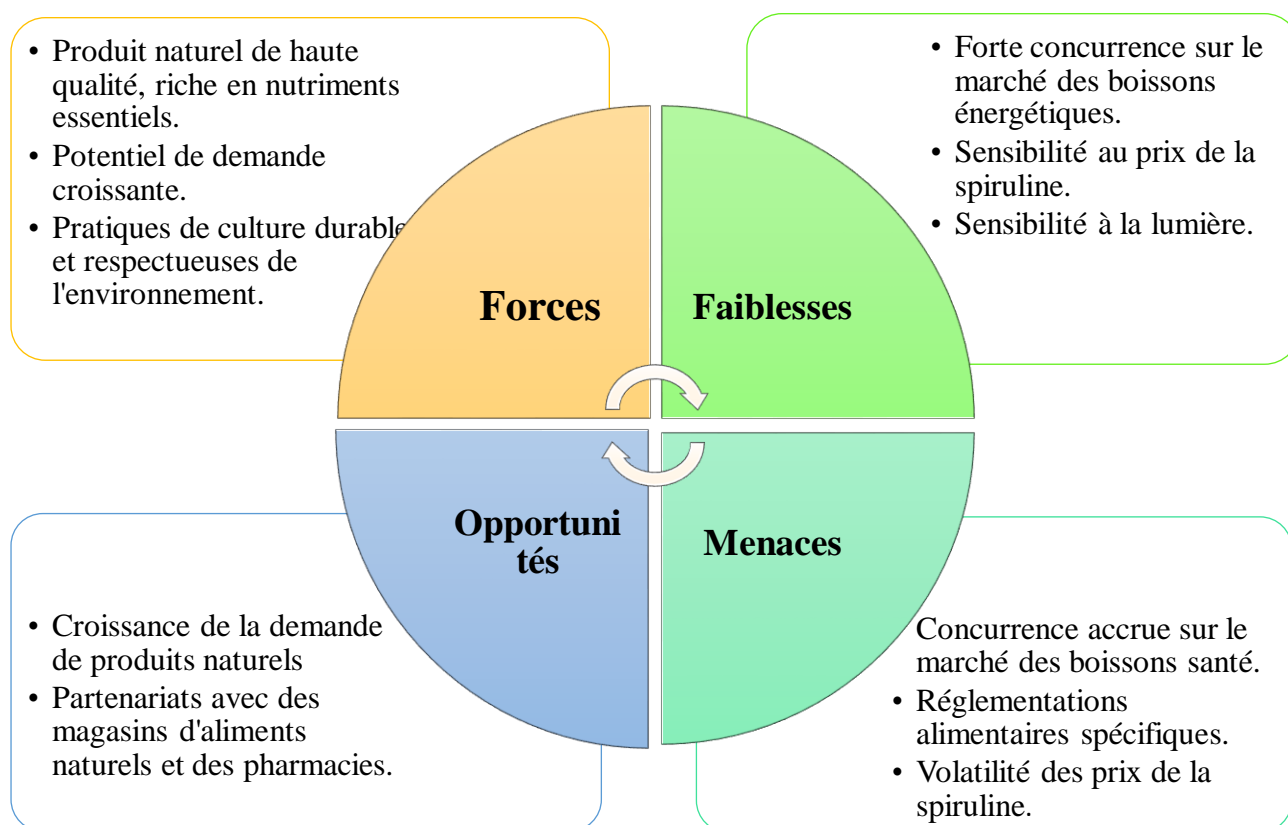
- Les sportifs et athlètes: ils sont intéressés par des compléments alimentaires pour améliorer leurs performances et leur récupération.
- Les personnes soucieuses de leur santé et de leur bien-être: elles recherchent des produits naturels pour maintenir leur santé et leur vitalité.
- Les végétariens, végétaliens et adeptes d'un régime à base de plantes: ils cherchent des sources de protéines végétales pour compléter leur alimentation.
- Les consommateurs conscients des bienfaits des aliments riches en nutriments: ils sont à la recherche de produits offrant une valeur nutritionnelle élevée.

1.3. Analyse de la concurrence:

- les principaux concurrents proposant des produits à base de spiruline:

- Spiruline fraîche, consommée directement sans séchage (et donc à proximité du lieu de production)
- Spiruline séchée, présentée en filaments, en comprimés, en poudre ou en paillette
- Spiruline « enrichie » en oligoéléments
- Spiruline ingrédients incorporée à d'autres produits alimentaires, pour faire des barres énergisantes, des crackers ou des biscuits apéritifs, ou encore des boissons (Springwave, Spiralps, smart chimp, Bloo Tonic...)

1.4. Analyse SWOT (Forces, Faiblesses, Opportunités, Menaces):



1.5. Stratégies de marketing:

- Identification des canaux de distribution appropriés tels que les sites web de commerce électronique, les partenariats avec des magasins d'aliments naturels et des pharmacies.

- Mettre en place des campagnes de marketing ciblées pour sensibiliser les consommateurs aux bienfaits de la spiruline et du jus.
- Utilisation des médias sociaux et les influenceurs pour promouvoir le produit.
- Développement des collaborations avec des professionnels de la santé pour renforcer la crédibilité du produit.

2. Les objectifs de projet:

En fonction des objectifs spécifiques du projet et des motivations de l'entreprise, voici quelques objectifs courants:

2.1. Offrir une boisson énergétique naturel et nutritif: La spiruline est reconnue pour être une source riche en nutriments essentiels tels que les protéines, les vitamines, les minéraux et les antioxydants. L'objectif principal peut être de produire un complément alimentaire de haute qualité qui offre ces bienfaits nutritionnels aux consommateurs.

2.2. Promouvoir la santé et le bien-être: La spiruline est souvent associée à des avantages pour la santé, tels que le soutien du système immunitaire, l'amélioration de l'énergie et de la vitalité, ainsi que la détoxification du corps. Le projet peut viser à fournir un produit qui contribue à la santé globale et au bien-être des consommateurs.

2.3. Répondre à la demande croissante de produits naturels: Avec l'augmentation de la demande des consommateurs pour des produits naturels et sains, le projet peut chercher à répondre à cette tendance en proposant une boisson énergisante à base de spiruline, sans additifs artificiels ni ingrédients indésirables.

2.4. Proposer une alternative végétalienne et respectueuse de l'environnement: La spiruline est une source de protéines végétales, ce qui en fait une option intéressante pour les personnes suivant un régime végétalien ou végétarien. De plus, la production de spiruline peut être réalisée de manière durable, avec une empreinte environnementale réduite par rapport à d'autres sources de protéines animales.

2.5. Créer un produit pratique et facile à consommer: L'incorporation de la spiruline dans un jus peut offrir une solution pratique pour les consommateurs qui souhaitent intégrer ce superaliment dans leur alimentation quotidienne. L'objectif peut être de proposer un produit prêt à consommer, facilement accessible et agréable à boire.

En résumé, le but d'un projet de production de la spiruline et son incorporation à un jus est généralement de fournir une boisson énergétique naturel, nutritif, sain et pratique, répondant à la demande des consommateurs pour des produits de qualité, tout en offrant les bienfaits de la spiruline pour la santé et le bien-être.

3. Business model:

Le modèle d'entreprise, en anglais business model, est la représentation systémique et synthétique de l'origine de la valeur ajoutée d'une entreprise et de son partage de la valeur ajoutée entre les différentes parties prenantes, sur une période et pour un domaine d'activité clairement identifiés.

3.1. Nos clients et qu'est ce qu'ils gagnent de notre produit:

- Les consommateurs conscients de leur santé et de leur bien-être, intéressés par les aliments nutritifs et les boissons naturelles.

3.1.1 Les personnes âgées:

- Stimulant immunitaire et énergétique
- Action anti-inflammatoire contre les raideurs musculaires
- Maintien des capacités cognitives et de la vivacité d'esprit
- Maintien de la masse musculaire : vitamine B12, acides aminés
- Apport de protéines et de vitamine B12 souvent mal synthétisée
- Vitalité de la peau et des phanères (acide gamma-linolénique apportant souplesse et élasticité; cystine, acide aminé soufré précieux pour la fabrication de la kératine, de vitamines du groupe B et de zinc)

- Les adeptes de la cuisine végétalienne et végétarienne.

3.1.2 Les végétariens:

- Excellente source de protéines (50 à 70% de son poids sec)
- Source non carnée de vitamine B12
- Apport en fer

- Les athlètes et les personnes actives qui recherchent des sources de protéines végétales de haute qualité.

3.1.3 Les Sportifs:

- Oxygénation musculaire: phycocyanine à la structure moléculaire quasi similaire à l'érythropoïétine (EPO);
- Endurance
- Prise de muscles : acides aminés, dont les 8 acides aminés essentiels
- Récupération après l'effort
- Action antioxydante
- Rééquilibrage nutritionnel avec un faible apport calorique

3.1.4 Les Conducteurs:

- Effet régulateur sur le sommeil et meilleure résistance à la fatigue (fer, vitamines, minéraux)

3.2. Proposition de valeur:

Nous produisons de la spiruline biologique de haute qualité, qui est une source de nutriments essentiels. Nous la transformons ensuite en jus frais et sain, sans additifs ni conservateurs. En Algérie, nous avons créé la première boisson détox énergétique à base de spiruline, entièrement naturelle, avec des saveurs exotiques et enrichie en spiruline.

Notre jus de spiruline est une alternative naturelle et nutritive aux boissons énergisantes et aux jus commerciaux. Il est composé de spiruline naturelle, riche en protéines, vitamines et minéraux essentiels. Il offre une bonne qualité gustative, comparable à d'autres formes de spiruline.

En plus de ses bienfaits pour la santé, notre jus de spiruline favorise la récupération musculaire et l'endurance. Il est facilement absorbable, ce qui en fait une source de nutriments idéale pour améliorer la vitalité et la santé.

Nous sommes fiers de produire notre jus de spiruline dans le respect de l'environnement, en utilisant des pratiques durables. Ainsi, vous pouvez profiter de tous les avantages de la spiruline tout en préservant la planète.

3.3. Les partenaires clés:

- Professionnels de la santé: APOCE L'organisation de protection du consommateur
- Fournisseurs de spiruline biologique ou cultivée de manière durable (Mr Hiri)
- Entreprises de logistique pour la gestion de l'approvisionnement et de la livraison; SARL DAFIL, EURL NOVODIS FOOD...
- Fournisseurs d'équipements de culture, de récolte et de transformation.

3.4. Les ressources clés:

- Terrain et installations de production pour la culture de la spiruline (serres, bassins).et la transformation en jus (extracteur de jus, mélangeur).
- Approvisionnement en spiruline de haute qualité.
- Équipe de production compétente. (Personnel qualifié pour la culture, la transformation et la gestion des opérations: microbiologiste, agent de sécurité).
- Plateforme de commerce électronique robuste pour les ventes en ligne.
- Marketing et communication efficaces pour promouvoir le produit.
- Équipements de culture, de récolte et de transformation de la spiruline.

3.5. Relations clients:

- Service clientèle réactif et attentionné pour répondre aux questions et préoccupations.
- Programme de fidélité (ex: carte de fidélité) pour récompenser les clients réguliers.
- Collecte régulière des commentaires des clients pour améliorer le produit et le service.
- Fournir des informations détaillées sur les bienfaits de la spiruline et du jus de spiruline à travers des supports en ligne, des blogs et des réseaux sociaux.

3.6. Canaux de distribution:

- Vente en ligne via un site web dédié avec livraison à domicile.
- Partenariats avec des magasins d'aliments naturels tels que la boutique du terroir Dzair, Hanout bio vente en ligne des produits bio...etc., des boutiques de suppléments et des pharmacies, supermarchés bio et aux cafés/ restaurants spécialisés dans les produits santé.
- Présence sur les plateformes de commerce électronique populaires.

3.7. Activités clés:

- Cultiver et récolter de la spiruline de haute qualité dans une installation de production adaptée.
- Transformer la spiruline en jus en utilisant des méthodes respectueuses des nutriments “la technique de pressage à froid pour préserver les nutriments”.
- Contrôle qualité rigoureux à chaque étape de la production (les analyses microbiologiques) pour garantir la pureté, l’innocuité et la sécurité du produit.
- Gestion des stocks et logistique pour assurer un approvisionnement régulier.
- Embouteiller, étiqueter et emballer le jus de spiruline.

3.8. Coûts:

- Coûts de production de la spiruline.
- Coûts d'acquisition des équipements de culture et de transformation.
- Coûts marketing et promotionnels.
- Frais généraux (bureau, assurance, licences, salaires, électricité, eau, transport).

➤ **Coût de projet : (11 450 160,00 DA)**

3.9 Revenus:

Vente directe aux consommateurs

Vente en gros.

➤ **Chiffre d'affaires : (21 780 000,00 DA)**

➤ **Résultats : (11 079 840,00 DA)**

4. L'approche économique:

4.1 Equipement principaux:

Désignation	Montant (DA)
Equipement de filtration et séchage	50000
Le coût des tuyaux et des robinets	50000
Matériel nécessaire au suivie le coût Biologique de production	150000
Congélateur	60000
Extracteur de jus	380000
Mélangeur de boissons	60000
Le coût des bassins	100 000
Les serres	200000
Montant	1 050 000

4.2 Equipement de bureau:

Designation	Nombre	Prix unitaire	Montant (DA)
Micro-ordinateur	01	70000	70000
Imprimante	01	20000	20000
Bureau	01	20000	20000
Chaises	02	15000	30000
Armoire de bureau	01	4000	8000
Equipements de laboratoire	lot	80000	80000
Montant			228000

4.3 Le coût d'investissement:

Coût		N (DA)	N+1 (DA)	N+2 (DA)
Coût (variables et fixes)	Local	50 000,00	50 000,00	50 000,00
	Électricité	500 000,00	500 000,00	500 000,00
	Eau	500 000,00	500 000,00	500 000,00
	Salaires	1 500 000,00	1 500 000,00	1 500 000,00
	Assurances	100 000,00	100 000,00	100 000,00
	Transport	100 000,00	100 000,00	100 000,00
	Marketing	50 000,00	50 000,00	50 000,00
	Matière première	8 000 000,00	00	00
	Emballage			
	Amortissements	435 600,00	435 600,00	435 600,00
		214 560,00	214 560,00	
Total		11 450 160,00	3 450 160 ,00	3 450 160 ,00

	N		N+1		N+2	
Produit	Quantité	Revenu	Quantité	Revenu	Quantité	Revenu
Bouteilles de jus	87 120	21 780 000,00	87 120	21 780 000,00	87 120	21 780 000,00
C.A (chiffre d'affaires) (DA)	-----	21 780 000,00	-----	21 780 000,00	-----	21 780 000,00
Résultats (DA)	-----	11 079 840,00	-----	11 079 840,00	-----	11 079 840,00

Business Model Canvas

Partenaires clés	Activités Clés	Propositions de valeur	Relation Client	Clients
<ul style="list-style-type: none"> • APOCE • ANADE • Fournisseurs de spiruline • Entreprises de logistique pour la gestion de l'approvisionnement et de la livraison ; SARL DAFIL, EURL NOVODIS FOOD... 	<ul style="list-style-type: none"> • La production de la spiruline • La production du jus à base de spiruline. 	<ul style="list-style-type: none"> • La première boisson en Algérie à base de spiruline, détox énergétique, complètement naturelle à saveurs exotiques et enrichie en spiruline • Source de nutriments facilement absorbables pour une meilleure santé et vitalité. • Riche en protéines, elle combine les bénéfices de la spiruline fraîche • Bonne qualité gustative comparable aux autres formes de spiruline 	<ul style="list-style-type: none"> • Participation dans les expositions. • Site web ; Service clientèle réactif et attentionné pour répondre aux questions et préoccupations. • Cartes de fidélité pour récompenser les clients réguliers. • Collecte régulière des commentaires des clients pour améliorer le produit et le service. 	<ul style="list-style-type: none"> • Les supermarchés • Les parapharmacies • Les salles de sport • Les magasins d'aliments naturels ; la boutique du terroir Dzair, Hanout bio vente en ligne des produits bio, et les pharmacies.
	<p>Ressources clés</p>		<p>Canaux de distribution</p>	
	<ul style="list-style-type: none"> • Installations de production pour la culture de la spiruline et la transformation en jus (Bassins, machine, extracteur de jus...) • Ressources humaines 		<ul style="list-style-type: none"> • Vente en ligne via un site web dédié avec livraison à domicile. • Partenariats avec des magasins d'aliments naturels, des boutiques de suppléments et des parapharmacies. • Présence sur les plateformes de 	

	<ul style="list-style-type: none"> • Matériel bureautiques (Micro, bureau...) • Local 		commerce électronique populaires.	
Coûts			Revenus	
<ul style="list-style-type: none"> • Coûts de production de la spiruline (7 550 000 DA). • Coûts d'acquisition des équipements de culture et de transformation (1 050 000 DA). • Coûts marketing et promotionnels (50000 DA). • Frais généraux (salaires, assurance, électricité ...) (2 700 000 DA). <p>➤ Coût de projet : (11 450 160,00 DA)</p>			<ul style="list-style-type: none"> • Vente directe aux consommateurs. • Vente en gros. <p>➤ Chiffre d'affaires : (21 780 000,00DA)</p> <p>➤ Résultat : (11 079 840,00 DA)</p>	

Prototype :

