

# MÉMOIRES

de l'Institut océanographique Paul Ricard



## COLLOQUE INTERNATIONAL SUR LES CYANOBACTÉRIES POUR LA SANTÉ, LA SCIENCE ET LE DÉVELOPPEMENT

*INTERNATIONAL SYMPOSIUM  
ON CYANOBACTERIA FOR HEALTH,  
SCIENCE AND DEVELOPMENT*

3-6 mai 2004

ÎLE DES EMBIEZ  
VAR, FRANCE

## PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

. **Marine Life** (créée en 1979, publiée sous le nom de *Vie marine* jusqu'en 1991).

La revue publie, en français ou en anglais, des communications relatives à la biologie, l'écologie, la gestion et la valorisation des ressources vivantes, la pollution des mers. Elle s'intéresse principalement au domaine méditerranéen, mais également aux autres mers, aux lagunes, aux secteurs littoraux, de même qu'aux agressions qui s'y manifestent. Le Comité de rédaction international est présidé par le Pr Lucien Laubier, membre correspondant de l'Académie des Sciences.

. **Mémoires de l'Institut océanographique Paul Ricard** (1992).

Cette collection édite des thèses, mémoires, actes de colloque...

### QUELQUES ÉTUDES DISPONIBLES

. **Qualité des eaux littorales.** Disparition des coliformes fécaux d'un effluent urbain en milieu marin. Étude expérimentale en pilote clos et essai de modélisation - Étude collective.

. **Impact écologique d'une pollution par hydrocarbures et de son traitement** sur les communautés microplanctoniques et bactériennes d'un écosystème marin expérimental, par Bernard Cauchi. Thèse de 3<sup>e</sup> cycle (2 vol.).

. **La glande digestive de la palourde méditerranéenne *Ruditapes decussatus* L.** Recherches ultrastructurales, cytochimiques, écophysiologicals et écotoxicologiques, par Monique Henry. Thèse de doctorat ès-Sciences (2 vol.)

. **Bilan azoté de *Dicentrarchus labrax* en cours de prégrossissement**, par Dominique Vitale-Lelong. Thèse de 3<sup>e</sup> cycle.

. **10<sup>e</sup> Colloque de l'Association des diatomistes de langue française**, Les Embiez - 25 au 28 septembre 1990.

. **Utilisation d'un nutriment oléophile associé à une bioaugmentation pour accélérer la biodégradation d'un pétrole brut en milieu marin.** Essai de modélisation, par Pascale Marty. Thèse de doctorat en Sciences. Spécialité : environnement marin (1994).

. **European Union of Aquarium curators (E.U.A.C.). Meeting in München, Salzburg and Innsbruck**, 6-12 octobre 1996.

. **European Union of Aquarium curators (E.U.A.C.). Meeting in Barcelona** - 17-22 octobre 1998.

. **Symposium international sur les mérus de Méditerranée**, Les Embiez - 5 au 7 novembre 1998.

. **L'alimentation des animaux sauvages en captivité.** 1<sup>eres</sup> Journées biologiques, Parc Phoenix, Nice - 1<sup>er</sup> et 2 avril 2004.

### OUVRAGE GRAND PUBLIC

. **Fragile Méditerranée.** Cet ouvrage dont l'Institut a assuré la direction scientifique et rédactionnelle, dresse un état sur cette *mer au milieu des terres* : l'espace naturel, les êtres vivants qui le peuplent ; l'activité humaine, ses revers ; l'exploitation des ressources vivantes ; la surpopulation,...

La dernière partie propose des éléments de réflexion dans le sens d'une gestion de l'espace naturel qui situe à leur juste place l'environnement et le développement économique (disponible à l'Institut).



**COLLOQUE INTERNATIONAL SUR  
LES CYANOBACTÉRIES POUR LA SANTÉ,  
LA SCIENCE ET LE DÉVELOPPEMENT**

*INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON  
CYANOBACTERIA FOR HEALTH,  
SCIENCE AND DEVELOPMENT*

3 - 6 mai 2004

ILE DES EMBIEZ

Région



Provence-Alpes-Côte d'Azur



**COLLOQUE INTERNATIONAL SUR  
LES CYANOBACTÉRIES POUR LA SANTÉ,  
LA SCIENCE ET LE DÉVELOPPEMENT**

*INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON  
CYANOBACTERIA FOR HEALTH,  
SCIENCE AND DEVELOPMENT*

*3 - 6 mai 2004*

ÎLE DES EMBIEZ  
VAR, FRANCE

---

**EDITEURS**

**Loïc CHARPY et Marie-josé LANGLADE**  
*Institut de recherche pour le développement  
Centre Océanologique de Marseille  
Marseille*



**Nardo VICENTE et Alain RIVA**  
*Centre d'étude des ressources animales marines  
Marseille  
Institut Océanographique Paul Ricard  
Six-Fours-Les-Plages*



Avec l'aide du Conseil Régional Provence-Alpes-Côte d'Azur  
et de Toulon Provence Méditerranée – comité d'agglomération.

INTERNATIONAL SYMPOSIUM  
« *Cyanobacteria for Health,  
Science and Development* » *CSSD*  
Ile des Embiez. 3-6 Mai

---

In name of the responsables of the Oceanographic Institute Paul Ricard, I am very happy to say you "Welcome on this Island of Embiez", a Mediterranean jewel in a blue pleasant setting.

This Island was bought by Mr Paul RICARD in 1958, and he built a paradise for nautical sports and the ecotourism.

His interest for the Sea leads him to create in 1966 a "Sea Observatory", which became the "Oceanographic Institute Paul RICARD" and in 1972 a team of searchers was formed. This team, after working on marine ecology, control of production in littoral zone, aquaculture development, now works on littoral water quality in microbiological and chemical fields, and on protection of species and sensitive spaces.

Our Symposium finds naturally its place in the preoccupation of the Institute which is the only case of corporate patronage for the Sea Sciences in Europe.

You are coming from countries of the two hemispheres to discuss about the importance of the Cyanobacteria for the Humanity. These "Blue Algae" appeared on our planet two billions years ago, are at the beginning of the oxygen production breathed by us. There are revealed useful on various fields: Scientific research, health, feeding, etc...

There are able to act on malnutrition case in various disfavoured countries on the world. This Symposium who raises convinced people, by the importance of the Cyanobacteria, will bring without doubt, new data on knowledge, behaviour, physiology and potential utilization for nutrition.

Welcome on the Embiez Island where you can enjoy a studios and lovely stay.

Pr.Nardo VICENTE  
Scientific Responsible of the Institute

## COMMUNICATIONS AU SÉMINAIRE

Discours d'ouverture : Docteur Loïc CHARPY et Professeur Nardo VICENTE

### ***Les cyanobactéries : systématique, génétique, métabolisme, toxicité.***

Cheng-Cai ZHANG	Exploration du génome Arthrospira.
Emile GAYDOU	Les constituants alimentaires des cyanobactéries.
Annick WILMOTTE	Diversité génotypique du génome Arthrospira.
Isabelle ITEMAN	Cyanobactéries et toxicité.

### ***La malnutrition***

Jacques BERGER	Stratégies de lutte contre les carences en micronutriments.
Herbert DEGDEY	Evaluation de l'efficacité de la supplémentation en spiruline du régime habituel des enfants atteints de malnutrition sévère.

### ***Cultures artisanales dans le tiers monde pour lutter contre la malnutrition : méthodes, production, problèmes, retombées pour le développement.***

Ripley FOX et Hubert DURAND-CHASTEL	Histoire de la spiruline.
Claude DARCAS	Cultures artisanales de spiruline dans le tiers-monde.

### ***Les ONG et la Spiruline***

Ravelo VOLOLONAVALONA	La spiruline à Madagascar.
Issouf AG MAHA	Exemple au Niger.
Denis VON DER WEID	La spiruline, une réponse à la malnutrition en Inde.
Michel BROUERS	Utilisation traditionnelle de la spiruline au Tchad.

### ***Production industrielle et semi industrielle***

Thomas SEBASTIAN	Production de spiruline en Inde.
François HALDEMANN	Production industrielle en Equateur.
Anibal AYALA	Production industrielle et semi industrielle de spiruline dans le tiers-monde.
Philippe CALAMAND	Production semi industrielle et humanitaire.

### ***Science et spiruline***

JIAN-HONG LI	Recherches sur les applications et fonctions cliniques de la spiruline en chine.
Amha BELAY	la spiruline peut-elle aider dans le combat contre le SIDA / HIV.
Olivier LIGNON	La production de phytoplancton : l'expérience de la société Micro Algues Provence.
Tsarahevitra JARISOA	Adaptation des souches de spiruline du sud de madagascar à la culture en eau de mer.
PHAM QUOC KIET et Hubert DURAND-CHASTEL	Nouvelle spiruline riche en sulfolipides.

### ***Avenir***

Gilles GRILLET et Claude VILLARD	La formation à l'algoculture de la spiruline.
Nardo VICENTE	Essais de culture de la spiruline au domaine de Méjanès (Camargue) de la société Ricard.
Loïc CHARPY et Marie-José LANGLADE	La recherche pour le développement et la spiruline.
J-P JOURDAN & F. HALDEMANN	Films, photos, démonstration de logiciels

### ***Tables rondes***

- 1) *Culture artisanale de la spiruline.*
- 2) *Que peut apporter la science.*

### ***Sessions Posters***

### ***Rapport final et Conclusions***



***Colloque sur les cyanobactéries  
Ile des Embiez, Var – France – mai 2004***

<b>SCIENCES Systématique, génétique, métabolisme, toxicité.....</b>	<b>5</b>
GENETIC DIVERSITY OF THE GENUS <i>ARTHROSPIRA</i> .....	7
M. WALERON <sup>1,3</sup> , K. WALERON <sup>1,3</sup> , G. DUYSSENS <sup>1</sup> , L. HENDRICKX <sup>2</sup> , M. MERGEAY <sup>2</sup> , ANNICK WILMOTTE <sup>1</sup> .....	7
EXPLORATION DU GENOME <i>ARTHROSPIRA</i> .....	12
CHENG-CAI ZHANG <sup>1,2</sup> , JIE ZHOU <sup>2</sup> , AND JU-YUAN ZHANG <sup>2</sup> .....	12
LES CONSTITUANTS ALIMENTAIRES DES CYANOBACTERIES.....	13
ÉMILE M. GAYDOU .....	13
CYANOBACTERIES ET TOXICITE .....	14
ISABELLE ITEMAN .....	14
ANTIBACTERIAL AND CELL DIVISION STIMULATION ACTIVITIES OF <i>ARTHROSPIRA PLATENSIS</i> (FILAMENTOUS CYANOBACTERIUM) EXTRACELLULAR METABOLITES.....	15
TRABELSI LAMIA <sup>1</sup> , HATEM BEN OUADA <sup>1</sup> , BROUERS MICHEL <sup>2</sup> , CHRIAA JIHEN <sup>3</sup> AND CHALLOUF RAFIKA <sup>1</sup> .....	15
PHYSIOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF SEAWATER ACCLIMATED CYANOBACTERIUM <i>ARTHROSPIRA PLATENSIS</i> .....	17
HATEM BEN OUADA <sup>1</sup> , LAMIA TRABELSI <sup>1</sup> , RYM BEN DHIAB <sup>1</sup> ET MICHEL BROUERS <sup>2</sup> .....	17
TOXICITE NON EXPRIMEE PAR LA CYANOBACTERIE POTENTIELLEMENT TOXIQUE <i>PLANKTOTHRIX AGARDHII</i> RENCONTREE DANS UN ETANG SAUMATRE MEDITERRANEEN : PRISE EN COMPTE DU RISQUE DANS LE CHOIX DES ESPECES CULTIVEES A DES FINS NUTRITIVES.....	19
NICOLAS CHOMERAT, FAYOLLE S. & CAZAUBON A.....	19
A NOVEL STRAIN OF <i>SPIRULINA</i> FROM SOUTHERN BRAZIL WITH POTENTIAL FOR CULTIVATION .....	20
MICHELE G. DE MORAIS <sup>1</sup> , FRANCIELI DALCANTON <sup>1</sup> , CAROLINA C. REICHERT <sup>1</sup> , ANDREI J. DURANTE <sup>1</sup> , JORGE A. V. COSTA <sup>1*</sup> , LUÍS F. F. MARINS <sup>2</sup> .....	20
COMMUNICATION TO THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON BACTERIOLOGICAL NOMENCLATURE.....	22
RIPLEY D. FOX.....	22
<b>SCIENCES Biotechnologie.....</b>	<b>23</b>
ADAPTATION DES SOUCHES DE SPIRULINE DU SUD DE MADAGASCAR A LA CULTURE EN EAU DE MER .....	25
TSARAHEVITRA JARISOA <sup>1</sup> , LOÏC CHARPY <sup>2</sup> , NARDO VICENTE <sup>3</sup> , MARIE-JOSE LANGLADE <sup>2</sup> .....	25
ESSAIS DE CULTURE DE LA SPIRULINE AU DOMAINE DE MEJANES (CAMARGUE).....	28
R. RAKOTOARISOA <sup>1</sup> , A. RIVA <sup>2</sup> ET N. VICENTE <sup>1,2</sup> .....	28
NOVEL AND HIGH PRODUCTIVITY PHOTOBIOREACTOR, SPECIFICALLY DESIGNED FOR THE COMMERCIAL PRODUCTION OF CYANOBACTERIUM <i>SPIRULINA</i> , GREEN ALGA <i>HAEMATOCOCCUS</i> AND OTHER PHOTOPHILIC MICROALGAE IN GENERAL.....	36
MIAO JIAN REN .....	36
<i>SPIRULINA PLATENSIS</i> BIOACTIVE COMPOUNDS ON RICE TISSUE METABOLISM .....	40
G. ZULPA, M. STORNI, M. CATALÁ, A.M. STELLA AND M.C. ZACCARO .....	40
MINERALS REQUIREMENT FOR <i>SPIRULINA PLATENSIS</i> ( <i>A. PLATENSIS</i> PCC 8005) GROWTH BY ICP-ES DETERMINATION AND CONTINUOUS CULTURES.....	42
GUILLAUME COGNE <sup>1</sup> , BERND LEHMANN <sup>2</sup> , CLAUDE-GILLES DUSSAP <sup>1</sup> , JEAN-BERNARD GROS <sup>1</sup> .....	42
<i>ARTHROSPIRA PLATENSIS</i> : RESEAU METABOLIQUE ET CALCUL DE FLUX EN PHOTOAUTOTROPHIE.....	45

GUILLAUME COGNE, JEAN-BERNARD GROS.....	45
<b>LYNBYA MAJUSCULA : UNE SOURCE POTENTIELLE DE COMPOSES AUX PROPRIETES ANTIFOULING.....</b>	<b>47</b>
ROBERT VALLS <sup>1</sup> , CLAIRE HELLIO <sup>2</sup> , GERALD CULIOLI <sup>3</sup> ET LOUIS PIOVETTI <sup>3</sup> .....	47
<b>MODELE DE SIMULATION DE PRODUCTION DE SPIRULINE : DEMONSTRATION ET VALIDATION PAR COMPARAISON AVEC DES RESULTATS D'EXPLOITATION .....</b>	<b>49</b>
FRANÇOIS HALDEMANN <sup>1</sup> & JEAN-PAUL JOURDAN <sup>2</sup> .....	49
<b>NUMERICAL OPTIMIZATION OF BIOMASS CONCENTRATION OF THE CYANOBACTERIUM <i>SPIRULINA PLATENSIS</i> IN AN OPEN SYSTEM USING MANGUEIRA LAGOON WATER AS CULTURE MEDIUM.....</b>	<b>52</b>
LIANE BACELO <sup>1</sup> , JORGE. A. V. COSTA <sup>1*</sup> , LUIZ. A. O. ROCHA <sup>2</sup> , GEORGE. STANESCU <sup>3</sup> .....	52
<b>REPEATED FED-BATCH CULTIVATION OF <i>SPIRULINA PLATENSIS</i> IN A CLOSED PHOTOBIOREACTOR.....</b>	<b>54</b>
CHRISTIAN OLIVEIRA REINEHR <sup>1</sup> , JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA <sup>2*</sup> .....	54
<b>CULTURE OF <i>SPIRULINA PLATENSIS</i> USING SYNTHETIC SWINE WASTEWATER .....</b>	<b>57</b>
TANISE B. P. BERTOLIN <sup>1</sup> , TELMA E. BERTOLIN <sup>1</sup> , LUCIANE M. COLLA <sup>1</sup> , MARCELO HEMKEMEIER <sup>1</sup> , JORGE A. V. COSTA <sup>2*</sup> .....	57
<b>MIXOTROPHIC GROWTH OF <i>SPIRULINA PLATENSIS</i> WITH GLUCOSE IN FED-BATCH CULTIVATION .....</b>	<b>60</b>
LUCIANE M. COLLA <sup>1</sup> , PATRÍCIA C. MOSELE <sup>1</sup> , ADRIANA M. DOMÍNGUES <sup>1</sup> , TELMA E. BERTOLIN <sup>1</sup> , JORGE A. V. COSTA <sup>2*</sup> .....	60
<b>PURIFICATION OF <i>SPIRULINA PLATENSIS</i> PHYCOCYANIN .....</b>	<b>63</b>
LORENA A. SILVA <sup>1</sup> , SILVANA T. SILVEIRA <sup>1</sup> , CARLOS A. V. BURKERT <sup>1</sup> , JANAÍNA F. M. BURKERT <sup>1</sup> , JORGE A. V. COSTA <sup>2</sup> , SUSANA J. KALIL <sup>1*</sup> .....	63
<b>OPTIMIZATION OF PHYCOCYANIN EXTRACTION FROM <i>SPIRULINA PLATENSIS</i> .....</b>	<b>65</b>
S. T. SILVEIRA <sup>1</sup> , L. A. SILVA <sup>1</sup> , C. A. V. BURKERT <sup>1</sup> , J. F. M. BURKERT <sup>2</sup> , J. A. V. COSTA <sup>2</sup> , S. J. KALIL <sup>*1</sup> .....	65
<b>OPTIMIZATION OF <i>SPIRULINA PLATENSIS</i> PRODUCTION IN OPEN RACEWAY PONDS UNDER SEMICONTINUOUS CULTIVATION .....</b>	<b>67</b>
CHRISTIAN OLIVEIRA REINEHR <sup>1</sup> , JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA <sup>2*</sup> .....	67
<b>GROWTH OF <i>SPIRULINA PLATENSIS</i> UNDER COMBINED ULTRAVIOLET LIGHT (UV-A, B AND C) OR UV-A ONLY .....</b>	<b>70</b>
FILGUEIRA, D. M. V. B <sup>1</sup> , PINTO, M. H. <sup>2</sup> , COSTA, J. A. V. <sup>2</sup> & TRINDADE, G. S. <sup>1</sup> .....	70
<b>MIXOTROPHIC CULTIVATION OF <i>SPIRULINA PLATENSIS</i> IN DIFFERENT PHOTOBIOREACTOR CONFIGURATIONS.....</b>	<b>72</b>
MICHELE R. ANDRADE <sup>1</sup> ; ELISANGELA M. RADMANN <sup>1</sup> ; VANESSA S. CERQUEIRA <sup>1</sup> ; ADRIANO S. ARRUDA <sup>1</sup> ; JANAÍNA F. M. BURKERT <sup>1</sup> ; JORGE A. V. COSTA <sup>1*</sup> .....	72
<b>CULTURES industrielles .....</b>	<b>75</b>
<b>INDUSTRIAL AND SEMI INDUSTRIAL PRODUCTION OF SPIRULINA, THIRD WORLD POTENTIAL (MODULAR SYSTEMS).....</b>	<b>77</b>
A. AYALA <sup>1</sup> , G. MANETTI <sup>1</sup> , R. BURGOS <sup>1</sup> & F. AYALA <sup>1,2</sup> .....	77
<b>INDUSTRIAL LARGE-SCALE CULTURE OF <i>SPIRULINA SP.</i> FOR THE PRODUCTION OF MICROALGAE BIOMASS AND HIGH ADDITIVE VALUE PRODUCTS IN GREEK ARID SEACOASTS. A RESEARCH PROJECT.....</b>	<b>82</b>
T.G. SOTIROUDIS <sup>1</sup> , E.T. NERANTZIS <sup>2</sup> , C. DELIYANNIS <sup>1</sup> AND G. KARYDAKIS <sup>3</sup> .....	82
<b>PRODUCTION DE SPIRULINE EN INDE .....</b>	<b>84</b>
THOMAS SEBASTIAN.....	84

PRODUCTION INDUSTRIELLE EN EQUATEUR.....	86
HALDEMANN FRANÇOIS .....	86
LA PRODUCTION DE PHYTOPLANCTON : L'EXPERIENCE DE LA SOCIETE MICRO ALGUES PROVENCE .....	88
OLIVIER LIGNON .....	88
<b>SANTE Malnutrition .....</b>	<b>89</b>
STRATEGIES DE LUTTE CONTRE LES CARENCES EN MICRONUTRIMENTS, EN PARTICULIER EN FER, DANS LES PAYS EN DEVELOPPEMENT.....	91
JACQUES BERGER .....	91
EVALUATION DE L'EFFICACITE DE LA SUPPLEMENTATION EN SPIRULINE DU REGIME HABITUEL DES ENFANTS ATTEINTS DE MALNUTRITION SEVERE .....	101
DR HERBERT DEGBEY, DR BOUREIMA HAMADOU, DR HABOU OUMAROU .....	101
LA SPIRULINE, UNE REPOSE A LA MALNUTRITION EN INDE .....	106
DENIS VON DER WEID.....	106
<b>SANTE Fonctions cliniques.....</b>	<b>109</b>
<i>SPIRULINA</i> RICH IN AIDS-ANTIVIRAL SULFOLIPIDS .....	111
KIET PHAM QUOC <sup>1</sup> AND HUBERT DURAND-CHASTEL <sup>2</sup> .....	111
LA SPIRULINE ( <i>ARTHROSPIRA</i> ) PEUT-ELLE AIDER DANS LE COMBAT CONTRE LE SIDA/HIV ?	118
AMHA BELAY .....	118
RECHERCHES SUR LES APPLICATIONS ET FONCTIONS CLINIQUES DE LA SPIRULINE EN CHINE	120
JIAN-HONG LI .....	120
THE EFFECTS OF A HIGH CHOLESTEROL DIET, WITH OR WITHOUT SUPPLEMENTATION WITH SPIRULINA PLATENSIS, ON THE LEVELS OF CHOLESTEROL, TRIGLYCERIDES AND HIGH-DENSITY LIPOPROTEIN CHOLESTEROL IN RABBITS.....	121
LUCIANE MARIA COLLA <sup>1</sup> , ANA LUIZA MUCCILLO-BAISCH <sup>2</sup> , JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA <sup>3*</sup> .....	121
DIFFERENCES IN THE SENSIBILITY OF MULTI-DRUG RESISTANT (MDR) AND NON-MDR HUMAN TUMOR CELLS TO DIFFERENT CONCENTRATIONS OF <i>SPIRULINA PLATENSIS</i> .....	124
LOPES, T.M. <sup>1</sup> ; COSTA, J.A.V. <sup>2</sup> ; TRINDADE, G.S. <sup>1</sup> .....	124
DEVELOPMENT OF FOODS ENRICHED WITH THE CYANOBACTERIUM <i>SPIRULINA PLATENSIS</i> ...	126
GLORIA C. DOS SANTOS <sup>1</sup> , JORGE A. V. COSTA <sup>1*</sup> .....	126
<b>DEVELOPPEMENT Histoire .....</b>	<b>129</b>
HISTORY OF THE SPIRULINA .....	131
HUBERT DURAND-CHASTEL * ET RIPLEY FOX.....	131
LES CYANOBACTERIES POUR LA SANTE, LA SCIENCE ET LE DEVELOPPEMENT .....	133
DR. RIPLEY D. FOX .....	133
UTILISATION TRADITIONNELLE DE LA SPIRULINE ( <i>ARTHROSPIRA</i> SP.) AU TCHAD .....	135
DR MICHEL BROUERS .....	135
<b>DEVELOPPEMENT Cultures artisanales et humanitaires.....</b>	<b>141</b>
CULTURES ARTISANALES DE SPIRULINE DANS LE TIERS MONDE POUR LUTTER CONTRE LA MALNUTRITION .....	143
CLAUDE DARCAS .....	143
SPIRULINE HUMANITAIRE DANS LES P V D : PENSER AU LENDEMAIN .....	151

PIERRE ANCEL .....	151
<b>LA SPIRULINE À MADAGASCAR .....</b>	<b>157</b>
RAVELO VOLOLONAVALONA .....	157
<b>PRODUCTION SEMI-INDUSTRIELLE ET HUMANITAIRE.....</b>	<b>163</b>
PHILIPPE CALAMAND .....	163
<b>UPS : UNITE DE PRODUCTION DE SPIRULINE DU CREDESA A PAHOU (BENIN) .....</b>	<b>164</b>
ROGER ADOUNKE .....	164
<b>LA FERME DE SPIRULINE DE KOUDOUGOU .....</b>	<b>167</b>
DENISE OUDRAOUGO.....	167
<b>SPIRULINE AU MALI (TACHARANE) 2004 .....</b>	<b>168</b>
LIBER'TERRE.....	168
<b>SPIRULINE HUMANITAIRE AU TOGO .....</b>	<b>170</b>
ASSOCIATION SVP.....	170
<b>LA SPIRULINE POUR TOUS .....</b>	<b>172</b>
GILLES PLANCHON .....	172
<b>FORMATION et SYNTHESE.....</b>	<b>175</b>
<b>LA FORMATION A LA PRODUCTION ARTISANALE DE SPIRULINE DANS UN CENTRE DE     FORMATION DEPARTEMENTAL DU MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE –FRANCE     .....</b>	<b>177</b>
GILLES GRILLET ET CLAUDE VILLARD .....	177
<b>SYNTHESE DU COLLOQUE SUR LES CYANOBACTERIES.....</b>	<b>180</b>
LOÏC CHARPY <sup>1</sup> , MARIE JOSE LANGLADE <sup>1</sup> , NARDO VICENTE <sup>2</sup> .....	180
<b>ADRESSES des participants.....</b>	<b>187</b>
<b>LES PARTICIPANTS .....</b>	<b>189</b>

**SCIENCES**  
**SYSTEMATIQUE, GENETIQUE,**  
**METABOLISME, TOXICITE**



## GENETIC DIVERSITY OF THE GENUS *ARTHROSPIRA*

M. WALERON<sup>1,3</sup>, K. WALERON<sup>1,3</sup>, G. DUYSSENS<sup>1</sup>, L. HENDRICKX<sup>2</sup>, M. MERGEAY<sup>2</sup>, ANNICK WILMOTTE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>. CIP, Institute of Chemistry B6, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium

<sup>2</sup>. Laboratory for Microbiology, Division Waste & Clean-up, & Section of Radiobiology, Belgian Nuclear Research Centre, SCK/CEN, Boeretang 200, B-2400-MOL, Belgium

<sup>3</sup> Department of Biotechnology, Intercollegiate Faculty of Biotechnology, University of Gdansk & Medical School of Gdansk, Kładki 24, 80-822 Gdansk Poland

---

### Introduction

The genus *Arthrospira* Stizenberger includes the filamentous Oscillatoriaceae with trichomes forming an open helix, with cross-walls visible by light microscopy, and containing gas-vesicles. The trichomes are motile and their diameters vary generally from 5 to 12 µm. Cells are generally shorter than broad or isodiametric (Castenholz et al. 1999). They are cultivated as a food complement due to their richness in proteins (see this volume, Ciferri & Tiboni 1985) and commercialised under the name 'Spirulina' as health food (Belay et al. 1993). The confusion between both names has arisen due to Geitler's decision to unite the two genera *Arthrospira* Stizenberger and *Spirulina* Turpin in his Flora in 1932, on the basis of their coiled trichomes. The strain PCC8005 is also used as food sources and to recycle oxygen and water in the Life-support system MELiSSA (Micro-Ecological Life Support System) that is constructed for long-term spatial missions (<http://www.estec.esa.nl/ecls/melissa/melissa.html>, Lasseur et al., Godia et al., 2002). It was thus particularly interesting to investigate whether this strain was identical to others, and assess the interest of sequencing its entire genome.

The classical taxonomy of *Arthrospira* is based on morphology. However, the morphological characters seem to be quite plastic. For example, the coiled trichomes may become loosely spiral, and even straight. A calyptra might be found, as well as attenuation of the trichomes. The direction of the coiling seems also variable (Mühling et al. 2003). All these variations are complicating the critical assessment of the dozen species that are currently described (Jeeji-Bai 1999).

To characterize the genetic diversity of the genus *Arthrospira* on the basis of ribosomal RNA sequences (including PCC8005), 51 cultures corresponding to 37 cultivated clonal strains from four continents were gathered and studied (Scheldeman et al. 1999). The 16S rRNA gene sequences were too conserved to be useful to distinguish the strains. For example, strains PCC7345 and PCC8005 shared 99.7 % of sequence similarity (Nelissen et al. 1994). Therefore the ITS (Internally Transcribed Spacer) sequences, situated between the genes coding for the 16S and 23S rRNA, were amplified by PCR (Polymerase Chain Reaction) and digested by 4 restriction enzymes. The results showed the existence of two main clusters (I and II). Inside cluster I, two subclusters were distinguished, where strains PCC8005 and *A. indica* MCRC isolate straight formed the subcluster I.B and were different from all the other members of cluster I (gathered in subcluster I.A).

A second step in the genetic study was the determination of the ITS sequence from 21 clonal strains, chosen to represent all clusters and subclusters previously found (Baurain et al., 2002). This more precise characterisation confirmed and improved the precedent conclusions. The clusters I and II were found again, as were the subclusters I.A and I.B. In addition, the sequence information allowed to distinguish two new subclusters, II.A and II.B. The ITS sequences had 475 nt in the case of cluster I and 477 nt for cluster II. The number of differences between the two clusters was 49, and they were grouped into only four regions. Between subclusters, the differences were more subtle, amounting to 2 nucleotides between I.A and I.B and 4 nucleotides between II.A and II.B. In addition to the strains, dried samples of dihé of recent (1998, 1999) or old age (1964, 1970) as well as a commercial pill were tested, and could be assigned to one subcluster, or consisted in an assemblage of several genotypes.

With this sequence information, specific PCR primers were designed, that could be used to determine to which subcluster, a new strain would belong.

There appeared no relation between the assignment into subclusters and the morphology (straight or spiral), geographical origin and taxonomic identifications in the culture collections. In addition, the high degree of genetic conservation of the ITS, as well as the question of the existence of only one or several genotypes in the same lake were discussed (Baurain et al. 2002).

### **Molecular taxonomy of *Arthrospira* based on *cpcba* sequences**

In order to confirm the results obtained with the ITS sequences, we have used different molecular taxonomic markers, of which the *cpcBA* operon will be presented here. This operon was already used with success by Manen and Falquet (2002) for 23 natural, cultivated or commercial *Arthrospira* strains. Unfortunately, 21 strains are different from the ones for which the ITS sequences were determined. These authors found three related lineages, with a major division in clades 1 and 2. Within clade 1, the four strains of Paracas (Peru) were diverging from the other 6 strains (including PCC7345). The other strain for which ITS data is known was strain Titicaca (from R. Fox), and it was situated in clade 2.

The DNAs extracted by Baurain et al. (2002) were used, and came from strains D0922, D0918, D0872, D0925, D0882, D0906, D0914 (PCC8005), D0911 (PCC7345), D0910, D0915 (PCC8006), D0916 (PCC9108) that are described by Scheldeman et al. (1999).

A PCR was carried out as described by Manen and Falquet (2002), but using the SuperTaq Plus enzyme (HT Biotechnology, UK) and an elongation temperature of 68°C. The PCR products were directly sequenced, aligned with the software Genedoc (Nicholas and Nicholas, 1997) with all the *Arthrospira* sequences found in Genbank, and used for the construction of a distance tree by Neighbor-joining method (Saitou and Nei 1987) using a distance matrix where the dissimilarity values were corrected for multiple mutations by the equation of Jukes and Cantor (1969). The indels were not taken into consideration. The last 255 positions of the *cpcB* gene and the first 301 positions of the *cpcA* gene were used, excluding the 111 positions of the intergenic spacer as defined by Manen and Falquet for *Arthrospira* PCC7345 (AJ401178). A bootstrap analysis involving 500 resamplings was carried out. The outgroup was *Lyngbya* sp. PCC7419.

The tree of Fig. 1 includes our sequences, the ones of Manen and Falquet (2002) and seven additional ones (Liu et al. unpubl. data). It shows the same lineages as found by Manen and Falquet (2002) who have used a parsimony analysis to construct their tree.

The ITS-cluster I corresponds to their clade 2, is extremely homogeneous and well supported by a bootstrap value of 100%. With the *cpc* genes, there is no distinction of strain PCC8005 from the other members of clade 2 though we know that it belongs to ITS-subcluster I.B and that 6 strains from clade 2 belong to ITS-subcluster I.A (Baurain et al. 2002). Similarly, the intergenic sequence does not distinguish PCC8005 from the others in clade 2 (data not shown).

The ITS-cluster II overlaps with the clade 1 of Manen and Falquet (2002), but the bootstrap support is only 47%. The differentiation of the four Paracas strains is also found, but seems to cause some instability for the nodes in this region of the tree. Moreover, two other strains are now belonging to this group, PCC8006 and *A. fusiformis* Hegewald1976/83. On the basis of ITS sequences, these two strains belonged to the subcluster II.B, and we hypothesise that the Paracas strains would fall into this subcluster if their ITS was determined. The strain PCC7345, that possesses sequences characteristic of both subclusters II.A and II.B (Baurain et al., 2002), belongs to the other part of clade 1, that probably correspond to the ITS cluster II.A, as shown by the presence of PCC9108.

The duplicate sequences (PCC7345 and Titicaca strains) between this study and the one of Manen & Falquet (2002) appear identical, as could be expected.

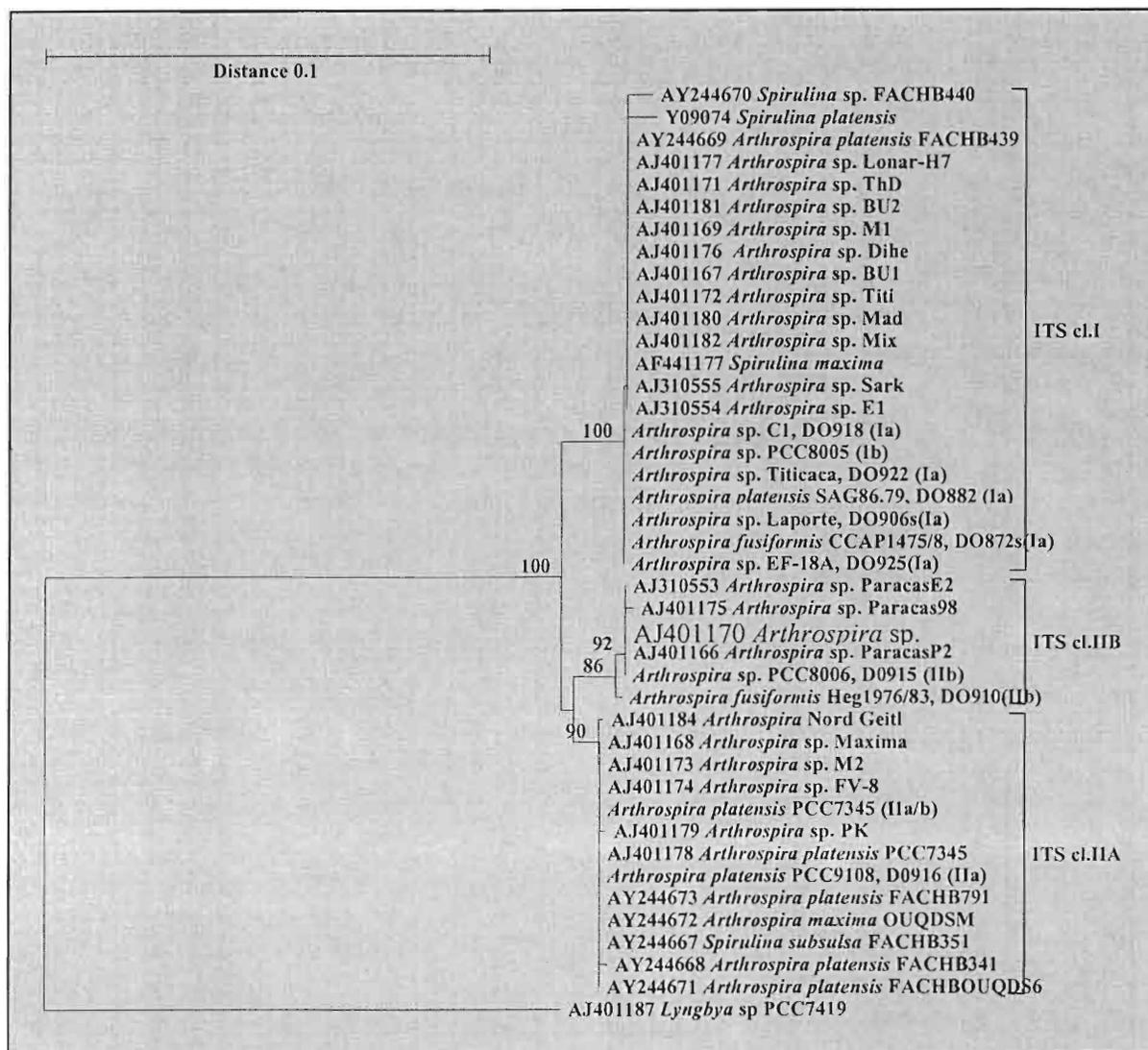


Fig. 1. Neighbor-joining tree based on partial *cpcB* and *cpcA* gene sequences, including 41 *Arthrospira* strains (including 2 duplicates) and the outgroup, *Lyngbya* sp. PCC7419. The affiliation of our sequences to the ITS-subclusters is indicated between brackets after the strain name. The bootstrap values higher than 70% are written besides the concerned nodes. The delimitation of three ITS-subclusters, on the basis of ITS sequences (Baurain et al. 2002), are indicated on the right side.

There are 18 informative positions for the three lineages in the alignment of the partial *cpcB* and *cpcA* gene sequences (Table 1). Ten of them support the separation of strains belonging to ITS-clusters I and II. Two of them are shared by strains from ITS-clusters I and II.B. Six shared synapomorphies support the grouping of strains assigned to ITS-clusters I and II.A, and the distinctiveness of II.B. Remarkably, they are all situated after base 708 in the merged alignment (Table 1). Manen and Falquet (2002) already pointed to the breakpoints in the alignment and hypothesised that lateral gene transfer could have played a role in this non-random distribution of informative positions.

When the 111 positions of the intergenic spacer between the *cpc* genes are analysed, there are only 9 informative positions, of which 8 are supporting the grouping of strains from ITS-cluster I and II.A, and the distinctiveness of cluster II.B (data not shown).

Table 1. Informative positions in the merged alignment of *cpcB* (155 last positions) and *cpcA* (first 301 positions) genes and their distribution in the three lineages. The positions correspond to the ones of the complete sequence of the *cpc* operon in *Spirulina platensis* strain C1 (Y09074).

	Fragment of <i>cpcB</i> gene											Fragment of <i>cpcA</i> gene						
Cluster/ position	273	294	303	375	453	484	495	501	502	503	507	708	768	772	807	843	891	894
I	T	C	C	C	C	A	T	A	T	G	T	G	T	G	G	A	C	A
II.A	C	T	T	T	T	G	C	T	G	C	A	A	T	G	G	A	C	A
II.B	C	T	T	C	T	G	C	T	G	C	T	A	C	T	T	G	T	C

In conclusion, three lineages were observed in a distance tree of 39 *Arthrospira* strains using partial *cpcBA* gene sequences and were corresponding to three clusters obtained on the basis of ITS sequences (I, II.A and II.B). However, the complete ITS sequences had allowed to differentiate a fourth lineage where PCC8005 was separated from the other strains of cluster I (though only by 2 nucleotides). Thus, in the case of PCC8005, the ITS had more resolution power than the partial *cpcB* and *cpcA* genes, as well as the intergenic sequence between these genes. In addition, the high level of relatedness of all *Arthrospira* strains found with ITS was confirmed with the *cpcBA* sequences.

Strain PCC8005 appears slightly distinct from most other *Arthrospira* strains, and its genomic sequencing would be very useful to warrant its safe use in the MELISSA life support

#### Acknowledgements

This work was supported by ESA/ESTEC (contract number n°15680/01/NL/ND), KBN 3 P04B 022 24 and by the Bilateral Polish-Wallonian Project CGRI II.18/KBN 018/2003-2004. Annick Wilmotte is research associate of the National Fund for Scientific Research (Belgium).

#### References

- Baurain, D., Renquin, L., Scheldeman, P., Belay A. & Wilmotte A. (2002) Remarkable conservation of Internally Transcribed Spacer sequences of *Arthrospira* ("Spirulina") (Cyanophyceae, cyanobacteria) strains from four continents and of recent and 30 years-old dried samples from Africa. *J. Phycol.* 38: 384-393.
- Belay, A., Ota, Y., Miyakawa, K. & Shimamatsu H. (1993) Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. *J. Appl. Phycol.* 5: 235-241.
- Castenholz, RW., Rippka, R., Herdman, M. & Wilmotte, A. (1999) Form-genus I. *Arthrospira* Stizenberger 1852. In Staley, JT., Bryant, MP., Pfennig, N., Holt, JG [Eds.] *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 3:542-543. William & Wilkins, Baltimore, MD.
- Ciferri, O. & Tiboni, O. (1985) The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. *Annu. Rev. Microbiol.* 39: 503-526.
- Geitler, L (1932) Cyanophyceae. In Rabenhorst, L. [Ed.] *Kryptogamen-Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*, vol. 14: 1-196. Akad. Verlagsgesellschaft, Leipzig.
- Godia F, Albiol J, Montesinos JL, Perez J, Creus N, Cabello F, Mengual X, Montras A, Lasseur C. (2002) MELISSA: a loop of interconnected bioreactors to develop life support in space. *J Biotechnol.* 99:319-30
- Jeeji-Bai, N. (1999) A taxonomic revision of the genus *Arthrospira* based on certain new criteria. In Charpy, L. & Larkum, A. W. D. [Eds.] *Marine Cyanobacteria*. Bull. Institut. Océanogr. Monaco, special issue n°19:47-52.
- Jukes, TH. & Cantor, CR. (1969) Evolution of protein molecules. In Munro, HN. [Ed.] *Mammalian protein metabolism Vol III*: 21-132. Academic Press, New York.
- Lasseur, C., Dixon, M, Dubertret, G., Dussap, G., Godia, F., Gros, JB., Mergeay, M., Richalet, J. & Verstraete, W. (2000) MELISSA : 10 years of research, results, status and perspectives. SAE paper 2378, 30th International Conference on Environmental Systems, Toulouse, France July 10-13th, 2000.
- Manen, JF. & Falquet, J. (2002) The *cpcB-cpcA* locus as a tool for the genetic characterization of the genus *Arthrospira* (Cyanobacteria): evidence for horizontal transfer. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 861-7.

- Mühling M., Harris, N., Belay, A. & Whitton, B. (2003) Reversal of helix orientation in the cyanobacterium *Arthrospira*. *J. Phycol.* 39: 360-367.
- Nelissen, B., De Baere, R., Wilmotte, A. & De Wachter, R. (1994) Phylogenetic relationships among filamentous helical cyanobacteria investigated on the basis of 16S ribosomal RNA gene sequence analysis. *Syst. Appl. Microbiol.* 17: 206-210.
- Nicholas KB & Nicholas HB. (1997) GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. [www.psc.edu/biomed/genedoc](http://www.psc.edu/biomed/genedoc)
- Saitou, N. & Nei. M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-454425.
- Scheldeman, P., Baurain, D, Bouhy, R., Scott, M., Mühling, M., Whitton, B.A., Belay, A. & Wilmotte A. (1999) *Arthrospira* ('*Spirulina*') strains from four continents are resolved into only two clusters, based on amplified ribosomal DNA restriction analysis of the internally transcribed spacer. *FEMS Microbiol. Lett.* 172: 213-222.

## EXPLORATION DU GENOME *ARTHROSPIRA*

CHENG-CAI ZHANG <sup>1,2</sup>, JIE ZHOU <sup>2</sup>, AND JU-YUAN ZHANG <sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Laboratoire de Chimie Bactérienne, CNRS, 31 chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille cedex 20, France. E-mail [cczhang@ibsm.cnrs-mrs.fr](mailto:cczhang@ibsm.cnrs-mrs.fr)*

<sup>2</sup> *State Key Laboratory in Agricultural Laboratory, Huazhong Agriculture University, Wuhan, China*

---

### Résumé

Le génome d'*Arthrospira (Spirulina) platensis* est partiellement séquencé au Beijing Genomics Institute. L'information génomique fournit des données utiles pour une meilleure compréhension du potentiel biotechnologique de cette cyanobactérie.

Comparativement à de nombreuses autres cyanobactéries d'eau douce, *Arthrospira (Spirulina) platensis* supporte de fortes concentrations en sel et un pH élevé. Nous avons mis en évidence dans le génome d'*Arthrospira*, des gènes qui sont absents dans les génomes de toutes les autres cyanobactéries dont les génomes ont été séquencés. Parmi ces gènes spécifiques à *Arthrospira*, *hal84* pourrait coder pour une protéine similaire à la phosphoadénosine 5'phosphate (PAP) phosphatases ou à la phosphoadénosine 5'phosphosulfate (PAPS) phosphatases. Le PAPS est un composant critique dans la voie d'assimilation de sulfate et un substrat de PAPS réductase pour la production de PAP. Dans le cas des levures et des plantes, les fortes concentrations salines conduisent à l'accumulation de PAP lequel à son tour inhibe le processus d'assimilation de sulfate en aval. La sur-expression de PAP phosphatase permet la résistance au sel. Dans cette étude, nous montrons que la protéine codée par le gène *hal844* a une activité de PAP phosphatase. Cette activité est sensible à Na<sup>+</sup>, mais pas à K<sup>+</sup> ou Li<sup>+</sup>. Le gène *hal844* est exprimé dans *Anabaena* PCC 7120, une souche de cyanobactérie sensible même à une faible teneur en sel dans un milieu de croissance. La souche *Anabaena* recombinée maintient une meilleure intégrité cellulaire que celle de référence en présence de 30-40 mM de NaCl. Ces résultats pourraient aider à comprendre la biodiversité et les caractéristiques des différentes souches de cyanobactéries.

### Abstract

The genome of *Arthrospira (Spirulina) platensis* is partially sequenced at Beijing Genomics Institute. This genomic information provides useful data for better understanding of the biotechnological potential of cyanobacteria.

*Arthrospira (Spirulina) platensis* is also resistant to high salt concentration and high pH as compared to many other fresh water cyanobacteria. We have screened for genes that are present in *Arthrospira* genome, but absent in any other sequenced cyanobacterial genomes. Among these genes specific to *Arthrospira*, *hal844* could encode a protein similar to phosphoadenosine 5'phosphate (PAP) phosphatases or phosphoadenosine 5'phosphosulfate (PAPS) phosphatases. The PAPS is a critical component in sulfate assimilation and a substrate for PAPS reductase whose reaction produces PAP. In yeast and plants, the high salt concentration leads to the accumulation of PAP that in turn inhibits the downstream sulfate assimilation pathways. The overexpression of PAP phosphatase confers salt resistance. In this study, we show that the protein encoded by the gene *hal844* has PAP phosphatase activity. This activity is sensitive to Na<sup>+</sup>, but not to K<sup>+</sup> or Li<sup>+</sup>. The gene *hal844* is expressed in *Anabaena* PCC 7120, a cyanobacterial strain sensitive even to low level of salt in the growth medium. The recombinant *Anabaena* strain maintains better cell integrity as compared to the control in the presence of 30-40 mM of NaCl. These results could help us to understand the biodiversity and characteristics of different cyanobacterial strains.

## LES CONSTITUANTS ALIMENTAIRES DES CYANOBACTERIES

ÉMILE M. GAYDOU

*Équipe Phytochimie, UMR 6171, Systèmes Chimiques Complexes, Université d'Aix-Marseille III, Faculté des Sciences et Techniques de Saint-Jérôme, Avenue Escadrille Normandie Niémen, 13397 Marseille Cedex 20, France*

---

### Résumé

Si la littérature scientifique relative aux cyanobactéries est de plus en plus abondante (800-900 articles par an), l'étude de leurs constituants alimentaires porte principalement sur *Spirulina platensis*, connue aussi sous le nom de *Arthrospira platensis* ou *S. geitleri*.

Une analyse comparée avec d'autres sources de produits alimentaires d'origine végétale ou animale fait ressortir des différences notables de composition. La teneur en protéines de *S. platensis* est remarquablement élevée (40-60% par rapport à la matière sèche) avec une bonne digestibilité (75-83%). Toutefois, il est à noter, comme pour beaucoup de protéines d'origine végétales, une déficience en lysine, tryptophane et méthionine.

La fraction lipidique (6-8%) se caractérise par un bon équilibre acides gras saturés/acides gras polyinsaturés. La présence d'acides gras essentiels comme l'acide  $\gamma$ -linoléique (18 :3n-6) à des concentrations relativement élevées (16-22%), fait que *S. platensis* peut être une source en cet acide. La présence d'acide  $\alpha$ -linoléique (18 :3n-3) montre que *S. platensis* est aussi une source d'oméga 3. La fraction insaponifiable est riche en tocophérols (vitamine E) et la fraction stérolique est principalement composée de clionastérol (épimère en C-24 du  $\beta$ -sitostérol) et pauvre en cholestérol.

La teneur en cendres est élevée (6-11%). Parmi la vingtaine d'éléments caractérisés par ICP-AES, on note, outre la présence importante de sodium, calcium et chlorure, celles non négligeable en potassium, magnésium, zinc, phosphore et fer.

La littérature fait ressortir depuis peu un intérêt biologique relatifs aux phycocyanines et alloctyanines en raison de leurs propriétés anti-oxydantes. Pour ce qui est de la teneur en vitamines, une douzaine d'entre elles ont été quantifiées.

Cet ensemble de résultats est en faveur d'une utilisation de *S. platensis* comme supplément en protéines, acides gras essentiels et en vitamines des aliments comme l'indiquent de nombreux brevets déposés dans ce domaine.

### Abstract

The scientific literature about cyanobacteria is more and more abundant (800-900 articles a year). Their food components studies are mainly on *Spirulina platensis*, which is well known as *Arthrospira platensis* or *S. geitleri*.

A comparative analysis with other vegetal or animal food products sources shows significant differences in their composition. The protein content of *Spirulina platensis* is significantly high (40-60% according to dried material), with a high digestibility (75-83%). However, as for many vegetal origin proteins, we can notice a deficiency with lysine, "tryptophane" and "méthionine".

The lipidic fraction (6-8%) shows a good equilibrium with fatty acids "saturés et polyinsaturés". *Spirulina platensis*, can be a source of  $\gamma$ -linoléic acid (18 :3n-6), with quite high concentrations (16-22%) of this essential fatty acid. And as it contents  $\gamma$ -linoléic acid (18 :3n-3), it can be too a source of omega 3. The "insaponifiable" fraction is rich in "tocophérols" (vitamin E) and the "stérolique" fraction is rich in « clionastérol (épimère en C-24 du  $\beta$ -sitostérol) » and poor in "cholestérol".

The ash content is high (6-11%). About 20 elements have been characterized by ICP-AES. Among them, there are important fractions of Na, Ca and chlorure. There are too significant proportions of "potassium, magnésium, zinc, phosphore et fer ».

It appeared recently in the literature a biologicak interest for the phycocyaninins and the alloctyaninins, as they have antioxidant effects. A dozen have been quantified for their contents in vitamins.

All those results show the grounds of the use of *Spirulina platensis* as food supply with proteins, essential fatty acids and vitamins. There are several patents on this subject.

## CYANOBACTERIES ET TOXICITE

ISABELLE ITEMAN

*Unité des Cyanobactéries, URA CNRS 2172, Département de Microbiologie Fondamentale et Médicale, Institut Pasteur 28, rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15*

---

### Résumé

Les cyanobactéries produisent un très grand nombre de métabolites secondaires bioactifs dont des toxines responsables de cas d'empoisonnements humain ou animal. Les genres ou espèces de cyanobactéries synthétisant des molécules toxiques sont le plus fréquemment isolés d'habitats aquatiques, qu'ils soient dulcicoles ou marins. La toxicité n'est pas un caractère constant au sein d'un genre ou d'une espèce de cyanobactérie. Différentes toxines appartenant à une ou plusieurs familles peuvent être produites simultanément par une même souche. De nature chimique variée, les cyanotoxines appartiennent à 3 classes de molécules, les peptides cycliques, les alcaloïdes et les lipopolysaccharides. La première famille comprenant les microcystines et les nodularines a pour organe cible, le foie. Les alcaloïdes ont des activités toxiques très diverses puisqu'ils peuvent être neurotoxiques (anatoxine-a, homoanatoxine-a, anatoxine-a(S) et saxitoxines), dermatotoxiques (aplaysiatoxine, debromoaplaysiatoxine et lyngbyatoxine-a), ou bien hépatotoxique (cylindrospermopsine). Les principaux modes d'exposition identifiés sont le contact direct ou l'ingestion d'eau douce ou de mer (activités nautiques, eaux de boisson, pêche, etc.). L'intoxication par la consommation d'aliments autres que l'eau et ayant été en contact avec des cyanotoxines, par exemple des légumes ou encore des coquillages, reste anecdotique. Néanmoins, la consommation de suppléments alimentaires issus de culture de cyanobactéries pourrait présenter un risque pour la santé des consommateurs. Un bilan sera présenté sur les connaissances actuelles sur cette voie d'exposition.

### Abstract

Cyanobacteria produce a wide range of bioactive secondary metabolites including toxins responsible of human or animal cases of poisonings. The genera or species of cyanobacteria producing toxic molecules are frequently isolated from water habitats, like freshwater or marine environments. The toxicity is not a permanent feature within a genus or a species of cyanobacteria. Different toxins belonging to one or several families can be produced by a same isolate. From varied chemical nature, the cyanotoxins belong to 3 classes of molecules, the cyclic peptides, the alkaloids and the lipopolysaccharides. The first family comprising the microcystins and the nodularins has for target, the liver. The alkaloids have more various toxic effects since they can be neurotoxic (anatoxin-a, homoanatoxin-a, anatoxin-a(S) and saxitoxins), dermatotoxic (aplaysiatoxin, debromoaplaysiatoxin and lyngbyatoxin-a), or also hepatotoxic (cylindrospermopsin). The major routes of exposure are direct contact or freshwater or seawater ingestion (during water activities, drinking water, fishing, etc.). Intoxication by the consumption of foods except water and having been in contact with the cyanotoxins, for example vegetables or shellfish, remained anecdotic. Nevertheless, the consumption of food supplements harvested from culture of cyanobacteria could present a health hazard for the consumers. A report will be presented here on the present knowledge on this way of exposure.

## ANTIBACTERIAL AND CELL DIVISION STIMULATION ACTIVITIES OF *ARTHROSPIRA PLATENSIS* (FILAMENTOUS CYANOBACTERIUM) EXTRACELLULAR METABOLITES.

TRABELSI LAMIA<sup>1</sup>, HATEM BEN OUADA<sup>1</sup>, BROUERS MICHEL<sup>2</sup>, CHRILAA JIHEN<sup>3</sup> AND CHALLOUF RAFIKA<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>INSTM centre de Monastir, laboratoire de biodiversité et biotechnologie marine. BP. 59 Route de Khniss, 5000 Monastir. Tunisie

<sup>2</sup>Centre Universitaire de Biotechnologie Algale (CUBIA). Université de Liège B22 Sart Tilman. 4000 Liège, Belgique

<sup>3</sup>Laboratoire de microbiologie. Faculté de pharmacie, Université du Centre. 5000 Monastir. Tunisie.

---

### Introduction

Cyanobacteria strains secrete various secondary metabolites in their medium culture (Tatiana et al. 2000). Most of these natural products have a variety of biological activities like antibiotic, algicide, cytotoxic, immunosuppressive, antiviral, fungicide, enzyme inhibiting (Harrigan et al. 1999; Jaki et al. 2000, Mundt et al 2001). For *Arthrospira platensis* these substances and their effects haven't been subject to full study. The aim of this work is to identify and to quantify antibacterial and cell division stimulation activities of the extracellular secondary metabolites of the cyanobacterium *Arthrospira platensis*.

### Materials and methods

Microalgae strain and growth conditions : *Arthrospira platensis* strain Compère n° 1968/3786 cells were grown in sterile flasks containing Zarrouk medium at pH 9.02 and were exposed to light intensity ( $50\mu\text{mols.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  Light/Dark rhythm of 20hours/4hours). The temperature was between 28-30°C. A steady agitation was achieved by compressed air.

Isolation of extracellular substances from the culture medium : All work was conducted at the end of the exponential phase (pH :10, biomass : 0,6gl-1). The sample was filtered successively through a filter paper with a pore width of 25 $\mu\text{m}$ , a pre-filter and a 0,22 micron stericup filter(Millipore) to obtain sterile extracellular substances.

The extracellular substances were dialyzed against deionised water through a 3,5 kDa tube to eliminate medium salt.

Antibacterial activities : Tested bacterial strains were *Staphylococcus aureus* ATTC 29213, *Staphylococcus epidermidis* NCIMB 8853, *Micrococcus luteus* NCIMB 8166 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. MICs were determined in triplicate by microdilution techniques in Mueller-Hinton broth (Difco) as described by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (2000).

Cell division stimulation activities were measured on algae *Cosmarium lundellii*, CCAP612/15 according to Lefevre et Laporte (1964), patent letters.

Preliminary characterization of extracellular proteins was investigated by steric exclusion liquid chromatography

### Results and discussion

Secondary metabolites showed a good activity against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Micrococcus luteus* with MIC<sub>90</sub> at 12,5 $\mu\text{g/ml}$  and MBC at 50 $\mu\text{g/ml}$  and a moderate activity against *Pseudomonas aeruginosa* with MIC<sub>90</sub> and MBC at 640 $\mu\text{g/ml}$  (Table 1).

Similar effects were observed by Chrost et al (1975), when they described a pronounced reduction of Gram positive bacteria in lakes during the occurrence of cyanobacteria blooms, and recently by Jaki et al., (2000) when they showed that *Nostoc commun* secreted in their medium culture two diterpenoïdes (comnostins and noscomin) that were active against Gram negative bacteria.

Table 1 : Inhibitory and bactericidal activities of DEM (dialyzed extracellular metabolites) and EPF (extracellular protein fraction).

strains	Fraction	MIC <sub>s</sub> (µg/ml)		MBC (µg/ml)
		range	MIC <sub>90</sub>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	DEM	6,3-50	12,5	50
	EPF	3,2-50	12,5	50
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	DEM	3,2-50	12,5	50
	EPF	1,75-50	25	25
<i>Micrococcus luteus</i>	DEM	3,2-50	12,5	50
	EPF	3,2-50	25	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DEM	175-1280	640	640
	EPF	-	-	-

Secondary metabolites have a stimulating effect on cellular division (fig. 1). The percentage of *Cosmarium lundellii* cells treated by 5mg/ml DEM (dialyzed extracellular metabolites) and EPF (extracellular protein fraction) reaches respectively 39% and 41% in 12 hours of incubation whereas the percentage of non treated undergoing division is only 4%.

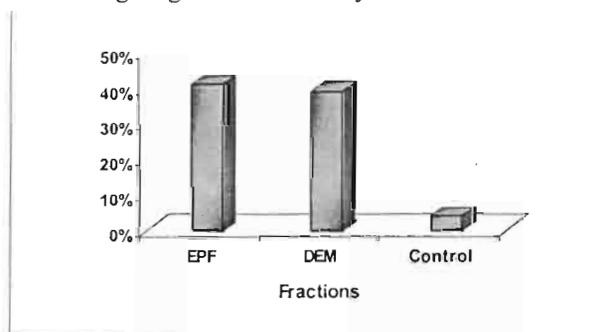


Figure 1 : Percentage of cosmarium cells divisions after 12 h treatment by 5mg/ml DEM (dialyzed extracellular metabolites) and EPF (extracellular protein fraction)

Lefèvre and Laporte (1964), recorded a high percentage of cosmarium cell division after 24 hours, with 4ml oscillatoria extracts. In our work and after the addition of the same quantity of DEM, we recorded the same activity after 12 hours.

### Conclusion

Fractionation of the crude mixture of secondary metabolites show that the stimulating cellular division active compounds and the antibacterial active compounds are presumably of a protein nature since we can find them in a fraction obtained from precipitation by ammonium sulphate. The preliminary characterization of extracellular proteins by steric exclusion liquid chromatography showed two protein complexes with 2400 Kd and 692 Kd molecular weight respectively.

### References

- Chrost RJ 1975. Inhibitors produced by algae as an ecological factor affecting bacteria in water ecosystems. *Acta Microbiol Pol Ser B*. 7 : 125-133.
- Harrigan GG, Luesch H, Yoshida WY, Moore RE, Nagle DG, Paul J 1999. Symplostain 2 : a dolastatin 13 analogue from the marine cyanobacterium *Symploca hydroides*. *J. Nat. Prod.* 62: 655-658.
- Jaki B, Orjala J, Heilmann J, Linden A, Vogler B, Sticher O 2000. A novel extracellular diterpenoid with biological activity from the cyanobacterium *Nostoc commune*. *J. Nat. Prod.* 62: 339-343.
- Lefèvre M, Laporte G 1964. Nouveau produit thérapeutique à base d'algues cyanophycées, Brevet spécial de médicament, n° 2674MA61K.

# PHYSIOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF SEAWATER ACCLIMATED CYANOBACTERIUM *ARTHROSPIRA PLATENSIS*.

HATEM BEN OUADA<sup>1</sup>, LAMIA TRABELSI<sup>1</sup>, RYM BEN DHIAB<sup>1</sup> ET MICHEL BROUERS<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *INSTM centre de Monastir, laboratoire de biotechnologie. BP. 59 Route de Khniss, 5000 Monastir-Tunisie.*

<sup>2</sup> *University centre for algal biotechnology (CUBIA). University of Liege. B22 Sart Tilman 4000 Liege Belgium.*

---

## Introduction

*Arthrospira platensis* is an oxygenic photosynthetic cyanobacteria living in brackish water. Surveys of the literature in Borowitska (1986) and Hagemann et col. (1991), show that *Arthrospira platensis* can survive in several high salt concentrations. Fox (1986) reported that some industrial farms are now quite successful to grow spirulina in urea enriched seawater. The use of sea water as medium is particularly interesting to promote spirulina farming. In many regions in the world conventional irrigation farming doesn't give up sufficient amount of fresh water for algae production. The aim of this work is to study the effect of sea water medium on growth, photosynthetic activity, protein profiles and morphology of trichomes after several successive generations of cultures of the *Arthrospira platensis* strain.

## Materials and methods

Strain and cultivation. Cultures of *Arthrospira platensis*, strain Compere 1968/3786, were adapted separately during several generations to two salt stress conditions : sea water pretreated medium (Faucher et col. 1979), and Zarrouk medium containing 30g NaCl.l<sup>-1</sup>. A culture in classical Zarrouk medium with 1g NaCl.l<sup>-1</sup> was chosen as a control.

Estimation of growth. Growth of the cultures was followed by measuring the biomass dry weight. The biomass was harvested every 2 days by filtration of 50 ml of the culture on nylon sieve 25µm pores.

Photosynthetic pigments. Phycobilins were estimated spectrophotometrically. For chlorophyll and carotenoids: 25 µl of pigment extract were subjected to reverse phase HPLC analysis using a set-up (Waters, Milford, MA, USA). A Nova Pak C18, 60A column (length 150 mm, pore size 4µm) was used for separation.

Oxygen evolution. Respiration and photosynthesis were measured as O<sub>2</sub> exchange rates using a Clark-type oxygen electrode at 22°C.

Biometric analysis. samples of 30 *Arthrospira* trichomes each were observed under microscope (objective 40x). An ocular micrometer, 16x calibrated to the hundredth was used for measurements. Investigated parameters were the number of spirals per trichomes, the steps and amplitude of the central spire and those of the spire at the left and the right ends of the trichomes and the thickness of each trichome. The principal component analysis (PCA) was performed by means of 7.5 SPSS software.

Electrophoretic analysis. Extraction of hydrosoluble proteins was carried out by 0.1M phosphate buffer solution at pH 6.9. Proteins were separated in SDS 15% polyacrylamide gels, at 6°C.

## Results

Growth rate in the salt cultures, sea water and 30g.L<sup>-1</sup> NaCl cultures, did not exceed 0.4 g.l<sup>-1</sup> within 30 days of cultivation, lower than 0.6 g.l<sup>-1</sup> in the reference culture.

The salt cultures, compared to the control culture, were characterized by lower values of light saturated maximal photosynthetic activity (P<sub>m</sub>) (490 and 564 against 1025) and higher values of dark respiration (38 and 66 against 29). These cultures also showed lower values of photosynthetic efficiency and therefore higher compensation point values.

Previous studies on *Arthrospira platensis* showed that the increase in salt concentration leads to decrease of specific growth and photosynthetic activity (Lu and Vonshak, 1999, 2002). high saltiness leads to the rapid saturation of photosystems even at weak luminous intensity. It reduces, the activity of the photosynthetic apparatus and, consequently, the growth rate (Vonshak et al., 1988b).

For all measured pigments, and specially for phycobilins, the highest concentrations were observed in seawater cultures. The concentration in chlorophyll *a*, carotenoids and phycobilins was respectively

nearly 22mg.g<sup>-1</sup> dry weight, 2mg.g<sup>-1</sup> dry weight and 112mg.g<sup>-1</sup> dry weight for the seawater culture against only 19mg.g<sup>-1</sup> dry weight, 1.4mg.g<sup>-1</sup> dry weight and 66mg.g<sup>-1</sup> dry weight for the reference culture.

Lu and Vonshak (1999) showed a constant carotenoid/chl *a* ratio in salt adapted cells and a significant decrease of phycocyanin/chl *a* ratio while salt concentration increased. These results are in concordance with those found in 30g.L<sup>-1</sup> NaCl culture in our work. But in seawater adapted cells, compared to the reference culture, a significant increase of carotenoids/chl *a* ratios and of phycobilin/chl *a* was observed. This apparent contradiction could suggest another way of salt adaptation in sea water medium than in 30g.L<sup>-1</sup> NaCl cultures.

The *Arthrospira* cultivated in seawater medium (c) presented a particular electrophoretic profiles of polypeptides which looked like that of the reference culture, but which was marked by the revelation of at least two additional: 75Kd and 37Kd polypeptides. For the 30 g.l<sup>-1</sup> NaCl culture (b), compared with the reference culture, we notice the disappearance of the 60, 47 and 39 Kd polypeptides and the sub expression of those of 34 and 32 Kd.

To our knowledge, few studies carried out on microalgae have shown the over expression of proteins under the effect of salt stress. The occurrence of proteins and of induced genes, expressed in response to salt stress, was supposed to be a way to induce resistance to increased salt concentration (Gaxiola *et al.*, 1992). The revelation, in electrophoresis, of these stress proteins expresses consequently a high level of adaptation of the species to the new environment. This adaptation finds also expression, in phenotypical modifications. The factorial analysis in principal components shows, indeed, the clear distinction of phenotypes of the seawater population, described by the retained characters, from those of the other cultures, including the reference.

## Conclusion

Seawater treated medium seems to induce, in *Arthrospira* cells, different metabolic mechanisms of adaptation to salt stress than stressed NaCl salt cultures. These differences resulted in promoting pigment synthesis, supplementary expression of proteins and also phenotypic modifications.

## References

- Borowitzka, L. J. 1986. In Round, P. E. & Chapman, O. J. [Eds.] *Progress in Phycological Research*. Biopress, 4:243-56.
- Faucher, O., Coupal, B. & Leduy, A. 1979. *Canadian Journal of Microbiology*. 25:752-9.
- Fox, R. D. 1986. In Edisud. *Algoculture*. Aix-en-Provence (FR), 319 pp.
- Gaxiola, R., de Larrinoa, I. F., Villalba, J. M. & Serrano, R. 1992. *EMBO J.* 11:3157-64.
- Hagemann, M., Techel, D. & Rebsing, L. 1991. *Arch. Microbiol.* 155:587-8.
- Lu, C.M. & Vonshak, A. 1999. *New Phytol.* 141:231-9.
- Lu, C.M. & Vonshak, A. 2002. *Physiol. Plant.* 114: 405-13. Vonshak *et al.*, 1988b.
- Vonshak, A., Guy, R. & Guy, M. 1988b. *Arch. Microbiol.* 150:417-20.
- Investigations of selected cyanobacteria. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 203: 327 :334.

**TOXICITE NON EXPRIMEE PAR LA CYANOBACTERIE POTENTIELLEMENT TOXIQUE  
*PLANKTOTHRIX AGARDHII* RENCONTREE DANS UN ETANG SAUMATRE  
MEDITERRANEEN : PRISE EN COMPTE DU RISQUE DANS LE CHOIX DES ESPECES  
CULTIVEES A DES FINS NUTRITIVES.**

NICOLAS CHOMERAT, FAYOLLE S. & CAZAUBON A.

*Faculté des sciences et techniques de Saint Jérôme, 13397-Marseille cedex 20.*

---

**Résumé**

A côté des espèces de cyanobactéries (ou Cyanophytes) susceptibles d'être cultivées pour leur consommation, des espèces taxinomiquement très proches sont capables de produire des molécules toxiques et dangereuses pour la santé. En eaux douces, la présence de toxines cyanobactériennes est souvent associée à des efflorescences (ou blooms) qui se manifestent dans les cas d'hypereutrophisation des lacs et étangs. Ces proliférations, provoquées par des apports excessifs en phosphore et en azote par le bassin versant, entraînent une diminution de la transparence de l'eau induite par les fortes densités de cellules et produisent des métabolites secondaires potentiellement toxiques libérés lors de la phase de sénescence de la fleur d'eau. La présence de ces espèces constitue de véritables nuisances pour les populations riveraines et restreint l'utilisation de ces plans d'eau.

Dans l'étang de Bolmon, étang saumâtre du littoral méditerranéen situé au sud de l'étang de Berre, une étude du phytoplancton pendant 18 mois a révélé la présence de cyanobactéries tout au long de l'année et le peuplement est dominé en permanence par l'espèce *Planktothrix agardhii* ex Gom. Anagn. & Kom. (Oscillatoriale) connue pour sa production potentielle de microcystines hépatotoxiques. Un suivi de la présence de toxines a été réalisé mais n'a révélé aucune production de microcystines par *P. agardhii* dans ce milieu. Cette cyanobactérie plutôt dulçaquicole a une écologie différente dans cet étang méditerranéen. Elle peut supporter des variations de salinité importantes et cohabiter avec des espèces typiquement saumâtres. Dans ce milieu, les conditions environnementales particulières sont peut-être à l'origine de la non toxicité de *P. agardhii*. Cependant, une modification de ces conditions pourrait provoquer une reprise de la synthèse toxinique et la culture de cette espèce à des fins nutritives n'est pas envisageable. Le choix de telles espèces doit s'effectuer avec la plus grande prudence.

**Abstract**

Beside cyanobacteria that can be possibly cultivated for food, some species close in the taxonomic classification are able to produce compounds harmful or toxic for human health. In freshwater, occurrence of cyanobacterial toxins is mostly reported during bloom phases that frequently appear in hypertrophic lakes or ponds. These proliferations are the consequence of enrichment in nitrogen and phosphorus in the drainage basin and they lead to a decrease of the water transparency, because of the high cells densities, and sometimes produce some potentially toxic secondary metabolites, released at the senescent phase of the bloom. The presence of such bloom-forming species results in nuisances for lakeside populations and limits the utilisation of these water pieces.

In the étang de Bolmon, a brackish pond of the coastal Mediterranean area, located at the South of the étang de Berre, phytoplankton has been studied during 18 months. Cyanobacteria were recorded all the year round and the community was always dominated by *Planktothrix agardhii* ex. Gom. Anagn. & Kom. This species is known for its abilities to produce hepatotoxic microcystins, but our study revealed that no microcystins production occurred in this ecosystem. This cyanobacterium was known as a freshwater species and has a different ecology in this Mediterranean pond. It can support some salinity variations and live with typically brackish species. The non toxicity of *P. agardhii* may be explained by peculiarities of the environmental conditions in this pond. However, a modification of these conditions could lead to a toxin synthesis and cultivation of this species for human feeding is inconceivable. Such species should be chosen with care.

## A NOVEL STRAIN OF *SPIRULINA* FROM SOUTHERN BRAZIL WITH POTENTIAL FOR CULTIVATION

MICHELE G. DE MORAIS<sup>1</sup>, FRANCIELI DALCANTON<sup>1</sup>, CAROLINA C. REICHERT<sup>1</sup>, ANDREI J. DURANTE<sup>1</sup>, JORGE A. V. COSTA<sup>1\*</sup>, LUÍS F. F. MARINS<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Biochemical Engineering, Federal University Foundation of Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brazil

<sup>2</sup> Laboratory of Molecular Biology, Federal University Foundation of Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brazil

\*Corresponding author. Address: P.O. Box 474, CEP 96201-900-Rio Grande, RS, Brazil; [dqmjorge@furg.br](mailto:dqmjorge@furg.br)

The cyanobacterium *Spirulina* has been important subject of biotechnological research due to its economical, ecological and nutritional importance (Rippka *et al*, 1989). This cyanobacterium grows naturally in alkaline lakes (e.g. Lake Chad in Africa) and is easily cultivated at a relatively low cost. Although hadn't describe in literature, Mangueira Lagoon is a natural place for *Spirulina* growing in Brazil due to their alkaline pH and high concentration of carbonates and bicarbonates. This Lagoon is in the southern Brazilian state of Rio Grande do Sul near the border with Uruguai. The isolated cyanobacterium was identified using molecular markers, as so as, morphologically analysis and chemical composition. Our main objectives were to isolate, identify and cultivate a strain *Spirulina* isolated from Mangueira Lagoon.

Samples water were collected aseptically from two points of the Mangueira Lagoon. Some samples water were concentrated by centrifugation, and all of them inoculated in triplicate in test tubes and Elisa plate in differents medium concentrations and pH, maintained at 30°C and 2500 lux. The first microalgae filaments morphologically similar to *Spirulina* were isolated using microscope and micromanipulator Narashige M-152 and inoculed in others test tubes and Elisa plate in same initial conditions. Three arbitrary *primers* were used to perform the RAPD methodology (Randomly Amplified Polymorphic DNA) for genetic analysis, comparing the isolated cyanobacterium with known strains LEB-52 and Paracas.

Strain isolated cultures were carried out in 1L closed photobioreactor with initial biomass concentration of 0.15gL<sup>-1</sup>, aerated diafragm pumps and 12-h light/12-h dark cycle, maintained at 30° C. Samples were taken at 24h intervals. The biomass concentration was determined by measuring optical density of the cell suspension at 670nm. The illumination effects (2500, 3500, 4500 lux) and supplementing lagoon water with different concentration of Zarrouk's medium (Zarrouk, 1966), (20, 60, 100%) was investigated using a Box-Behnken 3<sup>2</sup> complete factorial design with central point in triplicate. Was cultivated also strains LEB-52 and Paracas maintaing central point conditions of factorial design proposed. The samples were filtered, washed, dried (40°C) and pressed for analysis chemical composition. Protein percentage (Micro-kjeldahl) was determined by A.O.A.C. (1995), digestive protein (Portaria N° 107 do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária), lipids by Folch and Lees (1957), moisture by A.O.A.C. (1995) and ash by A.O.A.C. (1995). The morphological analysis was accomplished by optic microscope.

The genetic analysis proved that isolated strain is genetically different of strains LEB-52 and Paracas. The morphologically analysis and chemical composition confirm to strain isolated is *Spirulina* genus. Morphologically the three strains showed similar blue-green colour and arrangement of the multicellular cylindrical trichomes in an open left-hand helix along the entire length. *Spirulina* LEB-52, Paracas, isolated and *Spirulina maxima* (commercial) were analysed in chemical composition. Isolated strain presented the highest protein percentage (86%) and all strains presented digestibility among 78,4 - 86,5%. All investigated samples presented very similar lipids, ash and moisture contents.

*Spirulina* protein percentage is higher than fish meat (25%), soybeans (35%), powder milk (35%) and cereales (14%) (Henrikson, 1994). *Spirulina* doesn't have cell wall, it have soft polissacarides covering, relatively fragile. This explain its great digestibility (Costa *et al*, 2002). Therefore it doesn't need cook neither special treatment for good proteins digestibility. The isolated *Spirulina* had maximum specific growth rate ( $\mu_{max}$ ) of 0.222 day<sup>-1</sup> and 0.182 day<sup>-1</sup> in experiments with Zarrouk's medium 60% and illuminance of 2500 and 4500 lux, respectively.

Figure 1 presents maximum specific growth rate occurred in culture medium between 40-70% Zarrouk and illuminance of 4500 lux, the lower specific growth rate occurred in Zarrouk medium 100% and illuminance between 2500-4000 lux.

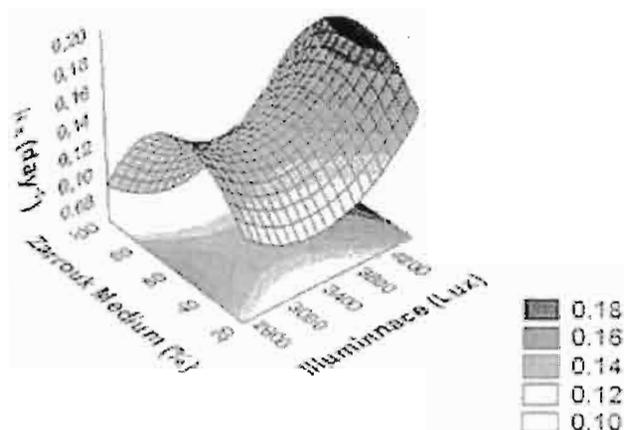


Fig. 1: Response surface and lines outline for specific growth rate ( $\text{day}^{-1}$ ) to *Spirulina* isolates function level illuminance and medium culture.

Due alkaline pH and high concentrations of carbonates and bicarbonates the water from Mangueira Lagoon can be used for *Spirulina* cultivation, with addition of carbon and nitrogen sources in small amount, reducing production cost (Costa *et al*, 2002). When cultivated under same central point condition, *Spirulina* LEB-52, Paracas and the isolated strain present 0.0802, 0.0735 and 0.122  $\text{day}^{-1}$ , respectively. This behaviour reflect to evaluate the doubling time of 8.6 days to LEB-52, 9.4 days to Paracas and 5.8 days to isolated, it doubling her biomass three days more fast others strains investigate. The maximum specific growth rate *Spirulina* isolates was 0.222  $\text{day}^{-1}$ .

## References

- A.O.A.C. Official Methods of Analysis of International 16<sup>a</sup> Edition. Arlington. Virginia. USA, 1995.
- Costa, J.A.V., Colla, L. M., Duarte P., Kabke, K. & Weber, A. 2002. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18, n.7, 603 – 607.
- Folch, J.; Lees, M (1957). A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509.
- Henrikson, R. (1994) Microalga *Spirulina*. Superalimento dei futuro. Barcelona:Ediciones S. A. Urano, ISBN 84-7953-047-2.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M. & Roughan, P.G. 1989 *Spirulina*: A source of dietary gamma-linolenic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 47, 85-93.
- 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*. Ph.D Thesis, Université de Paris

# COMMUNICATION TO THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON BACTERIOLOGICAL NOMENCLATURE

RIPLEY D. FOX

215 route de Jalaguière 34190 Laroque [ripleyfox@club-internet.fr](mailto:ripleyfox@club-internet.fr)

---

## Subject :

Request for name change of Genera (18 february 2004): Phylum Cyanoprochlorota; Order Nostocales; Family Oscillatoriaceae; Genus *Arthrospira*, or is it *Spirulina*?

There is confusion in nomenclature regarding the genus *Arthrospira*, which increases and becomes more widespread in the literature with each passing year. Even though the name, *Spirulina*, is used more often now to describe the commercial product, and the word, *Spirulina*, appears regularly today in scientific articles, one feels obliged each time when writing or speaking about the organism to explain that one is referring to the large organism (*Arthrospira*) wherein one sees clearly the interior cell walls between a series of cells under the light microscope, and not the very much smaller organism (*Spirulina*) wherein the cell walls between cells are not visible. This is a long and distracting exercise which should be discontinued.

The exact date when the confusion started is of minor importance. *Arthrospira jenneri* is mentioned in Hedwigia (1852) while the same organism is mentioned as *Spirulina jenneri* in British Freshwater Algae (1845). For 150 years taxonomists have utilized the names *Spirulina* and *Arthrospira* alternatively so that today the author who uses either name without explanation is sure to be attacked by purist taxonomists proclaiming the other name is the right one. Today (2004) there are approximately 12 commercial farms of between 1 and 50 hectares and more than 48 artisanal farms of from 25 to 3000 m<sup>2</sup> growing what they call *Spirulina*; and about 3000 tons of the product is sold to over a million people through health food stores and other outlets. More important, it is being proposed (and being used) as a recuperation food for seriously-undernourished (PEM (Protein Energy Malnutrition) children and refugees worldwide. It is time we settle on a name.

It is clear that the musical sound of the name, *Spirulina*, has an enormous advantage over *Arthrospira* for inducing people to eat the product. And the public now knows it by the name of *Spirulina*.

It is proposed that the genus name, *Spirulina*, be adopted for the Cyanoprokaryote as described in 1844 by Wittrock and Nordstedt in their *Algae aquae dulcia exsicc. fascicule XIV N° 679 de Descriptiones systematicae disposita*:

*“Trichomata aeruginea, stratum tenue saturate aerugineum formantia, fragilia, in spiram laxam et amplissimam, diametro 26µ ad 36µ aequantem contorta, ad genicula subconstricta apice leviter attenuata, haud capitata, 6µ ad 8µ crassa; anfractus 43µ ad 57µ inter sedistantes; articuli subquadrate, vel diametro breviores, 2µ ad 6µ longi, protoplasmate grosse granuloso dissepimenta vulgo obducenta farcti (v.s.) Hab. ditionen Uruguay, Americae meridionalis, prope Montevideo.”*

And it is proposed that the name, *Arthrospira*, be dropped from present usage. (*Spirulina* means little spiral and *Arthrospira* means spiralled article).

That leaves us with the problem of a name for the group of much smaller organisms having no visible crosswalls between cells of a filament when viewed under the light microscope – now known as *Spirulina subsalsa*, etc..

It is proposed that all the species names for this group remain the same as in T.V. Desikachary's *Cyanophyta*, Indian Council of Agricultural Research (New Delhi) 1959: as *subsalsa*, etc..

But it is proposed, because these filaments all are truly micro in size compared to the *Spirulina*, and as they resemble twisted strings, that the name to be given this genus is *Microcorde*. Thus, *Microcorde subsala*, *Microcorde labyrinthiformis*, *Microcorde meneghiniana*, *Microcorde laxissima*, *Microcorde subtilissima*, *Microcorde major*, *Microcorde princeps*, and *Microcorde gigantea*.

This solution will eventually be much to the advantage of all persons working with either or both of these two important genera.

May we assume that the International Committee on Bacteriological Nomenclature is in agreement?

# **SCIENCES BIOTECHNOLOGIE**



# ADAPTATION DES SOUCHES DE SPIRULINE DU SUD DE MADAGASCAR A LA CULTURE EN EAU DE MER

TSARAHEVITRA JARISOA<sup>1</sup>, LOÏC CHARPY<sup>2</sup>, NARDO VICENTE<sup>3</sup>, MARIE-JOSE LANGLADE<sup>2</sup>

<sup>1</sup> IH-SM B.P 141 Toliara 601- Madagascar

<sup>2</sup> IRD, UR167, COM, rue de la Batterie des Lions, 13007 Marseille, France

<sup>3</sup> Institut Océanographique Paul Ricard, Ile des Embiez. 83140- Six Fours les Plages

## Résumé

L'objectif de cette étude est de mettre au point un système simple de culture de Spiruline à l'échelle des communautés villageoises du sud de Madagascar. Nous avons utilisé la souche malgache que nous avons cultivée en eau de mer. Nous avons testé un milieu de culture constitué d'eau de mer traitée en précipitant le calcium et le magnésium avec des ajouts de 11g l<sup>-1</sup> de carbonate de soude et 1g l<sup>-1</sup> de bicarbonate de soude. En effet le calcium et le magnésium gênent la croissance de la spiruline. L'eau de mer traitée est enrichie avec du phosphore (0.5g l<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>H AYALA PO<sub>4</sub>), de l'azote (0.2g l<sup>-1</sup> de CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>) et du fer (0.01g l<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub>). Le traitement étant fastidieux et cher, nous avons aussi testé la possibilité de cultiver une souche péruvienne (Paracas) poussant naturellement dans des eaux riches en calcium et en magnésium en utilisant des traitements allégés.

Les récoltes obtenues dans deux bassins de 10 m<sup>2</sup> contenant des milieux de culture d'eau de mer traitée, enrichie et d'eau douce enrichie sont comparables de l'ordre de 2 g m<sup>-2</sup>j<sup>-1</sup> en moyenne pendant 3 mois. Les souches malgaches et paracas poussent toutes les deux en milieu marin non traité mais la biomasse obtenue en 15 jours augmente en fonction du degré de traitement de l'eau de mer. La culture en eau de mer est possible mais un meilleur rendement est obtenu après traitement (précipitation du Ca et Mg).

Mots clé : Spiruline, eau de mer, culture.

## Abstract

The aim of this study is to carry out a simple culture system adapted to village scale in south of Madagascar. We used the malagasy strain which we have adapted to seawater culture. The culture medium was obtained after treating seawater by precipitating calcium and magnesium with addition of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (11 g l<sup>-1</sup>) and NaHCO<sub>3</sub> (1g l<sup>-1</sup>). Indeed, the levels of calcium and magnesium found in seawater inhibit growth of *Spirulina*. The treated seawater is enriched with phosphorus (NH<sub>4</sub>H AYALA PO<sub>4</sub> : 0.5 g.l<sup>-1</sup>), nitrogen (CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> : 0.2 g l<sup>-1</sup>) and iron (FeSO<sub>4</sub>: 0.01g l<sup>-1</sup>). However the treatment of seawater in culture of *Spirulina* is expensive and time consuming. Therefore, culture tests were made with different treatments using *Spirulina* paracas, a strain isolated from Paracas in Peru, which naturally grows in waters rich in calcium and magnesium.

Harvested biomasses of *Spirulina* grown in seawater and in the standard bicarbonate medium (in 10m<sup>2</sup> ponds) were comparable, around 2 g m<sup>-2</sup> j<sup>-1</sup> (dry weight) during three mouths.

Malagasy and paracas strains both can grow in an untreated seawater medium, however after 15 days the biomass increases with the degree of treatment of seawater.

*Spirulina* culture in seawater is possible, but a better yield is obtained after treatment (precipitation of Ca and Mg)

Keywords: Spirulina, seawater, culture.

## Conclusions de l'étude sur la culture de *Spirulina platensis* en eau de mer

Cette étude menée de mai 2001 au mois de février 2004 constitue un premier travail sur l'adaptation de la Spiruline souche malgache (*Spirulina platensis* var. Toliara) à la culture en eau de mer.



*Spirulina platensis* variété Toliara

Elle a permis de formuler les conclusions suivantes :

Les conditions climatiques générales de la région étudiée (température de l'air, ensoleillement, précipitation) sont favorables au développement de la Spiruline. Bien que les paramètres physiques et chimiques du milieu de culture soient parfois inférieurs à l'optimum de 35°C, ils ne montrent pas des valeurs extrêmes susceptibles de perturber l'espèce Spiruline.

Des essais de culture en eau de mer traitée et enrichie (EMTE) dans différents récipients montrent une bonne adaptation de cette souche locale à ce milieu. Dans des flacons de 5 litres on obtient un taux de croissance  $\mu = 0,2$  doublement  $j^{-1}$ , légèrement supérieur à celui du milieu classique en eau douce enrichie (EDE),  $\mu = 0,14$  doublement  $j^{-1}$ . Dans un bassin de 10 m<sup>2</sup> le taux de croissance  $\mu = 0,2$  doublement  $j^{-1}$ , la production  $P = 1,9$  g m<sup>-2</sup> j<sup>-1</sup> et la récolte  $R = 1,9$  g m<sup>-2</sup> j<sup>-1</sup> sont comparables à ceux de EDE dans les mêmes conditions de culture,  $\mu = 0,2$  doublement  $j^{-1}$ ,  $P = 1,8$  g m<sup>-2</sup> j<sup>-1</sup> et  $R = 2$  g m<sup>-2</sup> j<sup>-1</sup>.

L'analyse chimique de la Spiruline produite en eau de mer montre qu'elle garde tous les éléments d'importance nutritionnelle (protéines 40%, vitamines et sels minéraux). Bien que certains éléments qui la composent présentent une teneur faible par rapport à la culture dans la littérature (65% de protéines) mais celle-ci est probablement due à la condition de culture que l'on peut améliorer. La comparaison du produit obtenu avec d'autres aliments classiques montre toujours son importance (6 t de protéines ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> contre 2,5 t pour le soja).

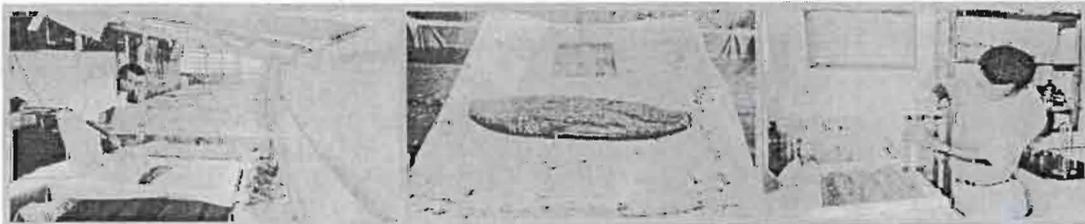
Le coût de production de la Spiruline en milieu synthétique est souvent très élevé entraînant le prix de vente de ce micro nutriment hors de portée de la population villageoise touchée par la malnutrition.

L'eau de mer est caractérisée par son pH autour de 8, limite inférieure requise pour le développement de la Spiruline, des traces de P, N et du Fe, éléments limitant en général le développement planctonique, une forte quantité de Ca et Mg respectivement 400 et 1200 mg l<sup>-1</sup>. Ces raisons ont permis de traiter l'eau de mer avec du carbonate de soude pour précipiter une certaine quantité de Ca et du Mg et d'enrichir en P, N et Fe.

Le test de tolérance de deux souches de spiruline : « Toliara » et « Paracas » à la culture en eau de mer ne montre aucune différence significative. On démontre aussi par ce même test que le traitement de l'eau de mer augmente la biomasse de Spiruline obtenue. Par contre il augmente le coût de réalisation d'une culture.

Sans tenir compte du coût de construction des bassins, la réalisation de culture en EMTE pendant un an dans un bassin de 2 m<sup>2</sup> et de 10 m<sup>2</sup> coûte 631 880 Fmg. Dans cette étude on essaie d'optimiser le coût de cette réalisation en mettant en oeuvre des techniques de culture simples mais efficaces, bien adaptées à la réalité d'un village.

Si on arrive à prouver la faisabilité de culture de Spiruline en eau de mer sans traitement mais enrichie (EME), ceci va faire chuter le coût à 388 880 Fmg. Dans le récipient de petit volume, les deux souches testées s'adaptent bien en EME. Il reste à démontrer cette adaptation dans le bassin de culture. Dans ce milieu (EME) même, la substitution de l'énergie électrique en énergies humaine et solaire à la culture réduit considérablement le coût jusqu'à 119 300 Fmg.



La maîtrise des différents paramètres d'une telle culture permet de mettre au point une unité de production à l'échelle villageoise pour lutter contre la malnutrition dans le Sud en particulier, et à Madagascar en général.

La malnutrition est un problème familial, or au niveau d'un village, une famille seule n'a pas la possibilité de maîtriser ce fléau. Il devient un problème régional, national et international. qui ne peut être traité que par des relations importantes à tous les niveaux. Il faut intervenir pour l'éradiquer. Malgré les efforts déployés par les organismes de développement (internationaux et nationaux) au cours des deux dernières décennies, la malnutrition reste un fléau dans le Sud de Madagascar. Les promoteurs du projet proposent des innovations techniques dans des populations rurales malgaches qui ont leur propre structure de fonctionnement. De nombreux projets de ce type ont échoués à cause de l'incompréhension entre techniciens « à mentalité moderne » et ruraux « à mentalités

traditionnelles » sur des objectifs différents. Les ruraux sont très stricts sur leurs traditions et aucune nouveauté n'a vu le jour sans le soutien des décideurs locaux. Il faut une concertation, et essayer de les convaincre avec une marque de respect pour obtenir leur accord.

Une stratégie de lutte qui semble efficace pour réduire la malnutrition est l'introduction de la culture de la Spiruline dans l'activité familiale et son incorporation à leur régime quotidien. La région du Sud est écologiquement favorable au développement de ce microorganisme. Malgré la présence des gisements naturels de Spiruline, elle reste un aliment nouveau pour la population rurale. De ce fait, une sensibilisation sur l'intérêt de son utilisation et la formation aux techniques de culture sont nécessaires.

L'effet bénéfique de l'ingestion de Spiruline est démontré par de nombreuses expériences, notamment pour la lutte contre la malnutrition. Même si ces études sont de nature préliminaire et que de plus amples recherches s'imposent, les résultats obtenus jusqu'ici sont prometteurs.

En milieu rural, il n'est pas toujours facile de convaincre les habitants à changer l'habitude alimentaire surtout chez les adultes. Je pense qu'il est beaucoup plus facile de convaincre les villageois à manger la Spiruline provenant de leur propre production que celle distribuée toute faite.

Par contre, chez les enfants, leurs choix nutritionnels dépendent souvent de leurs parents, et si les adultes refusent eux même de manger la Spiruline, ils doivent accepter de la donner à leurs enfants qui sont les premières victimes de la malnutrition.

La culture à l'échelle villageoise et familiale est réalisable mais on a besoin au départ d'une assistance technique par des spécialistes en la matière et surtout d'aides financières par des bailleurs de fonds.

Avant le démarrage de la culture familiale, une culture pilote servant de support pédagogique et de distribution de la souche doit être installée dans chaque village cible, de même qu'un centre d'achat équipé des matériaux et d'intrants à des prix abordables.

En se basant sur une production de  $6 \text{ g m}^{-2} \text{ j}^{-1}$  et l'ingestion de 5 g de Spiruline par jour et par enfant, une famille de trois enfants doit construire un bassin de  $2,5 \text{ m}^2$ . En pratique le groupement de 4 familles pour conduire une unité de production de  $10 \text{ m}^2$  est avantageux. En réalité, un investissement de 3 522 000 Fmg permet à un groupe de lancer une culture bien adaptée à la réalité d'un village pendant une année.

Outre les intérêts nutritif et thérapeutique que présentent la Spiruline, l'intérêt écologique de sa production est immense dans le sens où elle ne constitue pas un danger pour l'environnement. Elle permet aussi de valoriser des terrains incultes.

La Spiruline se trouve au début de la chaîne trophique. Cette position réduit le risque de transfert aux consommateurs d'importantes quantités de micropolluants comme les métaux lourds ou les pesticides par exemple. La haute alcalinité et le haut pouvoir tampon du milieu exigés pour le développement de la Spiruline limite considérablement le risque de contamination par des organismes pathogènes dans le milieu de culture. La qualité microbiologique du produit dépend de la propreté des matériels utilisés dès la récolte jusqu'à l'emballage des produits finis.

### **Quelques recommandations peuvent être proposées**

Améliorer les conditions de culture en augmentant la source lumineuse pour améliorer la production de culture en eau de mer.

Analyse élémentaire du produit obtenu en milieu EDE et cultivé dans les mêmes conditions qu'avec EMTE, à titre comparatif.

Introduire la Spiruline au menu quotidien de la population locale pour résoudre le problème de la malnutrition.

Vulgariser la culture de ce micro-nutriment en eau de mer dans les villages situés le long des littoraux du Sud de Madagascar.

## ESSAIS DE CULTURE DE LA SPIRULINE AU DOMAINE DE MEJANES (CAMARGUE)

R. RAKOTOARISOA <sup>1</sup>, A. RIVA <sup>2</sup> ET N. VICENTE <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>. Centre d'Etudes des Ressources Animales Marines (CERAM), Faculté des Sciences et Techniques de Saint Jérôme, 13397-MARSEILLE Cedex 20.

<sup>2</sup> Institut Océanographique Paul Ricard, Ile des Embiez. 83140- Six Fours les Plages.

---

### Résumé

La Camargue, située entre les bras du Rhône, constitue le Grand Delta. Elle est en partie protégée, et de nombreuses activités traditionnelles (élevage, pêche, chasse, exploitation du sel), et nouvelles (riziculture, vigne) s'y développent en bonne harmonie avec l'environnement. C'est le cas au Domaine de Méjanès situé au bord de l'Étang du Vaccarès d'une grande richesse floristique et faunistique.

La qualité des eaux du Vaccarès autorise des expériences de développement de la Spiruline (*Arthrospira platensis*), au niveau du laboratoire, et en bassins sous serre.

Ces expériences sont réalisées dans le but de créer une station pilote de formation à la culture de cette cyanobactérie sur le domaine de Méjanès.

Mots clés : Camargue, Vaccarès, Hydrobiologie, Spiruline.

### Abstract

The Camargue situated between the two arms of the Rhône constitute the "Great Delta". It is in part protected, and numerous traditional activities (breeding, fishing, hunting, salt working), and news (riziculture, vine) are developing in good harmony with the environment. It is the case of the Domain of Méjanès situated at the edge of the Vaccarès pond who has a high floristic and faunistic riches.

The quality of the water of the Vaccarès allows to experiment on development of the Spirulina (*Arthrospira platensis*) at the laboratory level, and in tanks under a greenhouse tunnel.

These experiments are realized with the object to create a pilot station for technical training, to cultivate this cyanobacteria on the Domain of Méjanès.

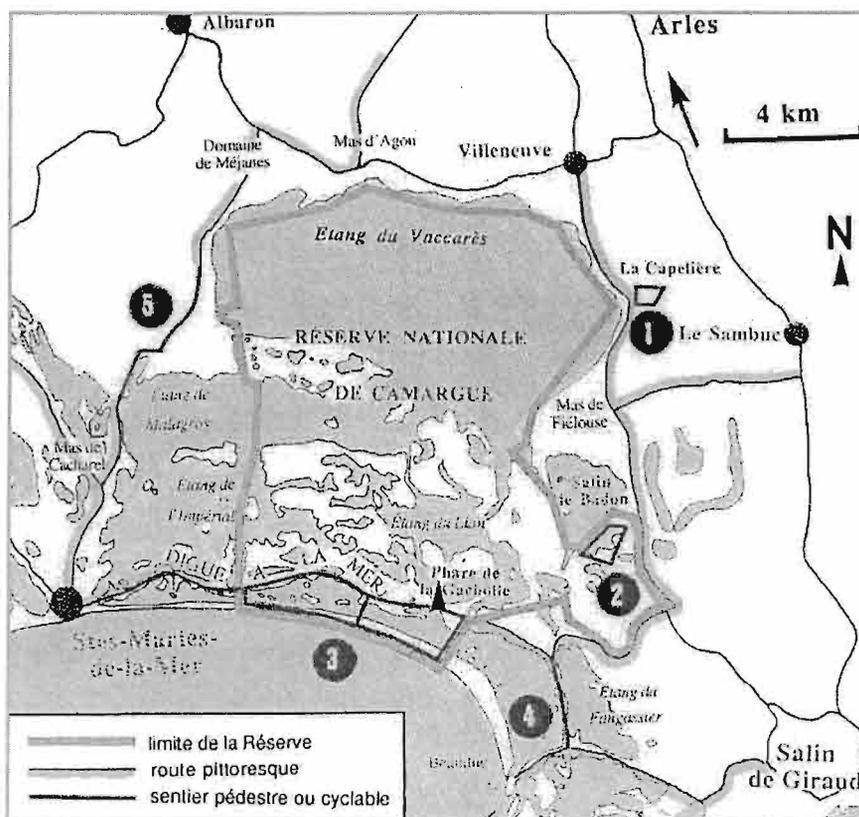
Keys words : Camargue, Vaccarès, Hydrobiology, Spirulina.

### Introduction

La Camargue qui occupe 145 300 hectares, constitue l'embouchure du Rhône sous la forme d'un delta triangulaire ayant pour base les rivages de la Méditerranée sur 80 km. Elle s'étend sur deux régions du Sud de la France : la région Provence-Alpes-Côte d'Azur (département des Bouches du Rhône), et la région Languedoc-Roussillon (département du Gard).

Le Grand Delta comprend la Petite et la Grande Camargue dont la pièce centrale est l'Étang du Vaccarès associé à d'autres petits étangs dits inférieurs au Sud.

Situé au Nord Ouest de l'étang du Vaccarès, le domaine de Méjanès a su concilier activités économiques et protection de l'environnement. Sa vocation première est la riziculture, mais par sa localisation géographique, ses conditions climatiques, et la qualité des eaux de l'étang, il a été choisi pour réaliser des expériences d'algoculture sur la cyanobactérie *Arthrospira (Spirulina) platensis*, appelée communément Spiruline dont les propriétés nutritives et sanitaires sont reconnues.



Une collaboration déjà ancienne avec l'Institut Halieutique et des Sciences Marines de Tuléar (Madagascar), notamment sur la culture de la Spiruline (*Spirulina platensis* var. Toliara), avec ses chercheurs (Ravelo, 2001, Tsarahevitra 2005, a-b) qui se consacrent à sa culture à des fins humanitaires, pour lutter contre la malnutrition, nous a convaincu de la nécessité de créer un outil de formation aux techniques de culture de cette cyanobactérie.

## Présentation du milieu

### Le Domaine de Méjanès

Site privilégié de découverte et d'observation de la faune et la flore camarguaises, le Domaine de Méjanès a su concilier protection de l'environnement et développement d'une activité économique et touristique importantes.

Situé au cœur du Parc naturel régional et en lisière de la Réserve nationale de Camargue, le Domaine Paul Ricard de Méjanès couvre 600 hectares en bordure de l'étang de Vaccarès. Chaque année, il accueille plus de 25 000 visiteurs et quelques milliers de scolaires. A pied, à cheval, en VTT ou en train, toutes les possibilités sont offertes pour apprécier, au plus près, les beautés de cette terre sauvage, berceau des taureaux, des chevaux et refuge d'oiseaux migrateurs. (Hoffman, 1958)

### L'étang du Vaccarès

Située entre le Petit Rhône et le Grand Rhône, la Camargue s'est formée sous l'action conjuguée du fleuve et de la mer Méditerranée. Elle est longtemps restée peu propice à l'installation humaine, d'une part à cause de la montée des eaux marines qui stérilisent les terres, et d'autre part des inondations résultant des crues fluviales.

Au 19<sup>ème</sup> siècle, l'endiguement total du delta du Rhône est réalisé par la construction en 1859 de la digue à la mer, et en 1869 de digues situées entre les deux bras du fleuve. Ces endiguements laissent apparaître une évidence : les crues du Rhône permettent de résorber le déficit hydrique de la Camargue. En l'absence de celles-ci, afin d'éviter une transformation radicale de la Camargue et une disparition de nombreuses zones humides, il faut amener artificiellement de l'eau douce du fleuve dans le delta.

Ces actions anthropiques conduisent à un fonctionnement très complexe de l'hydrosystème camarguais dont le Vaccarès est le centre. (Blondel et Hoffman, 1964).

### Caractéristiques géomorphologiques

Le territoire camarguais présente trois grands ensembles par rapport à l'étang central du Vaccarès en fonction de leur morphologie et de leurs milieux naturels :

- au nord de l'étang du Vaccarès, la Haute Camargue, d'origine fluviale est constituée de bourrelets alluviaux, vestiges des anciens bras du Rhône, et de faibles dépressions occupées par des marais d'eau douce. Les terres hautes, peu marquées par l'empreinte du sel peuvent être consacrées aux cultures (céréales, fruits et légumes). Elles portent parfois une végétation dense composée d'arbres de haute futaie.
- au centre, la moyenne Camargue, également appelée « île de la Camargue », est d'origine fluvio-lagunaire. Elle est composée de terres plus basses, légèrement plus salées et réparties en couronne autour de l'étang du Vaccarès. L'occupation du sol est partagée entre différentes activités : les grandes cultures (riz, blé, maïs), sur les plus hautes terres irriguées, l'élevage sur les zones intermédiaires où les remontées de sel se font sentir. Ces terrains appelés « sansouires », parfois immergés en hiver, sont couverts d'une végétation halophile, et constituent des pâturages d'été et d'hiver pour les chevaux et les taureaux.
- au sud, la basse Camargue, d'origine laguno-marine, représente une zone d'étangs salés et de sansouires. Les terrains, souvent situés au dessous du niveau de la mer, sont réservés à l'exploitation salinière.

### Caractéristiques physico-chimiques

S'étendant sur une superficie de 6480 ha, l'étang du Vaccarès présente la spécificité d'avoir une salinité croissante du Nord au Sud. Les valeurs relevées peuvent s'échelonner de 10g/l à 30g/l, la salinité moyenne étant de 15g/l. Cette variabilité s'explique par les conditions climatiques typiquement méditerranéennes dont bénéficie l'étang.

Le climat méditerranéen se caractérise par des étés chauds et des hivers plutôt doux. A ces températures élevées, s'ajoute l'action des vents qui soufflent plus de 200 jours par an. Les principaux sont le Mistral, vent froid et sec qui souffle du Nord-Ouest, et les vents doux et humides en provenance de la mer (sud-est de la Camargue).

Enfin, la faiblesse des précipitations, en moyenne 600 mm par an, associée à une évaporation de 1300 mm par an, entraîne un déficit hydrique. Celui-ci, provoque une remontée capillaire en provenance de l'aquifère salé de profondeur dont l'importance va croissant des étangs inférieurs jusqu'au littoral. De l'action conjuguée de ces différents paramètres résulte la variabilité de salinité de l'étang du Vaccarès (Marazanoff, 1972 ; Bardou, 1984).

Les apports d'eau à l'étang réalisés par l'agriculture sont de l'ordre de 500 mm par an, et se font principalement en période estivale. Cela correspond à un volume de 50 à 60 millions de mètres cubes.

Des apports d'eau douce permettent également de résorber le déficit hydrique grâce à des stations de pompage et des canaux d'irrigation existants.

Au niveau de la bathymétrie, cet étang est peu profond, en effet, il présente en moyenne une profondeur inférieure à 1 m, pour une profondeur maximale de 2m.

La température moyenne annuelle de l'eau est en moyenne de 14°C (Marazanoff, 1972), tandis que le pH avoisine 9,2.

L'analyse chimique de l'eau au début de l'été montre une absence de pollution minérale :

Nitrites (NO <sub>2</sub> ) : < 0.01 mg/l	Nitrates (NO <sub>3</sub> ) : < 0,1 mg/l
Chlorures (Cl) : 856 mg/l	Calcium (Ca) : 200 mg/l
Magnésium (Mg) : 316 mg/l	Sulfates (SO <sub>4</sub> ) : 1150 mg/l

Les teneurs en métaux lourds (cadmium, cuivre, plomb, et zinc) dosés dans les sédiments de l'étang sont inférieures aux seuils de contamination fixés par la législation européenne (tableau 1).

La flore et la faune :

La flore des étangs est fonction de leur salinité. Ce sont des *myriophylles* (3 à 6 g/l), des *potamots* (6 à 12 g/l), et des *zostères* (> 14 g/l).

Tableau 1 : Analyse des principaux paramètres dans les stations étudiées. Les teneurs en métaux lourds concernent les sédiments.

L'analyse de l'eau en période estivale fait apparaître la microflore ci-après :

Bactéries	2.107 cellules/ml	Nanoplancton <10µ	7 070 000 c./ml
Cyanobactéries	995 000 c/ml	Nanoplancton >10µ	471 000 c/ml
Coccolithophorides	157 000 c/ml	Euglènes	157 100 c/ml
Diatomées	750 000 c/ml	Dinoflagellés	262 000 c/ml

Analyse de l'eau et des sédiments de l'étang du Vaccarès

	PARAMÈTRES	STATION 9	STATION 10	STATION 11	STATION 12
J U I N	TEMPÉRATURE (°C)	20	21	24	-
	SALINITÉ (g/l)	0	0	18	-
	OXYGÈNE (‰)	16	10	19	-
	PROFONDEUR (cm)	20	40	40	-
	CADMIUM (ppm)	ND	ND	ND	-
	CUIVRE (ppm)	ND	ND	ND	-
	PLOMB (ppm)	19	18,8	18,2	-
	ZINC (ppm)	12,2	25,1	9,4	-
J U L L E T	TEMPÉRATURE (°C)	24	27	32	33
	SALINITÉ (g/l)	0	0	15	0
	PROFONDEUR (cm)	20	40	40	20
	CADMIUM (ppm)	7,2	7,2	6,6	7,2
	CUIVRE (ppm)	5,6	5,3	4,5	5,5
	PLOMB (ppm)	9,9	8,9	10,1	9,5
ZINC (ppm)	5,8	5,6	2	28,8	
A O Û T	TEMPÉRATURE (°C)	21	20	27	23
	SALINITÉ (g/l)	0	0	14	0
	PROFONDEUR (cm)	20	40	40	20
	CADMIUM (ppm)	7,1	7,2	6,6	7,4
	CUIVRE (ppm)	5,7	5,5	4,2	5,9
	PLOMB (ppm)	9,3	9,1	9,2	9,2
	ZINC (ppm)	10,7	6,7	ND	8,5

Bien qu'il n'existe pas de système d'évaluation pré-établi de la qualité de eaux pour les lacs et les étangs à partir des paramètres physico-chimiques tels qu'il en existe pour les eaux courantes (SEQ eau de l'Agence de l'eau, Ferretti, 2004), la lecture de ces données, permet de conclure à une eau de bonne qualité.

La faune est principalement constituée d'invertébrés euryhalins (mollusques, crustacés amphipodes, vers annélides), de poissons d'eaux saumâtres (anguilles, muges...), d'alevins d'espèces marines (dorades, lousps...), et d'espèces d'eau douce venues du Rhône (carpes, brèmes...).

### Essais de culture de la spiruline a Mejanes

En 1995, un lac naturel recelant de la spiruline avait été trouvé par Gilles Planchon en Camargue. Ce lac situé à proximité de l'usine Listel, bénéficiait de conditions particulières dans la mesure où celle-ci transportait dans ses rejets les éléments nutritifs nécessaires au développement de la spiruline (in Fox, 1999). Ces observations nous ont incités à tenter une expérimentation en utilisant l'eau du Vaccarès où existent d'autres cyanobactéries, et qui présente des qualités physico-chimiques a priori favorables.

### Matériel et méthodes

La culture de la spiruline en laboratoire doit reproduire les conditions du milieu naturel dans lequel elle se développe. Ainsi, les milieux de culture utilisés sont alcalins (pH de 9 à 11), ont une salinité de 10 à 30 g/l, et sont enrichis en éléments minéraux permettant une bonne croissance de la spiruline. L'agitation naturelle due aux vents est remplacée par l'utilisation de pompes. Cette agitation a une double fonction :

- d'une part, elle permet de créer une inégalité de la surface de l'eau pour que la spiruline capte le dioxyde de carbone qui constitue sa principale source de carbone ;
- d'autre part, elle permet d'éviter la formation d'amas de spiruline qui se dépose au fond dans le milieu de culture où la spiruline privée de lumière meurt.

La température optimale de croissance est de 35°C, cette valeur peut être obtenue grâce à l'installation de lampes électriques qui apportent également la lumière nécessaire à la photosynthèse.

Un suivi quotidien de la culture est nécessaire afin de vérifier et de contrôler les différents paramètres des milieux de culture. Ainsi sont réalisées par tranches de 4 heures des mesures de température, de salinité et de pH. Parallèlement, un comptage du nombre de filaments présents dans une goutte prélevée dans le milieu de culture, permet d'apprécier le développement ou la régression de la culture.

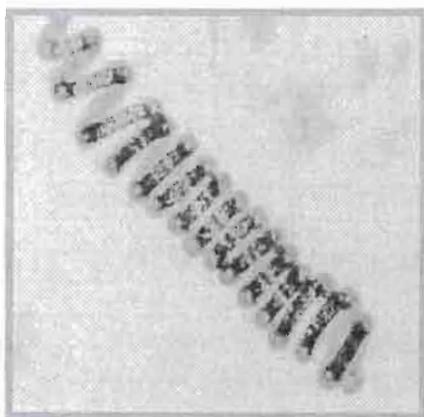
L'évolution de la culture est également mesurée grâce au disque de Secchi lorsque la culture est assez concentrée. La coloration de la culture constitue également un moyen d'estimer son développement, et de déterminer d'éventuels problèmes.

Le milieu de culture retenu est celui de J.P Jourdan (1999)

#### Essais de différentes souches

Pour débiter une culture de spiruline en laboratoire, une faible quantité de souche concentrée est suffisante (de l'ordre du ml). Pour la multiplier, des apports progressifs et réguliers de milieu de culture doivent être effectués.

Les souches utilisées sur le domaine de Méjanas sont la souche *paracas* (a) et la souche *platensis* var. Toliara (Ravelo, 2001) (b).



**a** : Souche *Paracas* observée au microscope    **b** : *Spirulina platensis* var. Toliara

A l'état naturel, la souche *paracas* se développe sur la base d'un fond argileux et d'une boue noire résultant de la fermentation anaérobie d'algues mortes (Tsarahevitra et al. 2004).

La souche *platensis* possède des spires plus resserrées lui donnant un aspect hélicoïdal, spiralé, auquel la spiruline doit son nom. La spiruline de Toliara a été classée taxonomiquement par Fox (1999) comme *Arthrospira platensis* var. Toliara. Elle se présente dans le milieu naturel sous forme de filaments enroulés régulièrement sans resserrement ni aux extrémités, ni au milieu. Cette variété de spiruline a été trouvée au Sud Ouest de Madagascar dans le lac d'Ankoronga (Ravelo, 2001).

#### Résultats

Les essais de culture des deux souches montrent que la souche *paracas* se développe mieux que la souche *platensis* aux conditions de température, de pH et de salinité égales. La souche *paracas* semble présenter de meilleures capacités d'adaptation au nouveau milieu de culture.

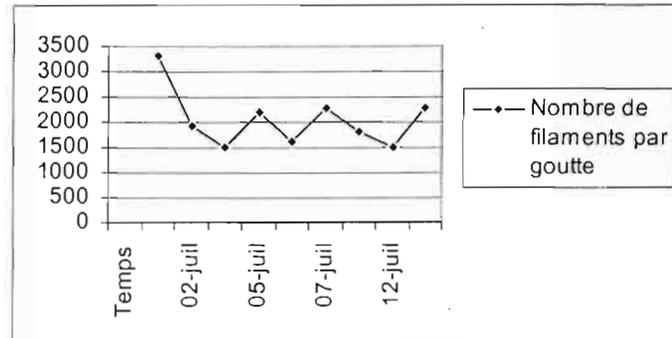
Un milieu de culture a été réalisé en mélangeant les deux souches et celles-ci entrent donc en compétition pour l'exploitation du milieu. Les observations effectuées durant les premiers jours ont montré une stagnation des deux souches. Au bout d'une semaine, une régression de la souche *platensis* a été constatée tandis que la souche *paracas* commençait à se développer. Cette situation s'est maintenue les jours suivants jusqu'à ce que la souche *platensis* disparaisse complètement du milieu de culture au profit de la souche *paracas*.

L'un des paramètres les plus importants pour une culture de spiruline, est la qualité de l'eau utilisée. Plusieurs milieux de culture ont été réalisés avec différentes eaux afin de procéder à une étude de

croissance comparative : eau douce courante du robinet, eau douce minérale, et eau de l'étang du Vaccarès.

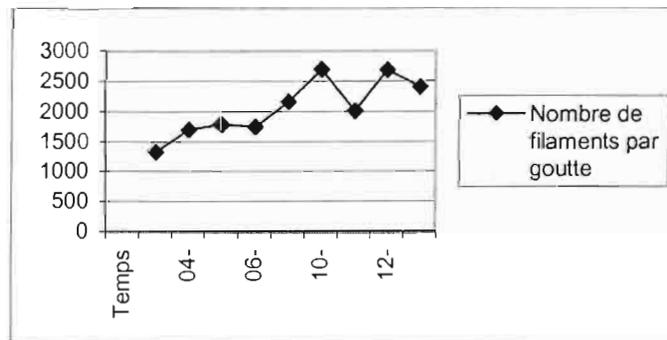
#### Eau douce du robinet

Elle permet d'obtenir des résultats satisfaisants, l'analyse du graphe ci-dessous indique que cette eau convient à la culture de spiruline, avec cependant une vitesse de croissance faible.



#### Eau douce minérale

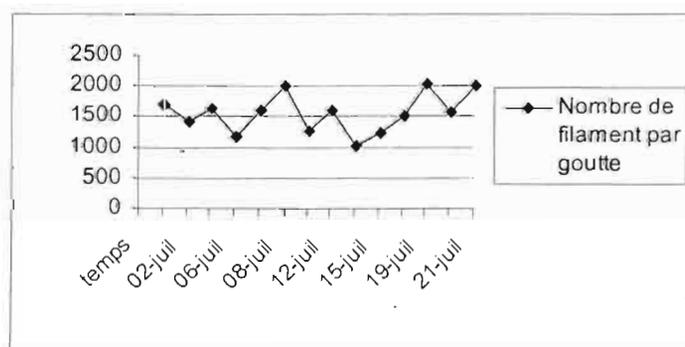
L'utilisation de l'eau douce minérale permet d'observer une bonne croissance de la culture. La qualité de cette eau permet d'effectuer des apports de milieu de culture tous les deux jours. Cela traduit une vitesse de croissance plus élevée de la spiruline ; celle-ci nécessite 3 à 6 jours d'attente avant de pouvoir procéder à de nouveaux apports. Cette eau minérale a permis de tripler le volume du milieu de culture (de 6 à 18 l) en seulement une semaine et demie. Des apports de milieux de culture plus espacés dans le temps (4 à 5 jours) auraient permis d'obtenir un nombre de filaments par goutte avoisinant les 4500.



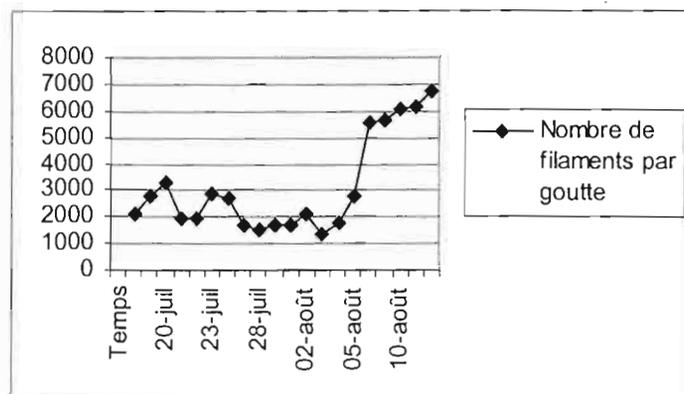
#### Eau de l'étang du Vaccarès

Elle a été utilisée en appliquant un protocole pour l'eau de mer à Tuléar (Tsarahevitra 2004), avec cependant de légères modifications. En parallèle, des cultures ont été menées avec la même eau sans aucun traitement préalable.

Comme l'indique le graphique ci-dessous, la spiruline se développe bien dans cette eau sans aucun enrichissement du milieu en éléments nutritifs. La valeur maximale de filaments étant de 2048, la minimale de 1015. Les diminutions observées sont consécutives aux apports de milieu de culture. Quatre à six jours sont nécessaires pour que la spiruline se développe et que le nombre de filaments augmente à nouveau.



Lorsque l'eau du Vaccarès est traitée et enrichie en éléments nutritifs, on peut constater que la culture se développe de façon plus importante. Le nombre de filaments peut atteindre 6000 filaments. L'augmentation progressive constatée au beau milieu de l'été (Août), correspond au passage de la culture du laboratoire à la serre installée pour une culture en grands volumes.



L'obtention d'un volume de 50l de souche concentrée en utilisant l'eau du Vaccarès va permettre de poursuivre la culture de la souche *paracas* dans un bassin de grand volume. Son remplissage se fera progressivement par la technique du « bassin à géométrie variable ».

Dans les conditions expérimentales retenues, il est possible d'envisager l'obtention d'une biomasse de spiruline sous la serre de 2 à 4 g/m<sup>2</sup>/j durant la période la plus chaude (juillet à octobre). C'est la production obtenue en eau de mer avec la souche malgache à Toliara par Tsarahevitra (2005 a-b).

### Perspectives

Les résultats des différents essais effectués avec l'eau du Vaccarès montrent qu'elle présente les qualités requises pour cultiver la spiruline. En effet ses caractéristiques physico-chimiques, sa salinité naturelle (en moyenne 15 g/l pendant les essais), son pH naturellement basique (aux environs de 9,2), ainsi que sa qualité microbiologique, en font une eau appropriée pour développer une culture de spiruline. L'enrichissement de cette eau en éléments essentiels à la croissance de la spiruline permet de conduire la culture dans de bonnes conditions.

La culture actuellement entretenue sous serre va permettre l'ensemencement d'un bassin de grand volume.

Le domaine de Méjanès possède les infrastructures adaptées pour la culture de la spiruline (terrain aménageable, locaux adaptés, accessibilité de la source d'alimentation en eau).

De plus, au vu des résultats obtenus, les eaux du Vaccarès offrent de réelles potentialités quant à l'usage pour lequel elles ont été utilisées.

A terme, l'objectif est la création d'une station pilote permettant de former des techniciens de pays intéressés, notamment ceux de l'hémisphère sud pour lesquels la spiruline peut constituer une solution pour lutter contre la malnutrition.

### Conclusions

Haut lieu de la « nature sauvage » en Europe, la Camargue constitue la première région productrice de riz en France métropolitaine. La riziculture y constitue l'activité économique principale, et se présente comme l'élément de base du développement économique et social de la région.

Bien que certains problèmes se posent au niveau de l'exploitation des milieux naturels en Camargue, les activités permettent un maintien de l'équilibre naturel. Ainsi, l'agriculture assure pour partie l'entretien du réseau d'irrigation et de drainage nécessaire à la valorisation des milieux. L'élevage apparaît comme une condition de l'entretien du milieu et de ses richesses naturelles. Le tourisme procure également un revenu complémentaire, et est désormais un objectif de développement.

La protection des milieux naturels de cette région s'est faite grâce à la création de réserves et du parc naturel. Cependant, l'exploitation des différents milieux camarguais peut conduire à des situations conflictuelles, les pratiques des usagers d'un même milieu étant souvent peu ou pas compatibles. C'est le cas de l'Étang du Vaccarès où les principaux usagers sont les riziculteurs, les protecteurs de l'environnement, et les pêcheurs. Les réunions des différents acteurs ont permis de parvenir à un

consensus appelé la règle des « trois 20 ». Celle-ci définit les niveaux d'eau ainsi que la salinité des étangs principaux permettant l'utilisation des eaux par chaque usager.

Les qualités du milieu, les infrastructures, et les compétences du domaine de Méjanès peuvent permettre la création d'une station pilote pour former des techniciens à la culture de la spiruline, et de diversifier ses activités. Les études menées au laboratoire et sur le terrain, permettent de conclure que toutes les conditions requises pour ce type de culture y sont réunies, à condition d'y consacrer un espace limité et du temps. Car, comme pour d'autres types d'activités culturelles, l'expérimentation de départ requiert patience, constance et minutie<sup>1</sup>. Les résultats sont conditionnés par la mise au point de milieux de culture propres à chaque souche, et dépendent des variations des paramètres physico-chimiques et biologiques du milieu naturel.

L'objectif principal est d'élaborer un protocole simple assurant le déroulement des diverses étapes de la culture, du laboratoire au terrain, ce protocole pouvant être appliqué dans des conditions artisanales par des techniciens de pays pour lesquels la spiruline peut être l'un des moyens de lutter contre la malnutrition. La station pilote de Méjanès pourrait ainsi devenir un outil de formation et d'expérimentation aux techniques de culture de la spiruline prenant en compte les propriétés du milieu aquatique environnant, et la climatologie particulièrement favorable. Une telle pratique n'apportera aucune nuisance au milieu, tout au contraire, elle contribuera à le valoriser, par la création d'un outil pédagogique, et d'une activité nouvelle pour la Camargue, d'un intérêt humanitaire indéniable.

### Bibliographie

- Bardou G., 1984. – Etude préliminaire de quelques caractéristiques de l'eau et des sédiments du Vaccarès (Camargue), et de leurs interactions avec la macrovégétation immergée.
- D.E.A-Ecologie Méditerranéenne, Université d'Aix-Marseille 3, 20 pp.
- Blondel J., Hoffman L., 1964. – L'originalité et le rôle de la réserve de Camargue. Groupe des Amis de la Réserve de Camargue, Arles, (France), 30 pp.
- Charpy L., Langlade M.J., Vicente N., 2004. – Les Cyanobactéries pour la Santé, la Science et le Développement. Colloque International, 3-6 Mai 2004, Ile des Embiez (Var-France) : +
- Ferreti S., 2004. – Analyse de l'efficacité d'un traitement par le sel pour lutter contre la prolifération des jussies (*Ludwigia*) en Camargue. Rapp. Maîtrise de Biologie des populations et des Ecosystèmes. Université d'Aix-Marseille 3, 16 pp.
- Fox R.D., 1999. – Spiruline. Technique, pratique et promesse. Ed. EDISUD, 246 pp.
- Hoffman L., 1958. – Station biologique de la Tour du Valat. *Wildfowl Trust Ann. Rep.* 9 : 154-156.
- Jourdan J.P., 1999 – Cultivez votre Spiruline. *Antenna Technologie*, Genève, 126 pp.
- Marazanoff F., 1972. – Contribution à l'étude des Mollusques dans les eaux douces et saumâtres de Camargue. Thèse d'Etat de Sciences Naturelles. Université d'Orléans, 323 pp.
- Ravelo V., 2001. – Bioécologie, valorisation du gisement naturel de Spiruline de Belalanda (Toliara, Sud Ouest de Madagascar), et technologie de la culture.
- Thèse de Doctorat de 3<sup>ème</sup> Cycle en Océanographie appliquée. IHSM Toliara, Madagascar, 160 pp.
- Ravelo V., 2005. – La spiruline à Madagascar. Colloque International : « Les Cyanobactéries pour la Santé, la Science et le Développement », Ile des Embiez, 3-6 Mai 2004.
- Tsarahevitra J., Charpy L., Vicente N., Langlade M.J., 2005.<sup>a</sup> – Adaptation des souches de Spiruline du Sud de Madagascar à la culture en eau de mer. - Colloque International : « Les Cyanobactéries pour la Santé, la Science et le Développement », Ile des Embiez, 3-6 Mai

---

<sup>1</sup> Au moment où nous mettons sous presse, la première production vient d'être obtenue sous serre (3,4 g/m<sup>2</sup>/J).

# NOVEL AND HIGH PRODUCTIVITY PHOTOBIOREACTOR, SPECIFICALLY DESIGNED FOR THE COMMERCIAL PRODUCTION OF CYANOBACTERIUM *SPIRULINA*, GREEN ALGA *HAEMATOCOCCUS* AND OTHER PHOTOPHILIC MICROALGAE IN GENERAL

MIAO JIAN REN

*Jiangxi Provincial Sciences & Technologies Commission, Jiang Xi Prov., P. R.China Add. No.44, Shi-Da Rd. South, Nanchang City, 330046 Jiang Xi Prov., P. R.China, mjr\_algae@hotmail.com*

---

## Abstract

*Cyanobacterium Spirulina* spp. and green alga *Haematococcus* are of microscopic plant, although they are biologically adaptable to a wide range of warm environments, the establishment and proliferation of itself with high productivity depend on selective nutrients, the suitable growth temperature (28 - 35°C), and need to optimize the light intensity (20k - 35k lux), and to maintain the pH value. However, these essential requirements are hardly met in the open pond systems. In view of the limitations and shortcomings as the low biomass productivity, the unavoidable contamination, etc. existed insuperable for the pond systems, some bioscientists and engineers both in China and in the world over, developed respectively certain forms of closed transparent photo-reactors, such as the tubular systems, bag-shaped reactors and fermenter-like bio-reactors. Although most of them could be used, to a certain degree, for the experimental algal culture, there still existed some hindrances of operational problems and growth limitations. Among these problems, are primarily the oxygen build-up in the growth medium and the overheating by the sun rays in summer season operation. The reason is that the cells of *Spirulina* spp. or *Haematococcus* are highly sensitive to the oxygen tension ( $pO_2$ ), which accumulates even up to 400% saturation, and the photoinhibition of the cells by the intensive light being of related problem that often occurred both in pond cultures and in those closed systems.

With these considerations, the author had invented and manufactured a totally different photobioreactor aimed for the production of *Spirulina* spp. or *Haematococcus* in particular, and other photophilic micro-organisms in general. This novel system, passed through months of field operation tests, proved to be superior in all aspects over the previous closed systems. The functional advantages of this vertical glass photobioreactor (VGPR) presented mainly was that it had basically overcome those growth limitations, i.e. the overheating of the cultural medium, the high tension of the dissolved oxygen (D.O.) and the problem of algal staining on the tubular walls for those previous forms. The structural features of the VGPR are illustrated as follows:

- the whole set consisted of three parts, i.e. (1) the coiled glass tube system that functions as the solar radiation receiver and in which, the large volume of algal culture medium being circulated; (2) the glass towers, by connected closely to the tubular section that acts dual roles: (a) for the extraction of the D.O. in the growth medium when passing through the tower and (b) regulation of the growth parameters for attaining an optimized condition and, (3) the pump system, which propels the medium circulating in the VGPR.

- the whole tubes and towers of the set were made of B & Si enhanced glass material with which forms a rational surface-to-volume ratio of ca 40, and being characterized of full orientation light acceptance, that ensures an extended day light hours and high efficiency photosynthesis of the cells.

- the VGPR was of such a flexibly joined section and was fully closed that it can be easily sterilised, thus ensures a strict and axenic monoculture in the whole cultivation process while excluding any of the external contaminants.

- the VGPR was set perpendicularly to the ground covering a land area of 5m, which was only about 8% of the area for the pond systems as compared on equal yields.

Owing to above mentioned features, the VGPR, from an economic point of view, showed a high performance of lower energy consumption, longer durability and higher flexibility and can be easily scaled up, that makes it a universal usefulness either for the mass production of *Spirulina* spp. or for the culturing of other micro-organisms.

## Introduction

In view of the rapid increment of China's population along with the booming economy, a growing concern for the acute high quality food supply for the people's health and living level, has led Chinese bio-scientists to the exploitation of those unconventional agricultural food sources as the potential

expanders. Almost these choices, the blue-green alga, *Spirulina* spp. or termed as *Cyanobacterium* being of high quality and high quantity of proteinous nutrients, which varies from 60 — 70% crude protein content according to strains, presents itself to be a unique non-agriculturally based food source for human beings today and tomorrow.

The *Spirulina* culture was initiated in China in 1983 with the techniques being first introduced from India (as gifts presented by Dr. L.V.Venkataraman, CFTRI, 1982), and then from France (by Dr.Ripley D. Fox, Laboratoire De La Roquette, 1985) and from Germany (by Dr. E. W. Becker, Med. University, Tubingen, 1987) by the author and his co-researchers of the *Spirulina* group under the Ministry of Agriculture, PR China, and since then, *Spirulina* has been developed as China's supreme and novel protein resource. At present day, increasing attention is being paid on the exploitation and utilization of *Spirulina* by many local governments at all levels and especially by those biotech entrepreneurs in the whole country. Meanwhile, some assorted *Spirulina* products as the fashionable green health foods, beverages and even as pharmaceuticals begin advent in the markets and have been getting popular acceptance. The situation of *Spirulina* culture has been witnessed fast expanding and the biomass production is becoming a great commercial venture throughout the country, and even in some regions, the local governments had taken it in their developing plans as a new grand food industry for the 21st century.

### **Open pond system performs its merits in present mass production of *Spirulina* or *Haematococcus* but there exist limitations for future development**

*Spirulina* spp. and *Haematococcus* are of microscopic plants, although they are biologically adaptable to a wide range of warm environments, the establishment and proliferation of itself with high productivity depend on selective nutrients, the suitable growth temperature (28- 35 °C), and need to optimize the light intensity (20k - 35k lux) and pH range (7.0 -9.5 - 10.5), etc. However, these essential requirements were hardly met in the open pond systems. As a result, people with full efforts in exploitation of the alga were sometimes getting setbacks or harvesting a poor yield.

In spite of the low biomass productivity they could gain, however, the large scale production of *Spirulina* is in full swing today in China. The production systems they used were based almost exclusively on the open pond pattern of the "raceway" type, which was essentially constituted by a single loop channel in which the cultural suspension was stirred in turbulent flow by a paddle wheel, etc. And now the cultural ponds scattered everywhere in the country, were made mostly of bricks and concrete materials. Certainly, this pattern is of relatively low construction cost, simple to be built and to be operated and can easily be scaled up to a hectare size or over as far as farmers concern.

Nevertheless, according to the author's investigations in recent years, all these open pond systems unavoidably suffered in several aspects from drawbacks and limitations: firstly, the whole productive process was always fluctuating in natural climatic conditions, although in the south part of the subtropical zone of China, the start culture of the alga must wait until the early summer (May) and the cultivation season lasts only to the mid-autumn (October). Even in this short cultural duration of the year, there often come the attacks of heavy rains, typhoons and lasting cloudy days. As a result, the biomass production were timelessly interrupted or otherwise the end-products spoiled. Secondly, the growth medium, although selective enough, can only ensure few weeks of clean cultivation, after a limited period, the contaminants from inside or outside environments as hetero-algae, zooplanktons, insects and its larvae, even the radioactive fallouts and those chemical pesticides, were frequently recorded in the cultural ponds. In addition, the energy consumption rate of the pond system was rather high in comparison with its biomass output. And thirdly, in a large raceway pond, in order to attaining a certain degree of mixing effect (turbulent flow), the cultural depth must be retained at not less than 18 cm, this means that at least 180 litres of water per square metre should be moved and handled all day long in the hope of producing 10 - 15g biomass (dry wt.)/m-d. Besides, the investment costs for the construction of such pond system along with its infrastructures were rather high, and the larger the cultural ponds, the higher the hired land and its auxiliary construction costs.

### **Research on tubular system was the right orientation although there existed drawbacks**

Considering all those limitations and shortcomings of the pond systems, some bioscientists and engineers in China and the bio-groups in the world, had oriented their research work towards the development of an unconventional way for *Spirulina* culture, which should be fully closed and compact with high surface-to-volume ratio and all the growth factors be optimized. With these desired characteristics as the main goals, some forms of designs as the tubular systems, bag-shaped reactors,

and fermenter-like bio-reactors etc., had in certain aspects succeeded when used in the experimental culture. However, few of these forms could be applicable in the pilot scale, not saying that to be practised in the commercial production. The reason was that there still existed some obstacles of operational problems and growth limitations. Amongst them, are primarily the oxygen build-up in the growth medium and the overheating by the intensive solar radiation when operating in the summer season. This is because the cells of *Spirulina* spp. are highly sensitive to the oxygen tension ( $pO_2$ ) and the overheating ( $> 38\text{ }^\circ\text{C}$ ) when cell concentration over 35 - 40 mg/ litre, the algal growth and biomass would be inhibited in this case, especially in the midday light hours. Besides, the problems of leaks when plastic tubes being used, the poor circulation of the growth medium and the algal staining on the wall of the tubes, etc., gave eventually an uneconomic result.

### **The hindrance of Oxygen tension remained for those improved tubular photoreactors**

In these cases, some bio-groups in France, Israel and Italy etc. had been exploring certain improved tubular systems with special attention being paid on the oxygen build-up in the growth medium. For which, some groups tried a way of degassing oxygen every 30 - 40 minutes in the degassing stations, and set up a maximum length-to-flow velocity ratio in the system, while others sparge their reactors with air and/or  $N_2$  bubbling at the bottoms for the purpose of removal of the oxygen. All these efforts and measures adopted in some degree, had made much more progress to the tubular forms, some could even be applicable in a pilot cultivation scale or rather perfectly used in a laboratory. But as far as the author knew, these systems still had some distance from the practical applications or far from the commercial production of the algae. The basic problem for those reactors was that there still existed the  $O_2$  build-up, mainly the dissolved oxygen (D.O.), which can be still high up to an inhibitory level of 20 mg /l in the peak hours of photosynthesis. And secondly, it was difficult to scaling up to a commercial production level. This is due to most of the types can extend its unit frame to only a few feet high (otherwise, they should be placed horizontally and that will occupy a large land area), and lastly, the connection of these units of its kind into series, appears technically and economically inefficiency.

### **Novel type of Vertical Glass Photobioreactor (VGPR) eradicates any $O_2$ build-up and can easily be scaled up for mass production of high quality *Spirulina* spp.**

In view of above-mentioned limitations and drawbacks, the author, based on his thirteen years' experience in *Spirulina* culture and biomass production, had specifically designed and manufactured a totally different kind of photo-bioreactor. This novel system has basically overcome those shortcomings of overheating of the growth medium, the high tension of dissolved oxygen (D.O.), and the algal staining on the inner wall of the tubes, etc. After months of field cultural operation, it proved to be best suitable for the commercial production of *Spirulina* spp. in particular and other photoautotrophic micro-organisms in general.

When outlining the features of the vertical glass photobioreactor (VGPR), there are several major structural differences in comparison with all the previous types of tubular reactors. First of all, the whole set constituted of three parts, that is: (1) the dozens array of horizontal glass tubes, which were connected to a desired length and took a double coiled compact form. By this form of tubular section, the system functions not only as a solar radiation receiver of full orientations, but also allows filling enough volume of growth medium and that maintains a speedy flow (50 cm/s) circulating inside the tubes. (2) the glass towers, which connecting to the top and bottom valves of the arrayed tubes, with one tower acting for the extraction of D.O. from its installed degassing device, and with the other tower,  $CO_2$  being added, temperature regulated (cooling in summer, heating in winter), the pH maintained and the medium refreshed and, (3) the pump system, with which, the medium being propelled circulating from the tube section to the towers and vice versa. The deoxygenation was occurring simultaneously along with the medium circulation. The whole combination of the set took a space of 5 metres in both height and width, 0.8 metres in depth and occupied a ground area of five square metres.

As for the functional performances, the VGPR, passed through a running test of four months, proved to be superior in all aspects over that of pond systems, and in deoxygenation and other merits over previous forms of reactors. The advantages of the VGPR could be highlighted as follows:

- this novel VGRP makes an optimum balance of the biological requirements of the micro-organisms with the physical performance of the engineered system, i.e. the cultural temperature can be effectively controlled, the light conversion efficiency be maximized and the pH value be dynamically

regulated, etc. Owing to these main parameters being substantially optimized, that the VGPR keep a mode of sustaining and continuous operation, thus it ensures the algal biomass being produced in all seasons and in whatever geographical locations.

- due to the whole set (tubes and towers) was made of boron and silicon enhanced glass materials (which is available and cost reasonable in China) and has a structurally rational surface-to-volume ratio of ca 40, so that a full orientation of light acceptance being achieved in the daytime with respect to the sunshine, and in the night to the artificial light. These features favoured not only with an extended light duration and a high efficiency of photosynthesis of the algal cells, but also with a longer working life. Besides, with this novel Biotron, the problem of over saturation of light intensity could be effectively controlled, therefore, the photoinhibition and the dark respiration can be checked down to the lowest level. As a result, an averaged daily biomass of 1,000g (dry wt.) that means a higher productivity of 35 g (dry wt.) / m<sup>2</sup>. d, had been produced from this unit.

- deoxygenation, especially the D.O. is most vital to the algal cell growth, either in the closed systems or in the open ponds. There were several methods as stirring, air bubbling or N<sub>2</sub> filling, etc. which were usually used by those system for the repelling of oxygen out from the growth medium. Certainly, they had some degassing effects on the free oxygen, but had little effect on the D.O. However, for the VGPR, a specific physical way was invented and introduced on it by the author, with which an inherent and efficient extracting of the dissolved oxygen (D.O.) was fully succeeded and in the same time, not least to endanger the well-being of the algal cells. With this innovative degassing device being installed on the VGPR, the obstacle of the oxygen build-up in the growth medium has been basically eradicated even in the peak hours of the day. This merit of the VGPR favours greatly to the algal cells with a high efficiency of cell photosynthesis and a high rate of algal biomass.

- due to each tubular section of the VGPR was flexibly joined that formed the whole set being fully closed and in an easily sterilised condition. In addition, a deionized medium water was used, which was produced by a separate equipment, and the growth medium in the VGPR was kept a fixed flow speed, consequently, it ensured a strict and axenic monoculture running in the system while any external contaminants being effectively barred. This is why a VGPR could be best suitable to produce certain defined biochemicals as polysaccharides, pigments, lipids, or unsaturated fatty acids, etc. Therefore, it is of particular significance by using the VGPR for the development of new products from *Spirulina* spp. or for culturing certain high value micro-organisms.

- the harvest mode of the VGPR was taking filtering the whole culture out from the medium at one time through the bottom valve, and at the same time, recycling the filtered medium back into the system, by refreshing it with some nutrients supplements. Meanwhile, in the reacting towers of the VGPR, there was always retaining part of the growth medium during each harvest operation. This advantage helps to realize a continuous cultivation of the algae with no necessity of reinoculating the growth medium. With this mode, the cultivation period between last and next harvesting operations could be shortened and the productivity be significantly raised.

And lastly, the VGPR was set perpendicularly to the ground and covered a land area of 5m<sup>2</sup>, i.e. only about 8% of the area for the pond system as compared on equal yields. Besides, as the whole set runs independently, and gives a high biomass productivity that facilitates several dozens of VGPRs making one more production lines, or scaling up to an industrial production level.

## Conclusion

The structural and functional features of the VGPR, which presented in the field test running had proved to be superior in all aspects over that of pond systems and in main parameters over previous photoreactors. Especially, from the economic point of view, the VGPR performs higher growth rate (35g dry wt./m<sup>2</sup>.d), lower energy consumption (2.5 kw), longer durability (15 years of working life or above, under normal conditions) and highly flexibility (which can be constructed on or moved to any geographical locations), that makes it of universal usefulness either for the commercial production of *Spirulina* spp. or for the cultivation of other high value micro-organisms. In the case of the VGPR being used in the local farms, however, it needs some skills and trained persons. Besides, a transparent protection shelter or a green house should necessarily be built so long as the mass production of *Spirulina* being running throughout the year.

## SPIRULINA PLATENSIS BIOACTIVE COMPOUNDS ON RICE TISSUE METABOLISM

G. ZULPA, M. STORNI, M. CATALÁ, A.M. STELLA AND M.C. ZACCARO

Facultad de Ciencias Exactas Naturales, Universidad de Buenos Aires, Intendente Güiraldes 2620  
(C1428EHA) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, [cyanob@bg.fcen.uba.ar](mailto:cyanob@bg.fcen.uba.ar)

---

### Summary

*Spirulina platensis* biomass protein aqueous extracts could replace costly synthetic kinetin to prepare culture media in order to obtain rice calli regeneration.

### Introduction

Cyanobacteria produce a variety of compounds with biological activity including antibacterial, antifungal, algicides, toxins, pharmaceuticals, exopolysaccharides, vitamins, amino acids, polypeptides, exoenzymes and plant growth regulators (Metting & Pyne, 1986). Plant growth regulators from cyanobacteria are auxin, cytokinin, gibberellin like substances, that have been scatterly used in plant tissue cultures. Wake et al. (1991), proved that marine cyanobacteria biomass extract promoted somatic embryogenesis in carrot (*Daucus carota* L.) tissue cultures. Subsequent studies showed that the stimulation was due to a protein (Wake et al.1992). Extract of *Plectonema boryanum* had a similar effect in sandalwood, *Santalum album* (Bapat et al. 1996). In our laboratory we found that *Microchaete tenera* and *Tolypothrix tenuis* extracellular products replaced the effect of plant growth regulator 6- benzyladenine on rice callus organogenesis (Zaccaro et.al. 2002, Storni de Cano et al. 2003).

The aim of this work was to study the effect of *Spirulina platensis* biomass extracts on the metabolism of rice callus with regeneration capacity.

### Material and methods

*S. platensis*, was cultivated in Zarrouk culture medium, in a semi-continuous system (45  $\mu\text{mol photon m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , photoperiod 12 :12 and 30 °C).Metanolic extract (EM) X and 1/2X, non protein aqueous extract (Eanp) X and 1/2X and protein aqueous extract (Eap) X and 1/2X were prepared with fresh biomass (1/2X: diluted to half the concentration). Eanp was obtained by filtration of the extract through a sterile 0.22  $\mu\text{m}$  Millipore membrane of nitro-cellulose (high protein binding). Eap was filtrated through sterile 0.22  $\mu\text{m}$  Millipore membrane of cellulose acetate (low protein binding). *Oryza sativa* c.v. Yerua sterile embryos were grown in Murashige & Skoog (MS) culture medium supplemented with 2 mg 2,4 diclorophenoxyacetic acid (2,4 D)/L., 30 g sucrose/L and 7.5 g agar/L, at  $26 \pm 1$  °C in the dark. After 30 days percentage callogenesis was determined. In order to determine their regeneration capacity, these calli were incubated in MS medium added with 1mg kinetin/L under 45  $\mu\text{mol photon m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , photoperiod 16:8 and  $26 \pm 1$  °C. After 30 days percentage regeneration was assessed.

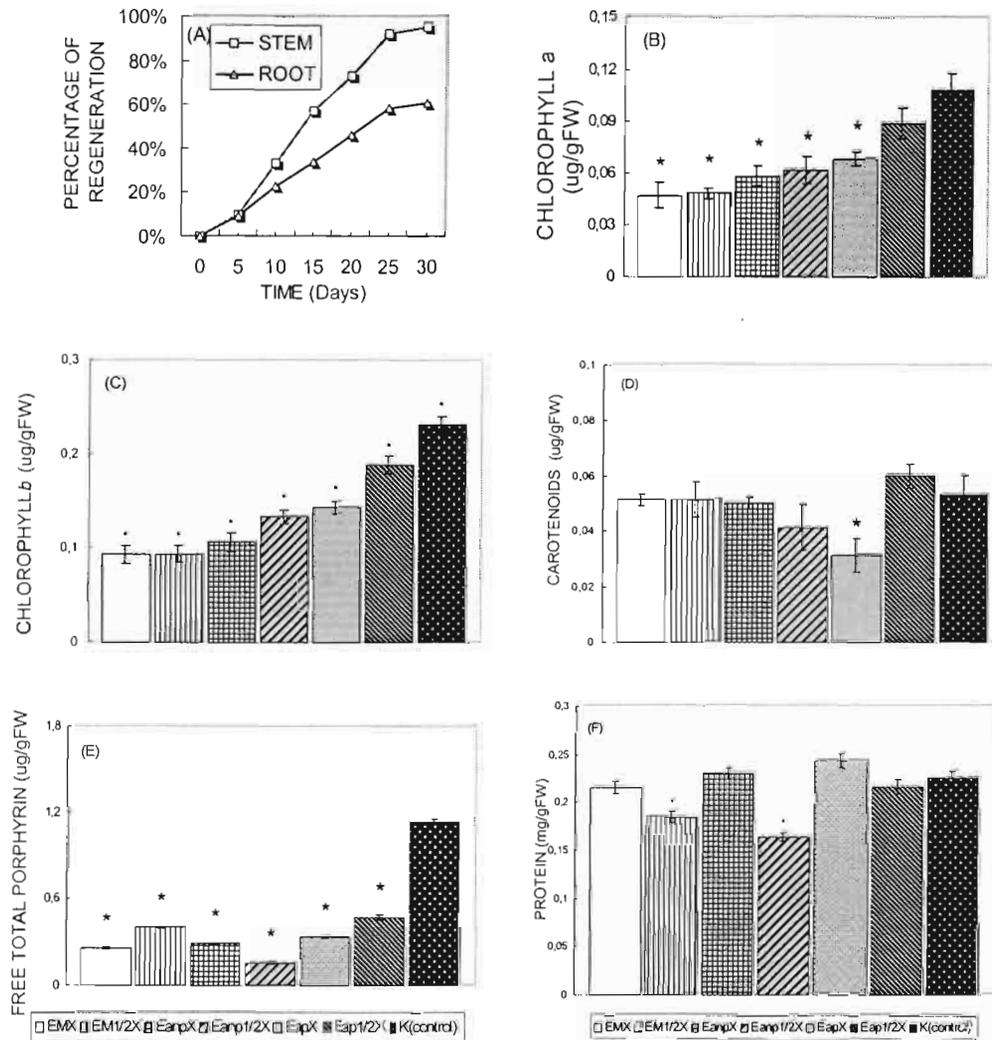
Thirty day old rice calli (non regenerated) were cultivated in MS plus 5% of the cyanobacterial extract for each treatment: EM X, EM 1/2X, Eanp X, Eanp 1/2X, Eap X and Eap 1/2X. Kinetin (1 mg/L) was the control. After 30 days, chlorophylls, carotenoids, total free porphyrin and protein were determined in calli crude extract according to Storni de Cano et al. (2003).

### Results and discussion

The percentage of callogenesis was 97 %. These calli were able to regenerate by organogenesis by 95% (Figure 1-A). Eap 1/2X produced calli with the same chlorophyll *a* content as the control. The other treatments produced significantly lower contents (Figure 1-B). Chlorophyll *b* content was lower in all the treatments (Figure 1-C). Carotenoids decreased 40% only in EapX, with no significant differences in the other treatments (Figure 1-D). Similar effects were observed by Zaccaro et al. (2002) with extracellular products of *Microchaete tenera*. On the other hand *Tolypothrix tenuis* and *Synechococcus* sp. products increased pigments content of regenerated calli (Storni de Cano et al., 2003; Wake et al., 1992). Total free porphyrins content was lower than control, by 58-86%, in all the treatments (Figure 1-E) and protein only decreased in EM1/2X (19%) and Eanp1/2X (28%) (Figure 1-F). This result does not coincide with Storni de Cano et al (2003).

Eap1/2X might have a natural product that could replace synthetic kinetin to prepare culture media for rice calli. More research is needed to explain the various effects obtained with bioactive products from different cyanobacterial species.

Fig.1 A-F. Rice calli percentage regeneration with kinetin (A). Effect of *Spirulina platensis* biomass extracts on chlorophyll *a* (B), chlorophyll *b* (C), carotenoids (D), total free porphyrin (E) and protein (F).



## References

- Bapat V.A., Iyer R.K., Rao P.S. (1996) Effect of cyanobacterial extract on somatic embryogenesis in tissue cultures of sandalwood (*Santalum album*). *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences* 18:10-14.
- Metting B., Pyne J.W. (1986) Biologically active compounds from microalgae. *Enzyme Microb. Technol.* 8:386-394.
- Storni de Cano M., Zaccaro M. C., García I., Stella A. M., Zulpa de Caire G. (2003) Enhancing rice callus regeneration by extracellular products of *Tolypothrix tenuis* (Cyanobacteria). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19:29-34.
- Wake H., Akasaka A., Umetsu H., Ozeki Y., Shimomura K., Matsunaga T. (1992) Promotion of plantlet formation from somatic embryos of carrot treated with a high molecular weight extract from a marine cyanobacterium. *Plant Cell Rep.* 11:62-65.
- Wake H., Umetsu H., Ozeki Y., Shimomura K., Matsunaga T. (1991) Extracts of marine cyanobacteria stimulated somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Plant Cell Rep.* 9:655-658.
- Zaccaro M.C., Stella A.M., Garcia I., Eberle A., Díaz M., Storni de Cano M., Zulpa de Caire G. (2002) Organogenesis induction in rice callus by cyanobacterial extracellular products. *Phytomorphology* 52:263-271.

# MINERALS REQUIREMENT FOR *SPIRULINA PLATENSIS* (*A. PLATENSIS* PCC 8005) GROWTH BY ICP-ES DETERMINATION AND CONTINUOUS CULTURES.

GUILLAUME COGNE<sup>1</sup>, BERND LEHMANN<sup>2</sup>, CLAUDE-GILLES DUSSAP<sup>1</sup>, JEAN-BERNARD GROS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>LGCB, Université Blaise Pascal, CUST, 24 avenue des Landais, BP 206, 63174 Aubière-cédex,  
France.

<sup>2</sup>ESA – Estec, Keplerlaan 1, Postbus 299, 2200 AG Noordwijk, The Netherlands.

Uptake of minerals and trace elements were characterized in continuous cultures of *Spirulina platensis* under photoautotrophic conditions. The values of yield coefficients were determined using inductively coupled plasma emission spectroscopy (ICP-ES). Further simplifications of Zarrouk culture medium proved possible, mainly in the trace element solutions. Concentrations of some elements, namely Mn, Zn, Cu, Mg, were lowered and trace elements B, Mo, V, Cr, Ni, W and Ti were omitted. A minimum medium for growth and maintenance is proposed.

Keywords: *Arthrospira platensis*; trace elements; yield determination; medium composition.

## Introduction

The potential of cyanobacteria mass culture, especially of *Spirulina platensis*, for producing a variety of industrially important products or for food has been recognized for a long time. The feasibility of mass production depends heavily on the optimal utilization of solar energy and of elements such as carbon, phosphorus, nitrogen, and trace elements. Although considerable attention has been directed to understanding the inorganic nutrition of cyanobacteria with respect to phosphate, nitrate and major cations, little information is available regarding trace elements.

In the present study, both mineral and trace element concentrations were measured using inductively coupled plasma emission spectroscopy (ICP-ES). Yield coefficients were determined in continuous cultures of *Spirulina platensis*. From these results, simplifications of the most commonly used growth medium described by Zarrouk (1966) are suggested.

## Materials and methods

The strain used in this study was *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis* PCC 8005). The culture medium was adapted from the buffered medium defined by Zarrouk. The only introduced change dealt with the proportions of the carbonate-bicarbonate buffer, which gives a pH equal to 9.5. The basal medium was thus as follows (g.L<sup>-1</sup>): NaCl 1.0; CaCl<sub>2</sub> 0.03; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.2; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5; NaNO<sub>3</sub> 2.5; NaHCO<sub>3</sub> 10.5, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7.6; EDTA 0.08; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.01. The growth medium was prepared using double-distilled water and subsequently filter-sterilized. 1 mL per medium liter of two trace element solutions is added: solution A<sub>5</sub> (in g.L<sup>-1</sup>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2.86; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O 1.81; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.22; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0.08; MoO<sub>3</sub> 0.015) and solution B<sub>6</sub> (in g.L<sup>-1</sup>, NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub> 0.023; KCr(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.12H<sub>2</sub>O 0.096; NiSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.048; (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Co.6H<sub>2</sub>O 0.044; Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0.018; Ti<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> 0.040).

All the cultures were grown in a New Brunswick 5-L working volume cylindrical photobioreactor (Bioflo III, New Brunswick Scientific, EDISON, N.J., USA), of inside diameter 17 cm, stirred with a six-bladed Rushton turbine. Rotation speed was 200 rpm. Light was provided radially by twelve halogen lamps (Sylvania, 20 W/BAB 36°). The reactor set-up was operated in continuous mode. The light flux was set at 122 W.m<sup>-2</sup> and 150 W.m<sup>-2</sup>, depending on the culture. Standard culture conditions were pH 9.5 ± 0.1 and temperature was 36 ± 1°C. Fresh medium was fed to the culture at a flow rate of 0.042 L.h<sup>-1</sup>, i.e. a dilution rate D of 0.0085 h<sup>-1</sup>, and the culture volume was kept constant by pumping culture broth from the vessel at the same flow rate. Control experiments were also performed using a culture vessel containing the growth medium and the metal ions but no algae.

The samples were collected and assayed as follows. Biomass was determined by culture turbidity at 750 nm using a Dr. Lange CADAS 50 spectrophotometer (Dr. Lange Benelux, NL). For ICP-ES analysis, samples were taken at various time intervals to assay residual metal in the aqueous solutions after filtering through 0.22 µm Millipore filters. As adsorption of metal ion on filters has been reported, we checked that the filters selected (cellulose ester) did not adsorb significant amounts of trace elements compared with their concentrations in the culture medium. Measurements were carried out using a Jobin-Yvon TYPE JY 24 (F) spectrometer. The instrument was calibrated using SPEX CertiPrep quality control standards.

In continuous cultures at steady-state, the yield coefficient of an element on biomass  $Y_{TE/X}$  was obtained by:

$$Y_{TE/X} = \frac{\bar{C}_{in} - \bar{C}_{out}}{\bar{X}_{obs}}$$

## Results

Results from the control experiments indicated that less than 3 % of the metal ion was lost during culturing, sampling and analyses. This confirmed that any observed decrease in residual metal concentration in the experiments could be attributed to uptake by algal cells.

Table 1. Precision and accuracy  $\Delta$  in the ICP methods used in the determination of the initial element concentration in Zarrouk medium;  $\Delta = t_{0.975} S_{\bar{x}} / \bar{X}$ .

Element consumption yields in continuous cultures of *A. platensis* (F0 = 150 W.m<sup>-2</sup>, T = 36°C)

Element	Concentration (mg L <sup>-1</sup> )	$\Delta$ (%)	Yield $Y_{TE/X}$ (g g <sup>-1</sup> dry weight)
<b>ZN</b>	<b>0.053 ± 0.004</b>	<b>7.5</b>	<b>7.12 ± 0.46 × 10<sup>-6</sup></b>
Fe	1.513 ± 0.032	2.1	5.89 ± 0.025 × 10 <sup>-4</sup>
Mn	0.390 ± 0.007	1.8	1.79 ± 0.02 × 10 <sup>-5</sup>
Mg	15.8 ± 0.2	1.3	2.05 ± 0.03 × 10 <sup>-3</sup>

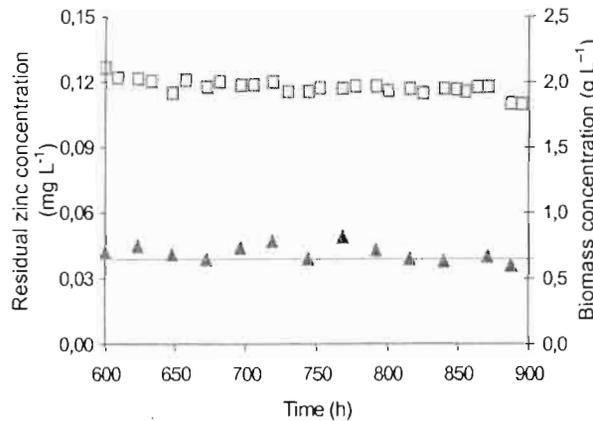


Fig. 1. Time courses of biomass and residual zinc concentrations in continuous cultures of *A. platensis*. (□) Biomass concentration (g.L<sup>-1</sup>). (▲) Residual zinc concentration (mg.L<sup>-1</sup>). Initial zinc concentration in the incoming flow 0.05 mg.L<sup>-1</sup>; dilution rate D=0.0085 h<sup>-1</sup>. The continuous lines correspond to average element C and biomass X concentration values at steady-state. Incident light flux 150 W.m<sup>-2</sup>.

Precision and accuracy of the method can be evaluated from Table 1 where the measurements on the growth medium by ICP-ES are reported. Precultures were maintained in Zarrouk's medium without adding B<sub>6</sub> solution for all the duration of the experiments. 3 successive subcultures were grown for about 120 generations before starting the first experiment in order to exhaust the B<sub>6</sub> elements from the inoculum. Without B<sub>6</sub> solution, no change in growth rate was observed proving that trace elements V, Cr, Ni, Co, W and Ti were useless.

The chemical analysis of algal products provided data from which elemental mass balances could be obtained, showing that these results agreed closely with the yield coefficients determined by monitoring the exit element concentrations (Figure 1 and Table 2). Chemical composition was similar to what has been published previously for natural or laboratory-produced populations of the corresponding genera and species. From element yield coefficients obtained, further simplifications of the trace element solution A<sub>5</sub> could be made.

## Conclusion

Thus the suggested minimum medium allowing *Spirulina* growth up to a concentration of 3.6 g.L<sup>-1</sup>, which is the concentration attained in batch culture for 0.2 mol of C source is (g.L<sup>-1</sup>): NaCl 1.0; CaCl<sub>2</sub> 0.03; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.08; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5; NaNO<sub>3</sub> 2.5; NaHCO<sub>3</sub> 10.5, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7.6; EDTA 0.08; and FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01. 1 mL per medium liter of a trace element solution is added (g.L<sup>-1</sup>): MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.23; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.11; and CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.03.

## Reference

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* Geilster. PhD. Thesis. Université de Paris, France.

# ARTHROSPIRA PLATENSIS : RESEAU METABOLIQUE ET CALCUL DE FLUX EN PHOTOAUTOTROPHIE.

GUILLAUME COGNE, JEAN-BERNARD GROS

LGCB, Université Blaise Pascal, CUST, 24 avenue des Landais, BP 206, 63174 Aubière-cédex, France.

Une structure complète du réseau métabolique pour la croissance en autotrophie de la cyanobactérie *Arthrospira platensis* est proposée. Le réseau inclut la synthèse de la biomasse, la production d'un exopolysaccharide (EPS) associé à la croissance et les aspects énergétiques. Les flux métaboliques calculés sont en accord avec les flux expérimentaux et permettent de fournir une explication à la limite de concentration spécifique en EPS à flux d'énergie lumineuse élevé.

Mots clés: *Arthrospira platensis*; métabolisme, photoautotrophie, flux

## Introduction

L'objectif de ce travail a été d'analyser, en terme de stœchiométrie, le métabolisme d'*A. platensis*, c'est-à-dire sa croissance et la production de métabolites, en particulier d'un polysaccharide exocellulaire (EPS). Nous avons étudié le réseau du métabolisme carboné et énergétique en considérant l'ensemble des voies métaboliques présentes chez ce micro-organisme. Ce réseau est utilisé pour lever l'ambiguïté que l'on trouve dans la littérature sur la conservation du pouvoir réducteur en traitant des résultats obtenus dans des conditions de photoautotrophie. Il est aussi utilisé pour expliquer la limite de concentration en EPS que l'on observe à forte énergie lumineuse incidente.

## Construction du réseau métabolique

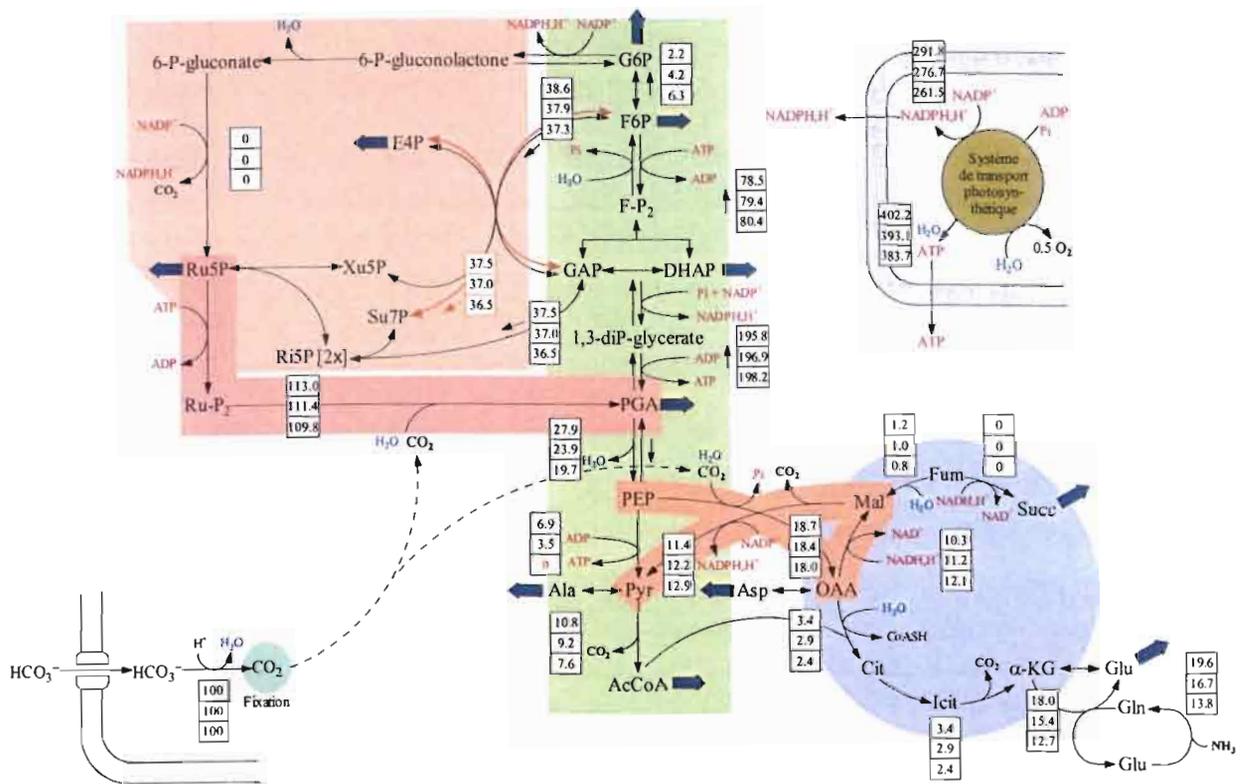


Fig. 1: Schéma des principales voies du métabolisme. Distribution des flux dans ces voies pour différents éclairages

Le réseau métabolique (Figure 1) a été construit à partir des informations données par Fay et Van Baalen (1987), Ray (1997), et Stanier et Cohen-Bazire (1977). Il est défini en conditions d'autotrophie par 121 réactions mettant en jeu 134 métabolites. Les voies métaboliques centrales décrites par les réactions stœchiométriques sont l'entrée du carbone sous forme de bicarbonate par transport actif, la voie d'Emben-Meyerhof-Parnas, la voie des pentoses phosphate, le cycle de Calvin, et le cycle de Krebs. Les relations de conservation des métabolites et l'hypothèse d'un régime pseudo-permanent permettent de calculer l'ensemble des flux dans le réseau. La seule information nécessaire est le flux de formation d'EPS, qui correspond à un flux d'énergie lumineuse donné (Tableau 1).

## Resultats et Discussion

Tableau 1. Variation du quotient photo-synthétique  $Q_p$  en fonction du flux d'énergie lumineuse incident  $F_0$ .  $X_{EPS}$  est le rendement en exopolysaccharide

$F_0$ ( $W.m^{-2}$ )	$X_{EPS}$ ( $kgEPS.kg^{-1}$ biomasse)	$Q_p$ ( $mol O_2.mol^{-1}CO_2$ )	
		Expérimental	Calculé
20	$0,14 \pm 0,01$	$1,38 \pm 0,14$	1,40
50	$0,33 \pm 0,02$	$1,37 \pm 0,14$	1,35
160	$0,50 \pm 0,03$	$1,29 \pm 0,13$	1,31
230	$0,53 \pm 0,03$	$1,28 \pm 0,13$	1,31

Tableau 2. Rendements massiques en EPS, bicarbonate, nitrate, sulfate et phosphate rapportés à la masse totale de biomasse et d'EPS pour un flux d'énergie lumineuse incident de  $20 W.m^{-2}$ .

	Expérimental	Calculé
$X_{EPS}$	$0,14 \pm 0,01$	0,14
$Y_{C/X}$	$2,57 \pm 0,16$	2,53
$Y_{N/X}$	$0,45 \pm 0,02$	0,44
$Y_{S/X}$	$0,024 \pm 0,002$	0,022
$Y_{P/X}$	$0,020 \pm 0,002$	0,012

Les flux métaboliques calculés pour différents rendements en EPS produit ( $0,0$  puis  $0,14$  et  $0,51 kgEPS.kg^{-1}$  biomasse) sont en accord avec les rendements expérimentaux (Tableaux 1 et 2). Cet accord renforce l'hypothèse de l'existence d'un shunt métabolique entre le phosphoénolpyruvate (PEP) et le pyruvate (Pyr) mettant en jeu la PEP carboxylase, la malate déshydrogénase  $NAD^+$ -dépendante et l'enzyme malique  $NADP^+$ -dépendante qui convertit le  $NADH,H^+$  en  $NADPH,H^+$ .

Les valeurs des flux calculés révèlent une contrainte métabolique intéressante due à la conservation des équivalents réducteurs  $NADH,H^+$ . Cette contrainte conduit à une valeur maximale pour le pourcentage d'EPS dans la biomasse de  $0,51 kgEPS.kg^{-1}$  biomasse, valeur pour laquelle le flux à travers la pyruvate kinase ( $PEP \rightarrow Pyr$ ) s'annule (Figure 1). Cette valeur est très proche de celles obtenues expérimentalement en photobioréacteur pour des forts flux d'énergie lumineuse incident (Tableau 1).

## Conclusion

La structure du réseau et les flux métaboliques ont pu être déterminés pour des cellules d'*Arthrospira platensis* cultivées à la lumière en autotrophie. Ceci a mis en évidence le rôle important de l'enzyme malique dans son comportement en croissance pour différents flux d'énergie lumineuse et a permis d'expliquer la limite de concentration en EPS que l'on observe à forte énergie lumineuse incidente.

## References

- Fay, P., Van Baalen, C. (1987). The Cyanobacteria. Amsterdam : Elsevier.
- Ray, A.K. (1997). Cyanobacterial nitrogen metabolism and environmental biotechnology. New York : Springer-Verlag.
- Stanier, R.Y., Cohen-Bazire, G. (1977). Photosynthetic prokaryotes: the cyanobacteria. Annu. Rev. Microbiol., 31, 225-274.

## LYNBYA MAJUSCULA : UNE SOURCE POTENTIELLE DE COMPOSES AUX PROPRIETES ANTIFOULING

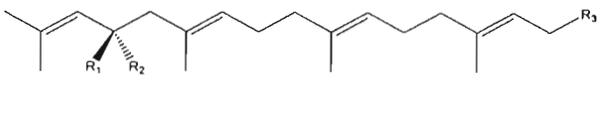
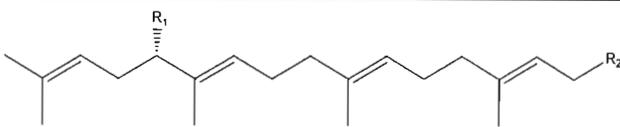
ROBERT VALLS<sup>1</sup>, CLAIRE HELLIO<sup>2</sup>, GERALD CULIOLI<sup>3</sup> ET LOUIS PIOVETTI<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Groupe Séparation Identification Synthèse, Université d'Aix-Marseille III - UMR 6180 CNRS "Chirotechnologies : catalyse et biocatalyse", Avenue Escadrille Normandie Niemen, 13397 Marseille Cedex 20, France (robert.valls@univ-u-3mrs.fr).*

<sup>2</sup> *School of Marine Science and Technology, University of Newcastle, Ridley Building, Newcastle upon Tyne, NE1 7RU, United Kingdom (C.G.A.Hellio@newcastle.ac.uk).*

<sup>3</sup> *Laboratoire MFS, Equipe « Chimie des produits naturels marins », Université du Sud Toulon-Var, Av. de l'Université, BP 20132, 83957 La Garde Cedex, France (culioli@univ-tln.fr, piovetti@univ-tln.fr).*

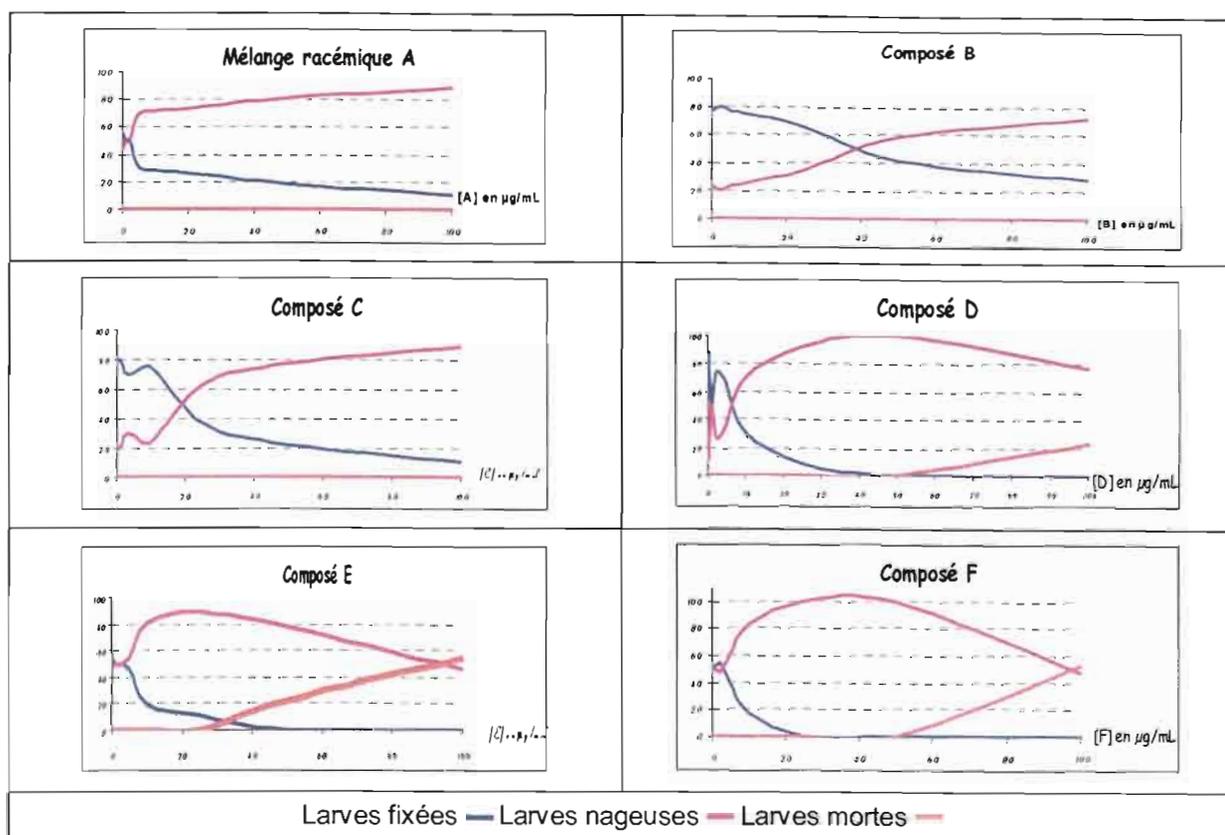
L'analyse chimique de l'extrait étheré de la cyanobactérie *Lyngbya majuscula*, récoltée en mer Méditerranée<sup>1</sup> (Le Brusq, Var), a permis d'isoler deux composés minoritaires **A** et **B** (représentant en masse respectivement 1,40% et 0,51% de l'extrait). Alors que plus de quatre-vingt composés de structures chimiques très variées ont déjà été décrits dans *Lyngbya majuscula*, ces deux diterpènes linéaires sont les premiers de ce type à être isolés à partir de cette cyanobactérie. Ces composés sont des dérivés acétylés de l'Eleganediol et du Bifurcadiol<sup>2</sup>, deux diterpènes linéaires précédemment isolés à partir de l'algue brune *Bifurcaria bifurcata* récoltée en Bretagne.

	
R <sub>1</sub> =H, R <sub>2</sub> =R <sub>3</sub> =OH	(-)-Eleganediol
R <sub>1</sub> et R <sub>2</sub> =H ou OAc, R <sub>3</sub> =Oac	<b>A</b> (racémique)
R <sub>1</sub> =OH, R <sub>2</sub> =H, R <sub>3</sub> =Oac	<b>C</b>
R <sub>1</sub> =H, R <sub>2</sub> =OH, R <sub>3</sub> =Oac	<b>D</b>
R <sub>1</sub> =R <sub>2</sub> =O, R <sub>3</sub> =Oac	<b>E</b>
R <sub>1</sub> =R <sub>2</sub> =O, R <sub>3</sub> =OH	<b>F</b>
R <sub>1</sub> =R <sub>2</sub> =OH	(-)-Bifurcadiol
R <sub>1</sub> =R <sub>2</sub> =Oac	<b>B</b>

La structure chimique de ces composés a été établie sur la base de données spectroscopiques IR, UV, SM, RMN 1D et RMN 2D homo- (COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H et NOESY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H ) et hétéronucléaires (HMQC, HMBC), puis a été confirmée par le biais de leur synthèse réalisée selon un protocole précédemment publié<sup>3,4</sup>.

Les test antifouling<sup>5</sup> menés sur ces composés et sur toute une série de leurs dérivés<sup>6,7</sup> ont conduit à des activités significatives sur les larves de balanes (stade cypris) sans montrer de toxicité, en comparaison au TBTO ou au CuCl<sub>2</sub>, sur les nauplii de balanes. On remarquera que le mélange racémique **A** est plus actif que les 2 énantiomères (**C** et **D**) qui le composent. D'autre part, les composés fonctionnalisés en C-13 (**A**, **C-F**) sont plus actifs que celui en C-12 (**B**). Enfin, la présence d'une fonction cétone en C-13 (**F** et **E**), à la place d'une fonction alcool ou d'un groupement acétate, améliore nettement l'activité antifouling mais induit une certaine toxicité aux plus fortes concentrations.

Des tests sur des bactéries marines et des diatomées sont actuellement en cours et doivent compléter ces premiers résultats.



### Références bibliographiques :

- [1] Mesguiche V., Valls R., Piovetti L., Peiffer G. *Tetrahedron Lett.* (1999) **40** : 7473-7476.
- [2] Valls R., Piovetti L., Banaigs B., Archavlis A., Pellegrini M. *Phytochem.* (1995) **39** : 145-149.
- [3] Di Guardia S., Valls R., Mesguiche V., Brunel J.M., Culioli G. *Tetrahedron Lett.* (1999) **40** : 8359-8360.
- [4] Li J., Lan J., Liu Z., Li Y. *J. Nat. Prod.* (1998) **61** : 92-95.
- [5] Hellio C., Thomas-Guyon H., Culioli G., Piovetti L., Bourgougnon N., Le Gal Y. *Biofouling* (2001) **17** : 189-201.
- [6] Culioli G., Daoudi M., Ortalo-Magné A., Valls R., Piovetti L. *Phytochem.* (2001) **57** : 529-535.
- [7] Culioli G., Ortalo-Magné A., Richou M., Valls R., Piovetti L. *Biochem. Syst. Ecol.* (2002) **30** : 61-64.

## MODELE DE SIMULATION DE PRODUCTION DE SPIRULINE : DEMONSTRATION ET VALIDATION PAR COMPARAISON AVEC DES RESULTATS D'EXPLOITATION

FRANÇOIS HALDEMANN<sup>1</sup> & JEAN-PAUL JOURDAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup> BIORIGIN S.A - Z.I, Maisomex - 1217 Meyrin - Suisse

<sup>2</sup> 5<sup>Ter</sup> Rue Moquin-Tandon 34090 - Montpellier - France

<http://www.spirulinasource.com/microjourdan.html>, <http://spirulinefrance.free.fr/lespetitesnouvel.html>

### Résumé

Un modèle de simulation de production de spiruline (*Arthrospira platensis*) a été élaboré, d'abord en langage Qbasic puis récemment en Visual Basic.Net. Les deux versions donnent les mêmes résultats. Le modèle est en cours de validation par comparaison des résultats calculés avec des mesures effectuées sur le terrain, notamment sur une exploitation de spiruline de 7000 m<sup>2</sup> en Equateur.

### Summary

A simulation model for the production of spirulina (*Arthrospira platensis*) was developed, first using the Qbasic language, and then recently Visual Basic.Net. Both versions give the same results. The model is being validated by comparison of calculated and field measurements, especially on a 7000 m<sup>2</sup> spirulina farm in Ecuador

### Principe et méthodes

Le principe de la simulation consiste à calculer l'évolution d'un m<sup>2</sup> de bassin de spiruline en faisant autour de lui un bilan matières et un bilan énergies, avec un pas de temps de une heure, à partir d'un état initial donné.

L'hypothèse centrale est que la photosynthèse est proportionnelle à six facteurs respectivement fonction de la température, du pH, de l'éclairement, de la salinité, de la concentration en spiruline et de la vitesse d'agitation. Les quatre premières fonctions sont tirées de la thèse de Zarrouk.

Pour évaluer la respiration en fonction de la température en l'absence de lumière, une moyenne de données tirées de la littérature a paru satisfaisante.

La relation entre le pH et le rapport CO<sub>2</sub> / base forte dans le milieu de culture a été déterminée expérimentalement par alcalimétrie. Le coefficient d'absorption/désorption du CO<sub>2</sub> du milieu de culture a été mesuré en suivant l'évolution dans le temps du pH en l'absence de spiruline. La pression de vapeur du CO<sub>2</sub> sur le milieu de culture en fonction de la température, du pH et de la basicité du milieu de culture est tirée de la littérature.

L'éclairement et la température du bassin, ainsi que l'évaporation du bassin, sont calculés en utilisant des méthodes usuelles en énergie solaire et génie chimique, à partir de données météo moyennes mensuelles. Le % moyen de nébulosité mensuel a été traduit en jours supposés 100 % gris répartis également sur chaque décade du mois. La condensation éventuelle sur paroi interne de la serre est supposée recyclée au bassin.

Le bassin peut être à l'air libre ou sous serre. Un grand nombre d'options de régulation thermique, de mode d'alimentation carbonée et de gestion du bassin (récolte, purges, arrêts hebdomadaires) ont été introduites comme paramètres.

Pour plus de détails on pourra se reporter à la Notice complète publiée sur :

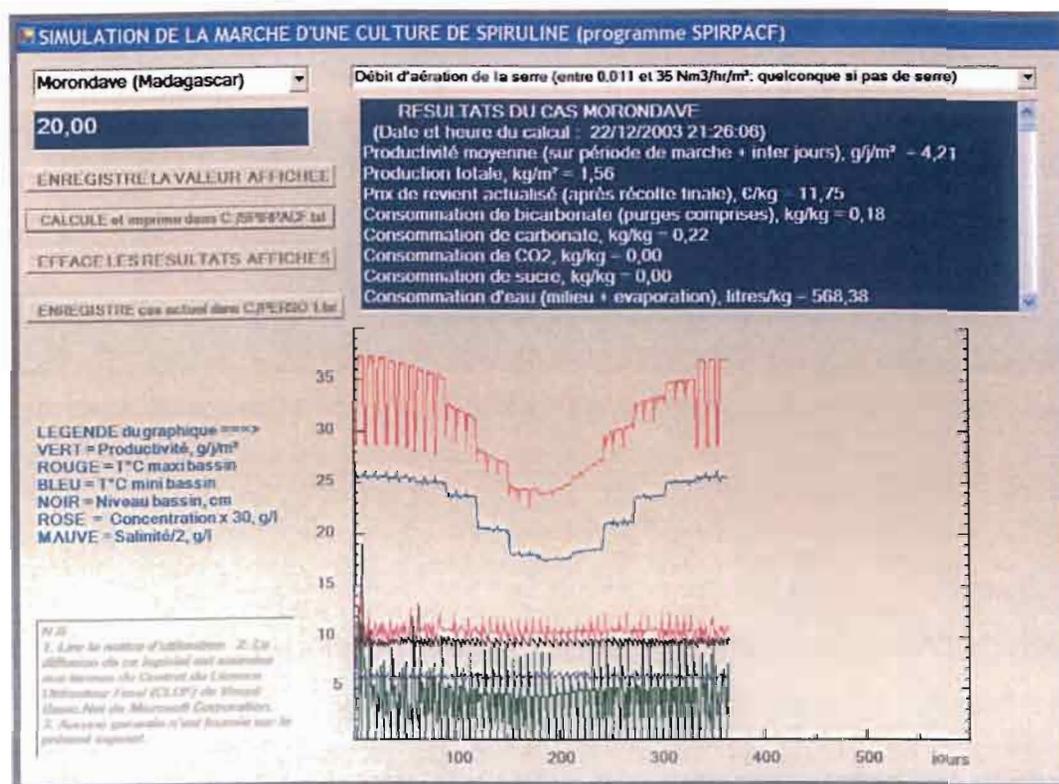
<http://www.antenna.ch/manuel/Notice%20SPIRPACF.htm>.

Le site Internet <http://www.antenna.ch/manuel/CALCUL.htm#Simulation> fournit la même description détaillée du programme dans sa version originale écrite en langage QBasic, laquelle ne diffère de la version Visual Basic.Net que par son interface et qui est téléchargeable. La version Visual Basic.Net est disponible auprès d'Antenna Technologie ([antenna.geneve@worldcom.ch](mailto:antenna.geneve@worldcom.ch)) sous forme d'un CD-Rom.

Les Actes du 1<sup>st</sup> Algal Technology Symposium, 24-28 Octobre 2001, Izmir, dans J. Fish.Aquat. Sci., Vol 18/1, Suppl., pp. 7-23, donnent aussi une description détaillée du programme en Qbasic, mais sans les quelques fonctionnalités supplémentaires apportées par la suite au programme.

## Exemples d'application et validation

1) Dans une très large gamme de conditions de marche où l'apport de carbone par l'air constitue le facteur limitant, la productivité calculée par le modèle est voisine de  $4 \text{ g.jr}^{-1}.\text{m}^{-2}$  et c'est bien ce que l'on constate dans la réalité. L'exemple de résultats ci-dessous montre l'impact quasi nul des variations de température saisonnières sur la productivité (courbe verte) :



2) Du 15 juillet au 15 août 1993 à Mialet (Gard) un bassin de  $15 \text{ m}^2$  sous serre étanche a fonctionné à pH 10 (injection de  $\text{CO}_2$ ) en donnant une productivité moyenne mesurée de 12 ; celle prédite par le modèle est de 12,5 (site Montpellier, légèrement plus ensoleillé que Mialet).

3) L'unité de production industrielle de spiruline de  $7000 \text{ m}^2$  située près de Quito (Equateur) est originale à plusieurs points de vue :

- Bassins inclinés à écoulement
- Stockage de la culture en cuves isolées la nuit
- Concentration en spiruline élevée (1 g/l)
- Alimentation en  $\text{CO}_2$  par les gaz d'échappement des moteurs fournissant l'énergie
- Epuration et recyclage intégral des filtrats après récolte, donc absence de consommation de bicarbonate
- Altitude 2600 m

Il était d'autant plus intéressant de tester la validité du modèle de simulation sur une telle installation. Le résultat du calcul est en bon accord avec les résultats mesurés sur le terrain : la productivité moyenne annuelle ressort à  $6,7 \text{ g}/\text{jour}/\text{m}^2$ .

### Projet d'amélioration

Malgré la bonne concordance générale entre simulations et mesures sur le terrain, il serait souhaitable d'affiner plusieurs paramètres ou équations contenues dans le programme de simulation, notamment l'influence de l'agitation et de la respiration. Il n'est pas facile de le faire à partir des mesures sur le terrain du fait de la variabilité des conditions météorologiques locales et des conditions de culture pratiques. C'est pourquoi un projet a été élaboré pour pallier ces difficultés.

La base du projet consiste à cultiver un bassin dans une enceinte isolée, sous éclairage artificiel, à température et pH fixes, avec degré d'agitation mesuré. Il permet de travailler à concentration en spiruline fixe (avec récoltes) ou variable (sans récolte). Les résultats obtenus seront comparés aux valeurs calculées et, au besoin, le logiciel sera modifié.

Pour illustrer ce projet, voici quelques exemples de productivités (avec récoltes) calculées par le logiciel dans son état actuel, en faisant varier une à une les valeurs de certains paramètres à partir des conditions standards suivantes :

- Bassins thermostatés à 30°C nuit et jour
- pH maintenu à 10 par injection de CO<sub>2</sub>
- Eclairage 30 Klux 16 heures/jour
- Concentration après récoltes 0,3 g/l
- Salinité 11 g/l
- Basicité 0,1 mole/l
- Agitation 30 cm/s
- Profondeur 10 cm ; altitude 0 ;
- Aération 0,02 m<sup>3</sup>/hr/m<sup>2</sup>, coefficient de modulation nul
- Rendement 85 %

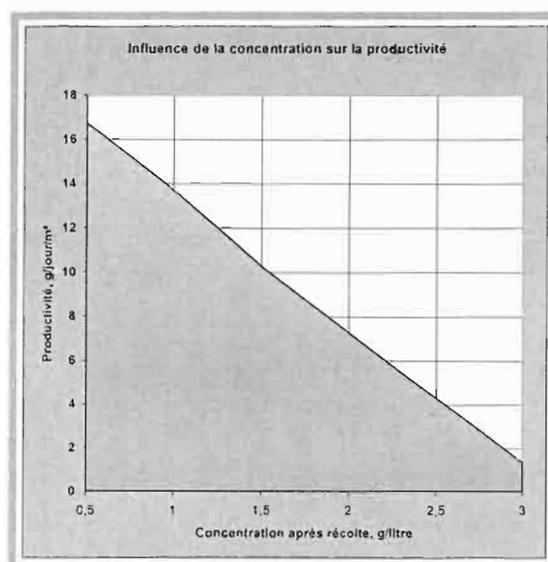
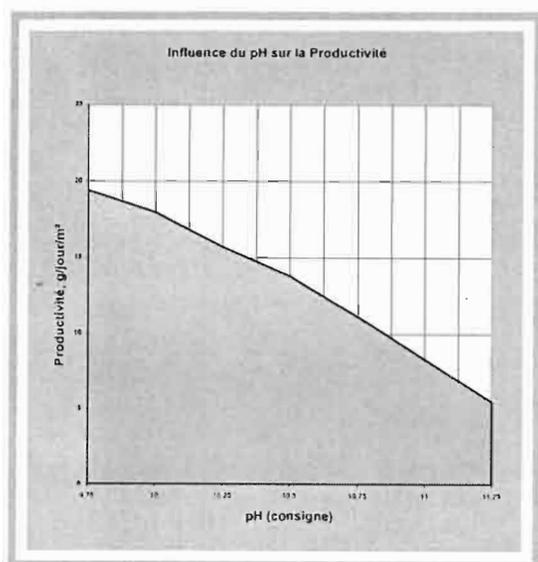
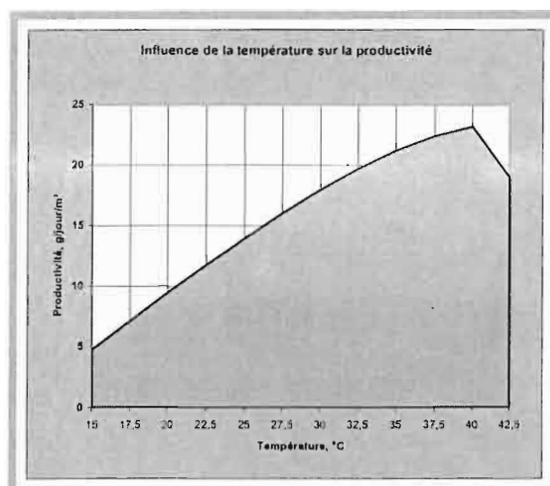
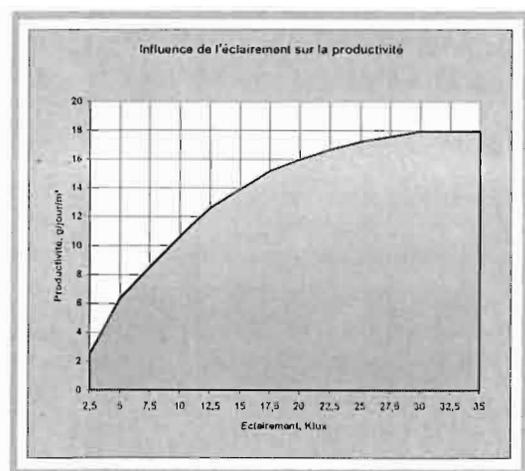


Fig. :Influence de divers facteurs sur la productivité

# NUMERICAL OPTIMIZATION OF BIOMASS CONCENTRATION OF THE CYANOBACTERIUM *SPIRULINA PLATENSIS* IN AN OPEN SYSTEM USING MANGUEIRA LAGOON WATER AS CULTURE MEDIUM

LIANE BACELO<sup>1</sup>, JORGE. A. V. COSTA<sup>1\*</sup>, LUIZ. A. O. ROCHA<sup>2</sup>, GEORGE. STANESCU<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Laboratory of Biochemical Engineering, Department of Chemistry, Federal University Foundation of Rio Grande (FURG), Rio Grande, Brazil.*

<sup>2</sup> *Department of Physics, FURG, Av. Itália, km 8, Cx. P. 474, Rio Grande, RS, Brazil*

<sup>3</sup> *Department of Mechanical Engineering, UFPR, Centro Politécnico, Curitiba, PR*

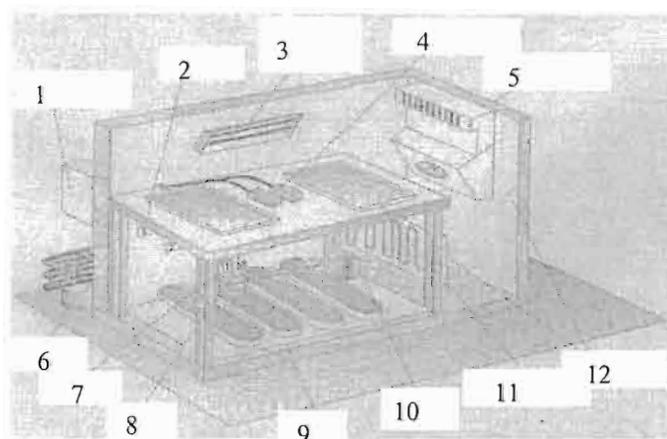
*\*Corresponding author. Address: P.O. Box 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil.  
dqmjorge@furg.br*

## Introduction

In order to optimize the cyanobacterium *Spirulina platensis* biomass production, this paper presents a mathematical model to study the biomass concentration in an open system using water from Mangueira Lagoon, state of Rio Grande do Sul, south of Brazil. Based on experimental data adjusted by the minimum square method this semi-empirical model yields the maximum biomass production when temperature, light intensity and cultivation time are used as control variables.

## Experimental Apparatus

Figure 1 shows the sketch of the experimental apparatus, built in conformity with the detailed description of Dos Santos [1], used to perform the experiments. Experiments were conducted during 456 hours, in nine runs, to determine the biomass concentration for various temperatures (T) and light intensities (I).



1. Light, ventilation and temperature controls.
2. Fluorescent lamps.
3. Heating system.
4. Periodical photo illumination system.
5. Thermally insulating wall.
6. Refrigeration system's condenser.
7. Thermometers.
8. Thermostats.
9. Set of mini-tanks.
10. Controlled speed electromotor.
11. Water tank for humidity control.
12. Refrigeration and ventilation system.

Figure 1: Experimental apparatus

## Numerical Model

The experimental data obtained for each run were adjusted to fit a polynomial function of time, X, with variable coefficients depending on the temperature (T) and light intensity (I)

$$X = C_1(T, I) + C_2(T, I) t + C_3(T, I) t^2$$

(1) where X represents the biomass concentration.

The numerical values of coefficients  $C_1$ ,  $C_2$  and  $C_3$  are shown in Table 1, where the correlation coefficient  $R_2$  indicates the accuracy of the numerical approach.

Based on numerical values in Table 1, the coefficients  $C_1$ ,  $C_2$  and  $C_3$  in equation (1) were also adjusted to a polynomial function

$$C_{1,2,3} = B_1 + B_2 Z + B_3 Z^2 \quad (2)$$

with

$$Z = \sin(a_1 \ln(a_2 I T)) \quad (3)$$

Numerical values of coefficients  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_3$ ,  $a_1$  e  $a_2$  are shown in Table 2.

Table 1

Run	I (Lux)	T (°C)	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	R2
A <sub>1</sub>	1100	12	1.1278E-1	-8.3618E-5	-2.1360E-8	0.833
A <sub>2</sub>	1100	30	9.6988E-2	4.8958E-4	-1.1827E-7	0.9916
A <sub>3</sub>	2200	12	1.1905E-1	-2.0765E-4	3.293E-8	0.893
A <sub>4</sub>	2200	30	9.5756E-2	8.9791E-4	1.9976E-8	0.995
A <sub>5</sub>	1650	21	9.9771E-2	4.7780E-4	5.2387E-7	0.983
A <sub>6</sub>	1650	8	1.1322E-1	-1.1423E-4	1.5805E-8	0.972
A <sub>7</sub>	1650	34	1.0994E-1	6.8016E-4	-7.2893E-8	0.993
A <sub>8</sub>	700	21	9.1611E-2	2.262E-4	-3.0109E-8	0.959
A <sub>9</sub>	2600	21	7.2508E-2	9.0612E-4	-5.1770E-7	0.972

Table 2

Coefficients	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	a <sub>1</sub>	a <sub>2</sub>	R2
C <sub>1</sub>	1.1464E-1	-6.0600E-2	-8.699E-2	8.02	7.17	0.8598
C <sub>2</sub>	-1.1880E-4	-2.8010E-4	8.8396E-3	5.16	7.92	0.9486
C <sub>3</sub>	1.4892E-7	1.8498E-6	1.9142E-6	7.75	5.65	0.8468

## Results

The algebraic system represented by equations (1), (2) and (3) is the objective function to be maximized. Figure 2 shows the experimental data as against the numerical approach of biomass concentration. Figure 3 shows the existence of an optimal (maximum) biomass concentration with respect to the temperature, when the light intensity is a constant. The subscript “mm” in this figure means that the biomass concentration was optimized twice, firstly in terms of time and secondly in terms of temperature. Results in Figure 4 show the optimal (maximum) biomass concentration  $X_{mmmm} = 0.903$  g/L, for  $T = 20^\circ\text{C}$  and  $I = 2000$  Lux. Here, the subscript “mmm” means that the biomass concentration was optimized three times, firstly in terms of time, secondly in terms of temperature and thirdly in terms of light intensity.

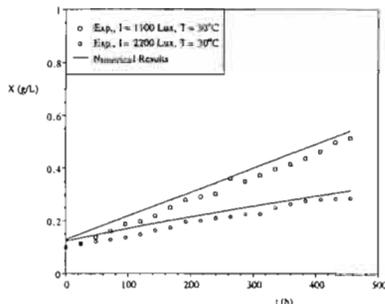


Figure 2: Comparison between numerical and experimental data

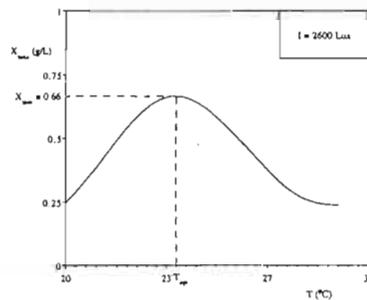


Figure 3: Optimization of biomass concentration with respect to the temperature

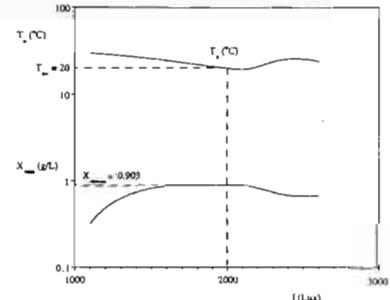


Figure 4: Optimization of biomass concentration with respect to the Temperature and light intensity

## Conclusions

This work presents a new semi-empirical mathematical model to predict, based on temperature and light intensity, the biomass concentration of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in an open system using water from Mangueira Lagoon, in the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. To validate the new semi-empirical model, numerical approaches of biomass concentration are compared with experimental data. Then, the semi-empirical model is used to predict the maximum biomass concentration with respect to the temperature and light intensity. The maximum biomass concentration,  $X_{mmmm} = 0.903$  g/L, is attained when  $T = 20^\circ\text{C}$  and  $I = 2000$  lux. Results of this work also show that simple numerical models can contribute to save time and costs when planning experiments to produce the cyanobacterium *Spirulina platensis*.

## Reference

[ 1 ] Dos Santos, R. C., Influência da Temperatura, Iluminância e taxa de aeração na concentração de Biomassa da cianobactéria *Spirulina platensis*, Dissertação de Mestrado, FURG, RS, Brazil, 2001.

## REPEATED FED-BATCH CULTIVATION OF *SPIRULINA PLATENSIS* IN A CLOSED PHOTOBIOREACTOR

CHRISTIAN OLIVEIRA REINEHR<sup>1</sup>, JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Food Technology, Center of Environmental and Food Sciences, Communitarian Regional University of Chapecó (UNOCHAPECÓ), Chapecó, SC, Brazil

<sup>2</sup>Laboratory of Biochemical Engineering, Department of Chemistry, Federal University Foundation of Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brazil.

\*Corresponding author. Address: P.O. Box 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil.  
dqmjorge@furg.br

The microalga *Spirulina platensis*, for its content in compounds with high nutritional value, presenting anticarcinogenic, hypocholesterolemic and antioxidant properties, can be used as an alternative source of food, as well as in animal feeding and in the fine chemistry (Estrada *et al.*, 2001; Belay *et al.*, 1993). Typical strains of *Spirulina platensis* and *Spirulina maxima* inhabit certain alkaline lakes in Africa and Mexico. These lakes are rich in salts, especially carbonates and bicarbonates. The water in Mangueira Lagoon (Rio Grande do Sul estate, Brazil) has appropriate characteristics for the growth of *Spirulina* and could be added to culture medium to reduce the cost of producing *S. platensis* (Costa *et al.*, 2002).

In many cases the continuous operation mode, despite the obtaining of homogeneous product, is not viable, economically or technically (Donati & Paludetto, 1999). An approach of that system is the semicontinuous mode, where the reactor is initially filled with the cultivation medium and incubated under ideal conditions. This cultivation mode presents operational advantages, such as to avoid the constant inoculums change, besides maintaining the microorganism in high growth rates (Fábregas *et al.*, 1996). Although little studied, repeated fed-batch cultivation is a very useful technique because it has a better cost-benefit ratio than other cultivation methods because a portion of the reactor content is periodically withdrawn and the remaining culture in the reactor is used as the starting point for a further fed-batch process.

This work had as objective to study the semicontinuous cultivation of the microalga *Spirulina platensis* in closed bioreactor, in two different cultivation media, evaluating the cellular concentration, the renewal rate and the strain, factors which could potentially influence the specific growth rate of that microorganism and the productivity of the process.

Two strains (LEB-52 and Paracas) (Duarte Filho *et al.*, 2002), were used in this study. For the experiments Zarrouk medium was used (Zarrouk, 1966), as well as Mangueira Lagoon water, being this filtered before the use. The cultivations were accomplished in 2 L Erlenmeyer flasks, with initial volume of cultivation medium of 1.8 L and initial biomass concentration of 0.15 g.L<sup>-1</sup>. The aeration of the cultivations was made through diaphragm pumps, with air flow of 20 L.h<sup>-1</sup> (Costa *et al.*, 2002). The illumination was accomplished with fluorescent lamps (Osram 40W, Brazil), which supplied illuminance of 2500 Lux. The experimental apparatus was maintained in non-sterile greenhouse at 30°C with 12 h light/dark photoperiod (Vonshak *et al.*, 1982) for up to 2160 h (90 days). Daily samples were collected aseptically for monitoring the cellular concentration.

The semicontinuous cultivation of *Spirulina platensis* was studied using two different cultivation media: the standard Zarrouk medium and the water of Mangueira Lagoon with 10% of Zarrouk medium. Two full factorial designs 2<sup>3</sup> were proposed, being studied as variables the cellular concentration (0.50 and 0.75 g.L<sup>-1</sup>), the renewal rate (25 and 50%) and the strain (Paracas and LEB-52). With the purpose of comparing the semicontinuous and discontinuous systems of cultivation, four runs were accomplished in batch mode.

The values of specific growth rate and productivity obtained showed that the semicontinuous experiments reached 2000 h of cultivation, except for some experiments with Mangueira Lagoon water with 10% of Zarrouk medium, which presented cellular death between 1000 and 2000 h. Mangueira Lagoon presents a concentration about 0.126 g.L<sup>-1</sup> of bicarbonates, 1.040 mg.L<sup>-1</sup> of nitrates and 0.2548 mg.L<sup>-1</sup> of phosphates as major nutrients (Costa *et al.*, 2002), values lower than the present in Zarrouk medium (12.2 g.L<sup>-1</sup> of bicarbonates, 1.82 g.L<sup>-1</sup> of nitrates and 0.273 g.L<sup>-1</sup> of phosphates), causing especially in the cultivations in which the concentration should reach 0.75 g.L<sup>-1</sup> a high dilution of the nutrients, affecting the development of the microorganism.

The specific growth rate varied between 0.024 and 0.113 day<sup>-1</sup> for runs 12 (cellular concentration of 0.75 g.L<sup>-1</sup>, renewal rate of 50%, Paracas strain and Mangueira Lagoon water with 10% of Zarrouk medium) and 11 (same conditions, except the cellular concentration, which was 0.50 g.L<sup>-1</sup>), respectively. Independently of the cultivation medium and of the strain used, the highest specific growth rates were obtained with cellular concentration of 0.50 g.L<sup>-1</sup> and renewal rate of 50%. The use of these conditions avoids the shadowing effect. Vonshak *et al.* (1982) studied the production of *Spirulina* and verified that, in cellular concentrations between 0.4 and 1.0 g.L<sup>-1</sup>, photosynthetic potential of the cells decreased, because most of the cells in those conditions was in absence of light. Even in concentrations around 0.5 g.L<sup>-1</sup>, considered as ideals for the maximal photosynthetic efficiency, about 80% of the cells were in complete darkness in certain instant. Then, low biomass concentrations and high specific growth rates are expected in systems where the light is a limiting factor.

With Zarrouk medium, the three factors presented significance ( $p < 0.05$ ) on the answers, except the cellular concentration on the productivity. In relation to the effect of the renewal rate on the specific growth rate, this was influenced positively ( $p < 0.0001$ ), there was an increase of the growth rate with higher renewal rates, as previously mentioned about the shadowing effect. When the cellular concentration was 0.50 g.L<sup>-1</sup>, the growth rate of LEB-52 rate was significantly higher than the one of Paracas strain ( $p < 0.0001$ ). Besides, when the cellular concentration was higher (0.75 g.L<sup>-1</sup>), both strains presented growth rates statistically equal ( $p = 0.7539$ ). For both strains the productivity increased when the renewal rate was 50% ( $p = 0.0013$ ), however the productivity of LEB-52 strain was significantly higher ( $p < 0.0001$ ) than the one of Paracas strain.

Using the medium with 90% of water from Mangueira Lagoon and 10% of Zarrouk medium, it could be observed that the variables cellular concentration and strain were significant on the specific growth rate. There was an increase in the specific growth rate when the cellular concentration was lower ( $p < 0.0001$ ), independently of the renewal rate and of the strain. Evaluating the cellular concentration of 0.50 g.L<sup>-1</sup>, the growth rate increased using renewal rates of 50% ( $p = 0.0234$ ), but the same did not happen for the renewal rate of 50% and that cellular concentration, being the growth rates statistically equal ( $p = 0.2294$ ). For the productivity the three factors were significant, and all presented negative effect. Higher productivities were obtained in the inferior levels of the variables (cellular concentration of 0.50 g.L<sup>-1</sup>, renewal rate of 25% and Paracas strain).

The cultivation medium using 90% of water from Mangueira Lagoon with 10% of Zarrouk medium, associated to a lower cellular concentration, presented the best results of growth rate (0.113 day<sup>-1</sup>) and productivity (46.7 mg.L<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup>), being applied different renewal rates. These results showed that Mangueira Lagoon water, according to previous studies by Costa *et al.* (2002), can be used successfully for the cultivation of the microalga *Spirulina platensis*. In spite of the low concentration in bicarbonates and nitrates, a small addition (10%) of standard Zarrouk medium is enough to provide to the microalga considerable amounts of essential nutrients to its development, reducing the costs with cultivation medium.

Comparing the productivity of the batch cultivations, it was verified that in semibatch mode higher specific growth rates and productivities ( $p < 0.01$ ) were obtained. This happened because the microorganism, in semicontinuous mode, after adaptation to the cultivation medium, stayed in better growth conditions, remaining 2000 h in exponential growth phase. It was also verified here an increase of up to two times in the productivity using Zarrouk medium, and of up to three times using water from Mangueira Lagoon supplemented with 10% of Zarrouk medium, in relation to the batch cultivations.

With Zarrouk medium, the maximal specific growth rate and productivity were 0.111 day<sup>-1</sup> and 42.3 mg.L<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup>, respectively. Paracas strain presented better adaptation to the medium containing water from Mangueira Lagoon (90%) supplemented with Zarrouk medium (10%), where maximal specific growth rate of 0,113 day<sup>-1</sup> and maximal productivity of 46,7 mg.L<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup> were obtained, respectively, representing an increase from 100 to 200% in relation to the values obtained during batch mode, besides the decrease of the costs with cultivation medium.

## References

Belay, A.; Ota, Y.; Miyakawa, K.; Shimamatsu, H. (1993) Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. *Journal of Applied Phycology*, 5, 235-241.

- Costa, J. A. V.; Colla, L. M.; Duarte Filho, P.; Kabke, K.; Weber, A. (2002) Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 18, 603-607.
- Donati, G.; Paludetto, R. (1999) Batch and semibatch catalytic reactors (from theory to practice). *Catalysis Today*, 52, 183-195.
- Duarte Filho, P.; Silva, P.; Costa, J. A. V. (2002) Estudo do crescimento de duas cepas de *Spirulina platensis* em diferentes meios de cultivo e níveis de agitação. In: *Anais do XVIII CBCTA*, Porto Alegre, Brasil.
- Estrada, J. E. P.; Bescós, P. B.; Fresno, A. M. V. (2001) Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Il Farmaco*, 56, 497-500.
- Fábregas, J.; Patiño, M.; Morales, E. D.; Cordero, B.; Otero, A. (1996) Optimal renewal rate and nutrient concentration for the production of the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum* in semicontinuous cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (1), 266-268.
- Vonshak, A.; Abeliovich, A.; Boussiba, S.; Arad, S.; Richmond, A. (1982) Production of *Spirulina* biomass: effects of environmental factors and population density. *Biomass*, 2, 175-185.
- Zarrouk, C. (1966) Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* Geitler. Ph.D. Thesis, University of Paris.

## CULTURE OF *SPIRULINA PLATENSIS* USING SYNTHETIC SWINE WASTEWATER

TANISE B. P. BERTOLIN<sup>1</sup>, TELMA E. BERTOLIN<sup>1</sup>, LUCIANE M. COLLA<sup>1</sup>, MARCELO HEMKEMEIER<sup>1</sup>,  
JORGE A. V. COSTA<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Fermentations, Passo Fundo University, Passo Fundo, RS, Brazil

<sup>2</sup>Laboratory of Biochemical Engineering, Rio Grande University, Rio Grande, RS, Brazil

\*Corresponding author. Address: Caixa Postal 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil.

[dqmjorge@furg.br](mailto:dqmjorge@furg.br)

Swine production is an important economic activity on farms in the southern Brazil, however swine wastewater constitutes a permanent source of environmental pollution. Manure is used in the region for swine waste treatment. Manure is not appropriately recycled on farms, and it is released into the environment, provoking serious pollution problem (Dettmer, 2003). Swine farms usually use anaerobic lagoons for treatment and temporary storage of the animal wastewater. With the growth of swine production, there are growing concerns of potential environmental contamination of excess nutrients, including ammonia emissions nitrates in water supplies, and eutrophication in rivers and lakes. A potential option nutrient management is to recover nutrients in aquatic plants that may have economic value as a byproduct, and could be removed from the farm (Cheng et al. 2002). According to Canizares-Villanueva et al. (1995), swine wastewater can be used as substratum for the microalgae growth after the stabilization of these for anaerobic or aerobic processes. Some studies on the nutritional quality of different species of microalgae, including *Spirulina*, have demonstrated their usefulness as component in animal diets. The aim of this work was to evaluate the growth of *Spirulina platensis* in a synthetic swine wastewater (SSW). The final purpose was to determine SSW ideal dilution for *Spirulina platensis* growth.

The strains used were LEB-52 and PARACAS of microalgae *Spirulina platensis*. To prepare and maintain the inoculum it was used SSW medium diluted at 50% with Zarrouk medium (Zarrouk, 1966). The SSW medium had the following salts concentration (mM):

$\text{NH}_4 = 26.82$ ;  $\text{NO}_3 = 0.015$ ;  $\text{P} = 3.16$ ;  $\text{K} = 12.4$ ;  $\text{Ca} = 12.4$ ;  $\text{Mg} = 1.65$ ;  $\text{Cl} = 8.5$ ;  $\text{Fe} = 0.141$ ;  $\text{S} = 8.59$ ;  $\text{Na} = 7.63$ ;  $\text{B} = 0.063$ ;  $\text{Mn} = 0.016$ ;  $\text{Zn} = 0.047$ ;  $\text{Cu} = 0.019$ ;  $\text{Mo} = 0.00021$ ;  $\text{Co} = 0.00421$  e  $\text{pH} = 7.0$  (Bergmann et al. 2000).

The cultures were carried out in 1.0 L Erlenmeyers Flasks with 0.8 L of medium and an initial biomass concentration of 0.1 g/L. The cultures were mixed through an air flux of 20 L/h using diaphragm pumps. The air was filtered, humidified and drop eliminated. Two glass tubes were passed through the covering cap of the erlenmeyers - one for sample collection and the other for continuous aeration. The cultures were illuminated with fluorescent lamps (Philips, TL 20W) providing an illuminance of 2,000 lux. The cultures were maintained in a greenhouse with a photoperiod fixed at 12h–light/12h–dark and 30°C (Zhang et al., 1999).

The experiment was divided in two stages, in the first step it was evaluated the *Spirulina platensis* growth following an  $2^3$  Factorial Design, the variables used were strain (LEB and Paracas), medium dilution (0 and 50%) and sodium bicarbonate concentration added (0 and 3g/L). From the results obtained in the first stage were defined the conditions of the second stage, being made an optimization of dilution SSW medium to the *Spirulina platensis* growth, throughout an  $3^{1.2^1}$  Mixed Factorial Design, being the variables used the medium dilution (80, 50 and 20%) and the strain (LEB and Paracas). Two more runs were accomplished using the SSW medium without dilution, one for LEB strain and another to Paracas strain.

Samples were taken aseptically every 24 h and determinations of biomass were carried out. The biomass concentration was calculated through optical density measurements at 670 nm. The results of maximum specific growth rate and maximum biomass concentration were statistically analyzed using ANOVA analysis on the software Statistica vs. 6.0.

In the first step, the runs 1 (strain LEB, 0% of medium dilution and 0g/L of bicarbonate) and 5 (strain LEB, 0% of medium dilution and 3g/L of bicarbonate) presented the higher values of maximum specific growth rate ( $\mu_{\text{max}}$ ) of 0.528 and 0.031  $\text{h}^{-1}$ , respectively. However, the log phase duration were of 72 hours, resulting in slower biomass concentrations (0.31 and 0.19 g/L). On the other hand, the

runs 3 (strain LEB, 50% of medium dilution and 0g/L of bicarbonate) and 7 (strain LEB, 50% of medium dilution and 3g/L of bicarbonate) presented  $\mu_{max}$  of  $0.004 \text{ h}^{-1}$ , both with a lag phase of 96 hours and biomass concentrations of 0.55 and 0.43 g/L, respectively. The run 4 presented higher  $\mu_{max}$  than the runs 3 and 7 ( $0.0057 \text{ h}^{-1}$ ), however, the lag phase was 240 hours and the biomass concentration was 0.45 g/L.

In the second stage of this study, the runs 11 (strain LEB, dilution of 20%), 15 (strain LEB, without dilution), 13 (strain PARACAS, dilution of 50%), 14 (strain PARACAS, dilution of 20%) and 16 (strain PARACAS, without dilution) presented cellular died in a few hours of culture, indicating that to the strain LEB the growth was observed to dilutions of 50% and 80% of SSW medium, and to the strain PARACAS the growth was observed only to 80% of medium dilution. The run 10 (strain LEB, dilution of 50%) presented biomass concentration of 0.20 g/L, slower than runs 9 (strain LEB, dilution of 80%) and 12 (strain PARACAS, dilution of 80%), which presented biomass concentrations of 0.25 and 0.35 g/L, respectively. These results were in accordance with those found by Beltrão (1992) who reported the need of dilutions of 1:3 to wastes of orange juice industry to grow the microalgae *Chorella vulgaris*. According to Gantar et al. (1991) the known of ideal dilution of dejects to production of biomass algae is very important to the growth.

Run 9 (strain LEB, dilution of 80%) presented the higher value of  $\mu_{max}$  ( $0.017 \text{ h}^{-1}$ ). Runs 10 (strain LEB, dilution of 50%) and 12 (strain PARACAS, dilution of 80) presented results of  $\mu_{max}$  of 0.006 and  $0.0039 \text{ h}^{-1}$ , respectively. Even so run 9 presented the higher  $\mu_{max}$ , it was too the experiment that presented the slower interval of exponential phase (48h). Runs 11 (strain LEB, dilution of 20%), 13 (strain PARACAS, dilution of 50%) and 14 (strain PARACAS, dilution of 20%) not presented exponential phase.

The statistical analysis indicated that there were significant interactions of factors, at the 99% confidence interval, indicating that the interaction between these variables should be investigated in more detail. Figure 1a presents plots of the means of 2-way interaction effects for maximum biomass concentration and Figure 1b for maximum specific growth rate.

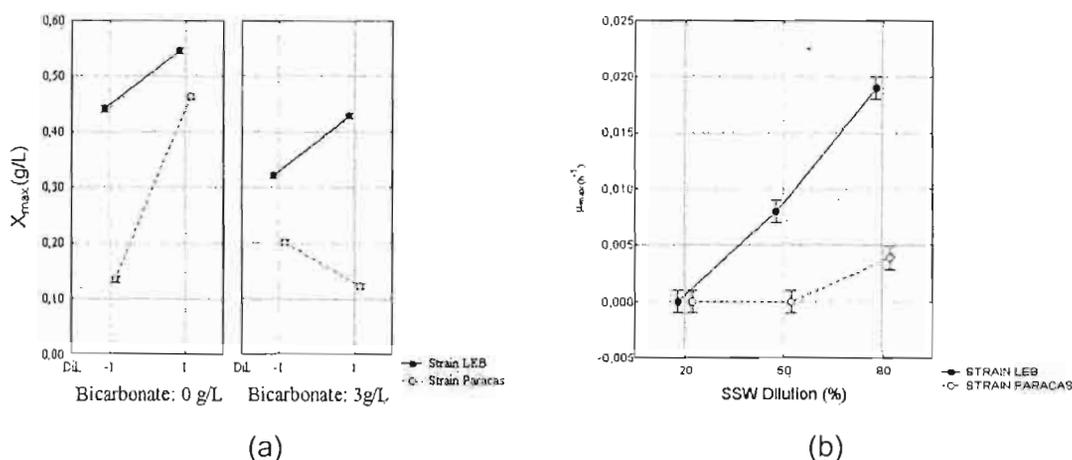


Figure 1: (a) Plot of 2-way interactions to maximum biomass concentration to the experiments of 23 Factorial Design; (b) to maximum specific growth rate to the experiments of 31.21 Mixed Factorial Design.

It was concluded that the strains LEB-52 and PARACAS can grow in SSW medium diluted and without sodium bicarbonate concentration added. Medium dilution to 80% presented better results to microalgae growth, being observed significant biomass concentrations from the medium with 50% of dilution.

## References

- Beltrão, M. I. Cultivo de algas clorofíceas (*Ankistrodesmus densus*, *Chorella vulgaris* e *Scenedesmus bijugatus*) em resíduos líquidos de indústria de suco de laranja concentrado. Dissertação de Mestrado. São Paulo University, EESC. 1992. 120p.
- Bergmann, B. A.; Cheng, J.; Classen, J. & Stomp, A-M. In vitro selection of duckweed geographical isolates for potential use in swine lagoon effluent renovation. *Bioresource Technology*, 73: 13-20, 2000.

- Canizares-Vilanueva, R. O.; Dominguez, A. R.; Cruz, M. S. e Rios-Leal, E. Chemical Composition of Cyanobacteria Grown in Diluted, Aerated Swine Wastewater. *Bioresource Technology*, v. 51, p. 111-116. 1995.
- Cheng, J.; Bergmann, B. A.; Classen, J. J.; Stomp, A. M.; Howard, J. W. Nutrient recovery from lagoon water by *Spirodela punctata*. *Bioresource Technology*, 81: 81-85, 2002.
- Costa, J. A. V.; Colla, L. M.; Duarte, P.; Kable, K. e Weber, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.18, n. 7, p. 603-607. 2002.
- Dettmer, C. A. Destino dos dejetos suínos em algumas propriedades rurais do município de nova boa vista r/s, sob a ótica ambiental – estudo de caso. 2003. 32f. Monografia (Especialização em Tecnologia Ambiental) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo.
- Gantar, M.; Obreht, Z. & Dalmacija, B. Nutrient removal and algal sucesión durinf the growth of *Spirulina platensis* and *Scenedesmus quadricauda* on Swine Wastewater. *Bioresouce Technology*, v.36, p. 167-171, 1991.
- Zarrouk C. Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima*. Ph.D Thesis, Paris. 1966.

## MIXOTROPHIC GROWTH OF *SPIRULINA PLATENSIS* WITH GLUCOSE IN FED-BATCH CULTIVATION

LUCIANE M. COLLA<sup>1</sup>, PATRÍCIA C. MOSELE<sup>1</sup>, ADRIANA M. DOMINGUES<sup>1</sup>, TELMA E. BERTOLIN<sup>1</sup>, JORGE A. V. COSTA<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Fermentations, University of Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS, Brazil

<sup>2</sup>Laboratory of Biochemical Engineering, Federal University Foundation of Rio Grande (FURG), Rio Grande, Brazil

\*Corresponding author. Address: P.O. Box 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil.

[dqmjorge@furg.br](mailto:dqmjorge@furg.br)

The cyanobacterium *Spirulina platensis* presents changes in growth patterns according to the cultivation conditions, manipulation of which could improve the biomass productivity and the biosynthesis of commercially important compounds. It is known that *Spirulina platensis* has high nutritional potential because it has a high content (~65%) of highly digestible protein as well as significant amounts of poly-unsaturated fatty acids, phenolics, vitamins, minerals and phycocyanin which could be useful in the human nutrition. The mixotrophic growth (use of organic sources of carbon associated to the conversion of CO<sub>2</sub> throughout the photosynthesis) can be used to the growth of *Spirulina*, being an alternative to decrease the costs of culture medium. However, this organic carbon source (glucose) can cause inhibition of the microalgae growth if added in high concentrations, being necessary the addition of the organic carbon source in fed-batch mode. In this way, the aim of this work was to evaluate the influence of addition of glucose in fed-batch mode, illuminance and Zarrouk medium dilution on the growth of *Spirulina platensis*.

Microorganism and culture medium: the cyanobacterium *Spirulina platensis* (Paracas strain) was used in this study. To prepare and maintain the inoculum we used Zarrouk's medium (Zarrouk, 1966), this medium also being used to growth of *Spirulina*, after dilution with distilled water following the Experimental Design proposed.

Culture conditions: the cultures were carried out in 2.0 L Erlenmeyers Flasks with 1.6 L of medium and an initial biomass concentration of 0.1 g/L. The cultures were mixed through an air flux of 20 L/h using diaphragm pumps. The air was filtered, humidified and drop eliminated. Two glass tubes were passed through the covering cap of the erlenmeyers - one for sample collection and the other for continuous aeration. The cultures were illuminated with fluorescent lamps (Philips, TL 20W) providing illuminances of 1,800 or 3,000 lux, according of the Experimental Design. The cultures were maintained in a greenhouse with a photoperiod fixed at 12h–light/12h–dark and 30°C (Zhang et al.,1999).

Analytical determinations: samples were taken aseptically every 24 h and determinations of biomass and glucose concentrations were carried out. The biomass concentration was calculated through optical density measurements at 670 nm. The glucose concentration was determined to estimate the times of addition of this nutrient in fed-batch mode, being measured by the method of 3,5-dinitrosalicylic acid.

Experimental Design and Statistical analysis: For this study a 2<sup>3</sup> Factorial Design was used in which the illuminance, Zarrouk dilution and glucose addition in fed-batch mode were set at two different levels: illuminance (1,800 and 3,000 lux), Zarrouk dilution (50 and 75%) and glucose concentration (0.5 and 1.0 g/L). The results of maximum specific growth rate and maximum biomass concentration were statistically analysed using ANOVA analysis on the software Statistica vs. 6.0.

The matrix of Experimental Design and the values of maximum specific growth rate ( $\mu_{max}$ ), duration of the exponential phase ( $\Delta t$ ), correlation coefficient of exponential adjust ( $r^2$ ) and maximum biomass concentrations ( $X_{max}$ ) are presented in Table 1. It was observed that higher biomass concentrations were obtained with 0.5 g/L of glucose addition on the culture medium. The mixotrophic growth of *Spirulina platensis* was studied by Chen and Zhang (1997) who obtained biomass concentrations of 10.24 g/L, 5.1 times higher than the biomass concentrations obtained in the batch phototrophic culture.

The statistical analysis indicated that there were significant interactions for the variables maximum specific growth rate and maximum biomass concentration, at the 99% confidence interval, indicating that the interaction between these variables should be investigated in more detail. Figure 1 presents

plots of the means of 2-way interaction effects for maximum specific growth rate (Figure 1a), and maximum biomass concentration (Figure 1b).

It was observed in Figure 1 that when the illuminance was 1,800 lux, higher maximum specific growth rates ( $\mu_{max}$ ) were obtained with glucose addition of 0.5 g/L, whereas to illuminance of 3,000 lux, higher  $\mu_{max}$  were obtained with glucose addition of 1.0 g/L. Independently of the glucose concentration and illuminance used, higher  $\mu_{max}$  were obtained with 75% of dilution of Zarrouk medium (25% of Zarrouk medium and 75% of distilled water). With regard to biomass concentrations, independently of the medium dilution, higher  $X_{max}$  were obtained with glucose addition of 0.5 g/L and illuminance of 3,000 lux. Zhang et al (1999) studied the mixotrophic growth of *Spirulina* and concluded that when light intensity was 2,000 lux, the optimal initial glucose concentration was 5 g/L and the cell dry weight concentration was 2.477 g/L whereas at 4,000 lux the optimal initial glucose concentration was 2 g/L with a cell dry weight concentration of 2.657 g/L. This suggests that the optimal initial glucose concentration decreased with increased light intensity, being this pattern in accordance to the obtained in our work.

Table 1: Matrix of Experimental Design and values of maximum specific growth rate ( $\mu_{max}$ ), start-end of the exponential growth phase ( $\Delta t$ ), correlation coefficient of exponential adjust ( $r^2$ ) and maximum biomass concentrations ( $X_{max}$ ) on the *Spirulina platensis* culture

Runs	Illuminance (lux)	Zarrouk dilution (%)	[Glucose] (g/L)	$\mu_{max}$ ( $h^{-1}$ )	$\Delta t$ (h)	$r^2$	$X_{max}$ (g/L)
1	1,800	50	0.5	0.0052	0-720	0.92	4.01
2	3,000	50	0.5	0.0045	200-600	0.96	5.51
3	1,800	75	0.5	0.0150	200-350	0.91	1.32
4	3,000	75	0.5	0.0056	250-550	0.97	5.37
5	1,800	50	1.0	0.0032	300-600	0.93	2.95
6	3,000	50	1.0	0.0048	200-450	0.90	3.25
7	1,800	75	1.0	0.0047	200-450	0.92	2.51
8	3,000	75	1.0	0.0077	100-300	0.96	1.30

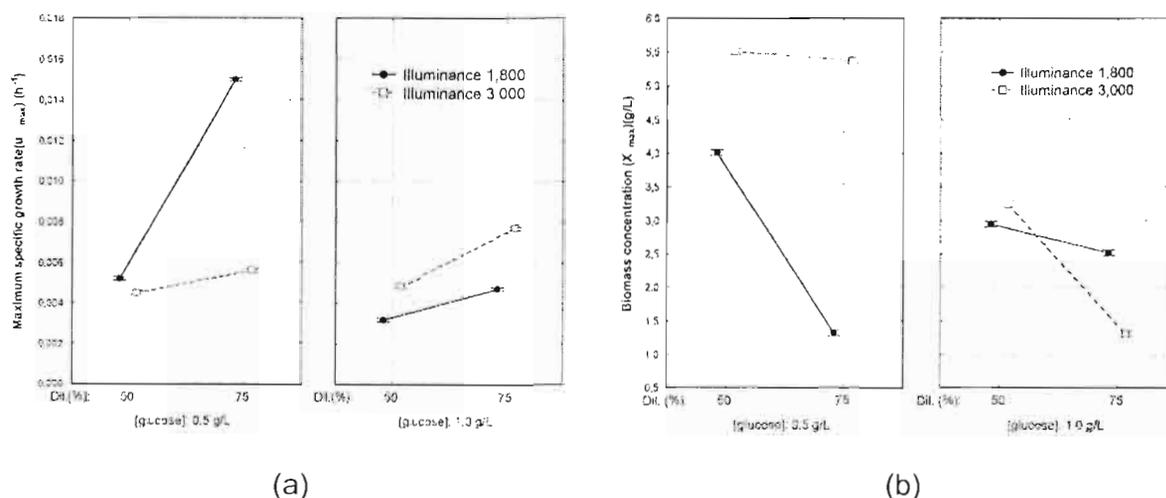


Figure 1: Plot of 2-way interactions to maximum specific growth rate (a) and maximum biomass concentration (b) to the experiments of  $2^3$  Factorial Design

It was concluded that higher biomass concentrations were obtained at 3,000 lux of illuminance and 0.5 g/L of glucose added in fed-batch mode. Medium dilution of 75% presented better results, being an alternative to decrease production costs.

## References

- Chen, F. and Zhang, Y., High Cell Density Mixotrophic Culture of *Spirulina platensis* on Glucose for Phycocyanin Production Using a Fed-Batch System. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 20, 221-224, 1997.
- Zarrouk, C. Contribution à l'étude d'une Cyanophycée. Influence de Divers Facteurs Physiques et Chimiques sur La Croissance et la Photosynthèse de *Spirulina maxima*. Paris, 1966. Ph.D Thesis, Université Des Paris
- Zhang, X. W.; Zhang, Y. M. e Chen, F. , Application of Mathematical Models to the Determination Optimal Glucose Concentration and Light Intensity for Mixotrophic Culture of *Spirulina platensis*. *Process Biochemistry*, v. 34: 477-481, 1999.

## PURIFICATION OF *SPIRULINA PLATENSIS* PHYCOCYANIN

LORENA A. SILVA<sup>1</sup>, SILVANA T. SILVEIRA<sup>1</sup>, CARLOS A. V. BURKERT<sup>1</sup>, JANAÍNA F. M. BURKERT<sup>1</sup>,  
JORGE A. V. COSTA<sup>2</sup>, SUSANA J. KALIL<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> *Laboratory of Bioprocess and Microbiology, Federal University Foundation of Rio Grande (FURG),  
Rio Grande, RS, Brazil*

<sup>2</sup> *Laboratory of Biochemical Engineering, Federal University Foundation of Rio Grande (FURG), Rio  
Grande, RS, Brazil*

\*Corresponding author. Address: P. O. Box 474, 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil.

*dqmsjk@super.furg.br*

---

### Introduction

In cyanobacteria, the light-harvesting pigments are chlorophyll-a, carotenoids and phycobiliproteins. The latter are a group of intensely colored proteins occurring in Cyanophyceae, Rhodophyceae and Cryptophyceae (REIS *et al.*, 1998).

Phycobiliproteins are used as colorants in foods such as chewing gums, dairy products, ice sherbet's and jellies, as well as in cosmetics such as lipstick and eyeliners in Japan, Thailand and China. The most commercially important phycobiliproteins are phycocyanin, allo-phycocyanin and phycoerythrin (ABALDE *et al.*, 1998).

Phycocyanin has been obtained mainly from *Spirulina platensis* by combinations of ammonium sulfate precipitation and different chromatographic methods (MINKOVA *et al.*, 2002).

In the present study, a precipitation technique for purification of phycocyanin from the cyanobacterium *Spirulina platensis* was described.

### Material and methods

#### Spirulina platensis cultivation

*Spirulina platensis* was cultivated in outdoor open photobioreactors containing water supplemented with 20% of Zarrouk's medium, for 28 days. It's growth was monitored through optical density (OD) at 670 nm. The harvested biomass was dried, crushed in a mortar and pestle and frozen at  $-18^{\circ}\text{C}$ .

#### Phycocyanin extraction

Dried biomass of *Spirulina platensis* was suspended in distilled water and stirred for 4 hours at 100 rpm. The suspension was centrifuged and the supernatant was collected for determination of phycocyanin content.

The purity of phycocyanin in the supernatants was measured and calculated as describe in section 2.4.

#### Phycocyanin precipitation

Solid  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  was added to obtain 50 to 70% saturation and the resulting solution allowed to stand for 14 h before centrifugation at 6000G. After centrifugation, the pellet was resuspended in different volumes of 50 mM phosphate buffer at pH values ranging from 5.7 to 7.0.

The effects of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  concentration, suspension volume to initial volume ratio and pH on phycocyanin purity and recovery were studied using a factorial design of  $2^3$  trials plus 4 central points, which means a total of 12 trials.

Phycocyanin purity and recovery in the supernatants was measured and calculated as describe in section 2.4.

#### Analytical procedures

The purity of phycocyanin extract was monitored spectrophotometrically by the  $A_{615}/A_{280}$  ratio (ABALDE *et al.*, 1998)

Phycocyanin recovery was calculated by rate  $(\text{PC}(\text{suspension volume})) / (\text{PC initial extract (initial volume)})$ .

### Results and discussion

As can be seen in table 1, the effects of ammonium sulfate concentration, suspension volume to initial volume ratio and pH on the recovery are statistically significant ( $p \leq 0.07$ ). Ammonium sulfate concentration and pH had significant negative effects on recovery, whereas volume, had a significant

positive one. Only the effect of ammonium sulfate concentration on purity is statistically significant ( $p \leq 0.14$ ). Ammonium sulfate concentration had significant negative effects on purity, as can be seen in table 2.

Table 1: Effects estimates for recovery for the factorial design.

	Effect	p
Ammonium sulfate concentration	-6.907	0.045
Suspension volume to initial volume ratio	4.736	0.065
pH	-0.998	0.029

Table 2: Effects estimates for purity of phycocyanin for the fractional factorial design.

	Effect	p
Ammonium sulfate concentration	-0.060	0.136
Suspension volume to initial volume ratio	0.012	0.504
pH	0.002	0.874

### Conclusion

Ammonium sulfate concentration and pH had a significant negative effect on recovery while volume had a significant positive effect. Ammonium sulfate concentration also had a significant negative effect on purity. The best results were achieved in 50% saturation, higher rate suspension volume: initial volume and pH 5.7.

### Acknowledgements:

CNPq, CAPES

### References

- Abalde, J.; Betancourt, L.; Torres, E.; Cid, A.; Barwell, C. Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus sp.* IO9201. *Plant Science*, v. 136, p. 109 - 120, 1998.
- Minkova, K. M.; Tchernov, A. A.; Tchorbadjieva, M. I.; Fournadjieva, S.T.; Antova, R. E.; Busheva, M. Ch. Purification of C-phycocyanin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*. *Journal of Biotechnology*, p. 1-5, 2003.
- Reis, A.; Mendes, A.; Lobo-Fernandes, H; Empis, J. A.; Maggioly Novais, J. Production, extracion and purification of phycobiliproteins from *Nostoc sp.* *Bioresource Tecnology*, v. 66, p.181-187, 1998.

## OPTIMIZATION OF PHYCOCYANIN EXTRACTION FROM *SPIRULINA PLATENSIS*

S. T. SILVEIRA<sup>1</sup>, L. A. SILVA<sup>1</sup>, C. A. V. BURKERT<sup>1</sup>, J. F. M. BURKERT<sup>2</sup>, J. A. V. COSTA<sup>2</sup>, S. J. KALIL\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Laboratory of Bioprocess and Microbiology, Federal University Foundation of Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brazil*

<sup>2</sup> *Laboratory of Biochemical Engineering, Federal University Foundation of Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brazil*

\*Corresponding author. Address: P. O. Box 474, 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil.

[dqmsjk@super.furg.br](mailto:dqmsjk@super.furg.br)

---

### Introduction

In cyanobacteria, the light-harvesting pigments are chlorophyll-a, carotenoids and phycobiliproteins. The latter constitute a group of intensely colored proteins which can be subdivided into three main groups according to their structure: phycocyanin (blue), allophycocyanin (blue) and phycoerythrin (red) (REIS, 1998). The cyanobacteria *Spirulina platensis* is an excellent source of phycocyanin. The protein fraction may contain up to 20 per cent of phycocyanin (VONSHAK, 1997).

Phycocyanin can be utilized as a natural pigment for the food, drug and cosmetics industries to replace the currently used synthetic pigments that are suspected of being carcinogens. However, small quantities are used as a biochemical tracer in immunoassays, microscopy and cytometry, using the fluorescent properties of the pigment. (VONSHAK, 1997).

Several factors influence the phycocyanin extraction, such as, cell disruption, temperature, time of extraction, biomass to solvent ratio, solvent and other variables. It is important to establish the process parameters with the purpose of decreasing production costs of phycocyanin extraction.

In this study it was investigated the effects of temperature and biomass to solvent ratio on phycocyanin concentration in order to obtain a suitable method for the optimum phycocyanin extraction from *Spirulina platensis*.

### Methods

#### Cultivation conditions

Biomass production was carried out in outdoor open photobioreactors using water supplemented with 20% of synthetic medium Zarrouk, during 28 days, *Spirulina platensis* growth being monitored spectrophotometrically at 570 nm. The harvested biomass was dried, crushed in a mortar and pestle and frozen at  $-18^{\circ}\text{C}$ .

#### Phycocyanin extraction

Phycocyanin was extracted in distilled water containing 0.02 % of sodium azide and then stirred during 30 hours. The extraction was studied at temperature ranging from  $20^{\circ}\text{C}$  to  $45^{\circ}\text{C}$  and the biomass to solvent ratio ranging  $0.01\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  to  $0.08\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . At each interval, samples were collected, centrifuged and the phycocyanin concentration determined by measuring the optical density (OD) of the supernatant at 280, 615 and 652 nm using a spectrophotometer. Phycocyanin was quantified according to the spectrophotometric technique of BENNET and BOGORAD (1973). The purity was estimated by ratio  $\text{OD}_{615}/\text{OD}_{280}$  (ABALDE, 1998).

#### Experimental design

In this study a full factorial design was performed in order to evaluate the effects of temperature and biomass to solvent ratio on the phycocyanin concentration. Twelve experimental runs were carried out, which included 8 factorial points and 4 central points. Two variables at five levels were studied, having phycocyanin concentration as response. All data were treated with the aid of Statistica 5.0.

### Results and discussion

The statistical analysis was performed with data obtained at 4 h of extraction, because there was no significant increase in the phycocyanin concentration after this time. In this time it was reached around  $3.15\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  of phycocyanin concentration on extract, 0.49 of purity and  $45\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  of phycocyanin on dried biomass.

Biomass to solvent ratio was the most significant variable. This parameter increases the response phycocyanin concentration when it is changed from low to high levels. This increment on

phycocyanin concentration was  $2.2 \text{ mg.mL}^{-1}$ . However the parameter temperature decreases this response when it is changed from low to high levels.

### **Conclusion**

The phycocyanin extraction was feasible at temperature around 23 to 25°C and biomass to solvent ratio of  $0.08 \text{ g.mL}^{-1}$ . In these conditions it was possible to extract  $3.15 \text{ mg.mL}^{-1}$  of phycocyanin concentration on extract, 0.49 of purity and  $45 \text{ mg.g}^{-1}$  of phycocyanin on dried biomass.

### **References**

- [1] Abalde, j., Betancourt, l., Torres, e., Cid, a., Barwell, c., 1998. Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. *Plant Science*, 136, 109–120.
- [2] Bennet, A., Bogorad, l., 1973. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *The Journal of Cell Biology*, 58, 419–435.
- [3] Reis, a., mendes, a., Lobo-Fernandes, h., Empis, j. a., Novais, j. m., 1998. Production, extraction and purification of phycobiliproteins from *Nostoc* sp. *Bioresource Technology*, 66, 181–187.
- [4] Vonshak, a., 1997. *Spirulina platensis* (Arthospira) – Physiology, cell biology and biotechnology. Ed. Taylor& Francis.

### **Acknowledgements :**

CNPq, CAPES.

## OPTIMIZATION OF *SPIRULINA PLATENSIS* PRODUCTION IN OPEN RACEWAY PONDS UNDER SEMICONTINUOUS CULTIVATION

CHRISTIAN OLIVEIRA REINEHR<sup>1</sup>, JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Food Technology, Center of Environmental and Food Sciences, Communitarian Regional University of Chapecó (UNOCHAPECÓ), Chapecó, SC, Brazil

<sup>2</sup>Laboratory of Biochemical Engineering, Department of Chemistry, Federal University Foundation of Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brazil.

\*Corresponding author. Address: P.O. Box 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil.

[dqmjorge@furg.br](mailto:dqmjorge@furg.br)

The commercial cultivation of microalgae in industrial scale began in the 60's in Japan with the culture of *Chlorella*, followed by the 70-90's with the cultivation of *Spirulina* in Mexico, United States and China. Nowadays the cyanobacterium *Spirulina platensis* is extensively employed in human nutrition because it is a source of proteins, vitamins, phenolic compounds and unsaturated lipids. The commercial production of *Spirulina* biomass is almost based exclusively in open reactors, especially open raceway ponds. Although some problems in production plants are frequently observed, the open cultivation of *Spirulina* is easily accomplished (Borowitzka, 1999; Tredici *et al.*, 1993).

Microalgae cultivations in industrial scale are, most of the time, economically unviable of being accomplished in batch mode, in function of the necessary time for loading, discharging and cleaning of the reactor. In semicontinuous mode the reactor is initially filled with the cultivation medium and incubated under ideal conditions. After certain period a specific cultivation volume is removed and added equal amount of fresh medium (Otero *et al.*, 1998). This cultivation mode presents operational advantages, such as to avoid the constant inoculums change, besides maintaining the microorganism in high growth rates (Fábregas *et al.*, 1995). Although semicontinuous culture is frequently used for the industrial production of *S. platensis* because this type of cultivation allows the culture to be maintained for extended periods of time few scientific studies have been made on this type of cultivation as applied to cyanobacteria.

To optimize the semicontinuous cultivation of *S. platensis* we used a Box-Behnken factorial design in which the variables were biomass concentration (0.4, 0.6 and 0.8 g.L<sup>-1</sup>), renewal rate (20, 40 and 60%) and culture medium. Cultivation was in 6 L open raceway ponds, with 5 L of medium and initial biomass concentration of 0.15 g.L<sup>-1</sup>, at 30°C with a 12 h photoperiod at 3000 Lux (Costa *et al.*, 2003), the total cultivation time being about 1500 h (about 62 days). The microalga *Spirulina platensis* LEB-52 (Costa *et al.*, 2003) was used in this study. For preparation and maintenance of the inoculums, as well as in the experiments, Zarrouk medium, standard for the cultivation of *Spirulina*, was used (Zarrouk, 1966). This medium was used in three different dilutions, codified as: A (pure medium without dilution), B (dilution at 50%), C (dilution at 20%), according to the proposed factorial design. Daily samples were collected for controlling biomass concentration.

Analyzing the final results of the cultivations in semicontinuous mode, runs 3, 5 and 7 (cellular concentrations of 0.40 g.L<sup>-1</sup> and renewal rates of 60, 40 and 40%, respectively) were the runs which presented the highest specific growth rates (0.1339, 0.1156 and 0.1377 day<sup>-1</sup>, respectively), representing an increase of up to 260% on the lowest values of growth rate, obtained in runs 2 and 9 (cellular concentrations of 0.80 and 0.60 g.L<sup>-1</sup> and renewal rates of 20%, respectively), indicating that the parameter increased in lower cellular concentrations and higher renewal rates. In relation to the productivity, the highest result was obtained in run 7 (46.2 mg.L<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup>), indicating an increase of 70% in relation to the lowest values, obtained in runs 1, 2 and 9 (renewal rates of 20%).

Vonshak *et al.* (1982) verified that cellular concentrations between 0.4 and 1.0 g.L<sup>-1</sup> of *Spirulina* caused a decrease in the photosynthetic potential of that microorganism, because of the absence of incident light on most of the cells, caused by shadowing effect by the cells themselves. Even in concentrations around 0.5 g.L<sup>-1</sup>, considered as ideals for the maximal photosynthetic efficiency, about 80% of the cells were in complete darkness in certain instant.

The three studied factors presented significant influence (p<0.05), as much in linear as in quadratic form on the specific growth rate. As the quadratic effect of the cellular concentration was significant, the behavior of the specific growth rate in function of that concentration was not linear, having an increase of the specific growth rate with the lowest level of the variable (0.40 g.L<sup>-1</sup>). The quadratic effect of the renewal rate was also significant, having maximum point with renewal rate between 40

and 60%. Regarding to cultivation medium, there was higher specific growth rate with 20% of Zarrouk medium, and there was lower specific growth rate with standard cultivation medium.

The specific growth rate increased when the cellular concentration reduced, for any renewal rate ( $p < 0.0001$ ). Besides, the growth rate also increased with increase of the renewal rate from 20 to 40% ( $p < 0.0001$ ). However, between the renewal rates of 40 and 60% the specific growth rates were statistically equal ( $p = 0.4991$  and  $p = 0.6948$ ) for cellular concentrations of 0.60 and 0.80  $\text{g.L}^{-1}$ .

With regard to the productivity, the linear effect of the cellular concentration was significant and negative, having an increase in the inferior level of the variable (0.40  $\text{g.L}^{-1}$ ). The linear effect of the renewal rate presented significant positive influence; however, the quadratic effect was also significant, having maximum point between renewal rates of 40 and 60%. Besides, there was higher productivity with medium containing 20% of Zarrouk and lower productivity with standard cultivation medium. The interaction effects between the cellular concentration and the renewal rate and between cellular concentration and cultivation medium on the productivity were also significant ( $p < 0.05$ ). The productivity was lower when the renewal rate was 20% ( $p < 0.0001$ ), independently of the cellular concentration. However, when the renewal rate was 60%, the productivity increased ( $p = 0.0314$ ) with decreasing cellular concentration from 0.80 to 0.40  $\text{g.L}^{-1}$ .

Based on the statistical models the response surfaces for the productivity are presented in Figure 1, using pure Zarrouk medium and Zarrouk medium diluted at 20%, respectively. The maximal productivity of the model was with concentration of 0.40  $\text{g.L}^{-1}$ , renewal rate of 50% and cultivation medium diluted five times. The productivity obtained with diluted cultivation medium and cellular concentration of 0.40  $\text{g.L}^{-1}$  was significantly higher ( $p = 0.0005$ ) than that with the standard medium, showing that the growth conditions of the microalga were benefitted with the dilution of the original medium.

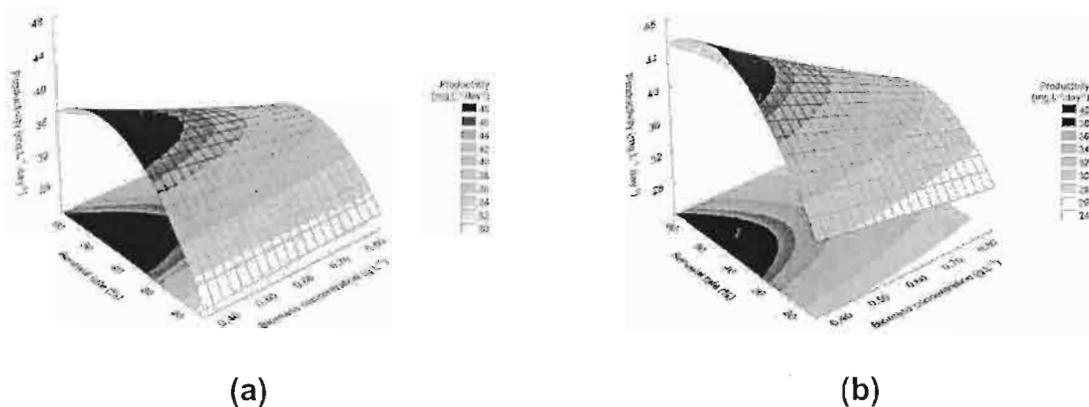


Figure 1: Response surfaces for productivity in function of cellular concentration and renewal rate using: (a) Zarrouk medium; (b) Zarrouk medium diluted at 20%

This observation shows that the synthetic medium usually used for the cultivation of the microalga *Spirulina*, proposed by Zarrouk (1966), has concentrations of nutrients overestimated for semicontinuous mode, where there is periodic nutrients feeding, corroborating the results obtained in this work, where the highest specific growth rates and productivities were reached being used diluted Zarrouk medium.

The cellular concentration and the renewal rate presented influence in the process, and higher specific growth rates and productivities were obtained with lower cellular concentration (0.40  $\text{g.L}^{-1}$ ) and renewal rate between 40 and 60%. With pure Zarrouk medium, specific growth rates of 0.134  $\text{day}^{-1}$  and productivities of 37.7  $\text{mg.L}^{-1}.\text{day}^{-1}$  were obtained, but with Zarrouk medium diluted five times, the highest specific growth rates and productivities were 0.138  $\text{day}^{-1}$  and 46.2  $\text{mg.L}^{-1}.\text{day}^{-1}$ , respectively.

## References

- Borowitzka, M. A. (1999) Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, 70, 313-321.
- Costa, J. A. V.; Colla, L. M.; Duarte Filho, P. (2003) *Spirulina platensis* growth in open raceway ponds using fresh water supplemented with carbon, nitrogen and metal ions. *Zeitschrift für Naturforschung C – A Journal of Biosciences*, no prelo.

- Fábregas, J.; Patiño, M.; Arredondo-Vega, B. O.; Tobar, J. L.; Otero, A. (1995) Renewal rate and nutrient concentration as tools to modify productivity and biochemical composition of cyclostat cultures of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44, 287-292.
- Otero, A.; Domínguez, A.; Lamela, T.; García, D.; Fábregas, J. (1998) Steady-states of semicontinuous cultures of a marine diatom: Effect of saturating nutrient concentrations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 227, 23-34.
- Tredici, M. R.; Zittelli, G. C.; Biagiolini, S.; Materassi, R. (1993) Novel photobioreactors for the mass cultivation of *Spirulina spp.* In: *Spiruline*, algue de vie. Bulletin de l'Institut océanographique, n. 12, 89-96, ISBN 2-7260-0158-0.
- Vonshak, A.; Abeliovich, A.; Boussiba, S.; Arad, S.; Richmond, A. (1982) Production of *Spirulina* biomass: effects of environmental factors and population density. *Biomass*, 2, 175-185.
- Zarrouk, C. (1966) Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthèse de *Spirulina maxima* Geitler. Ph.D. Thesis, University of Paris.

## GROWTH OF *SPIRULINA PLATENSIS* UNDER COMBINED ULTRAVIOLET LIGHT (UV-A, B AND C) OR UV-A ONLY

FILGUEIRA, D. M. V. B.<sup>1</sup>, PINTO, M. H.<sup>2</sup>, COSTA, J. A. V.<sup>2</sup> & TRINDADE, G. S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departament of Physiological Science, FURG, Rio Grande, RS, Brazil

<sup>2</sup>Laboratory of Biochemical Engineering, Department of Chemistry, Federal University Foundation of Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brazil.

\*Corresponding author. Address: P.O. Box 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil.

[dqmjorge@furg.br](mailto:dqmjorge@furg.br)

### Abstract

The cyanobacterium *Spirulina platensis* is thought to be one of the oldest cyanobacterial species, with an estimated age for the species of about 3 billion years. In some countries *Spirulina* is commonly used as food due to its high content of proteins, vitamins, phenolics and lipids (particularly  $\gamma$ -linolenic acid). The ultraviolet (UV) spectrum is divided into UV-A, B and C which differ in respect to their wavelengths and energies, UV-A and UV-B being the principal wavelengths reaching the biosphere. The different types of UV are absorbed (and damage) by different cellular components, DNA being damaged by UV-B and C and cell membranes by UV-A. We investigated the influence of UV light on *S. platensis* standard strains LEB-52 and Paracas growing under various culture conditions. In one set of experiments each strain was cultured in a system illuminated with a germicidal lamp emitting all three UV wavelengths, while in another set of experiments the strains were illuminated with UV-A only using a similar relative UV dose. Each set of experiments contained control cultures which were illuminated with visible light. The biomass concentration and pH of the culture medium were analyzed every 24h. The UVR dose used inhibited ( $p < 0.05$ ) the growth of *S. platensis*, with the Paracas strain being more sensitive than the LEB-52 strain. Control cultures exposed to visible light showed significantly ( $p < 0.05$ ) better growth than those exposed to UV light, irrespective of the type of UV used but the results obtained with UVA suggest the use of lower doses. These results suggest that the wavelength of UV light is responsible for the inhibition of growth seen these experiments.

keywords: Light, *Spirulina platensis*, Ultraviolet

The cyanobacterium *Spirulina platensis* is thought to be one of the oldest cyanobacterial species. Its origin is estimated to date from about 3 billion years ago. Nowadays, *Spirulina* is produced commercially by several companies around the world. The product is mainly sold as a human food supplement and animal food source [1] due to its high content in proteins, vitamins, fenolic composts and lipids, specially the  $\gamma$ -linolenic acid. It also has other indications due to their hypocholesterolemic, immunestimulant, and anti-tumoral activities [2].

Commercial production of *Spirulina* is based almost exclusively on open raceway ponds [3]. The two principal advantages of this system are the small capital investment and the use of a free source of energy, the solar irradiance [4].

Ultraviolet Radiation (UVR) is present in the solar irradiance. It includes a strip of wavelengths that varies between 200 nm and 400 nm. UVR is divided into three bands named UVA (400-320 nm), UVB (320-290 nm) and UVC (290-200 nm). The UVR strip that includes UVB and UVA is also called solar UV, since UVC does not reach the atmosphere [5]. The knowledge of UVR effects in living organisms has attracted the attention of researchers, since organisms are continually exposed to this radiation. Besides the wavelength, UVR strips differ in their preferential cellular target: DNA (UVB and UVC radiation) or cellular membrane (UVA radiation) [6].

In the present study, the influence of UVR on *S. platensis* standard strains growing under various culture conditions was analyzed. For that, two strains of *S. platensis*: LEB-52 and PARACAS were used. Cultures were maintained for 30 days in culture medium Zarrouk 100% with an initial concentration of 0.15 g/L. Experiments were performed in a BOD-type incubator at fixed temperature (30°C) and photoperiod (12 h light/12 h dark). In each set of experiments, each strain was cultured in a system illuminated with a germicidal lamp emitting all three UV wavelengths or illuminated with UV-A only, but using a similar relative UV dose. UVR doses used were equivalent to 15 min exposure per day. In the set of experiments illuminated with a germicidal lamp, doses obtained were: UVA = 21.42 J/cm<sup>2</sup>, UVB = 10.8 J/cm<sup>2</sup>, UVC = 162 J/cm<sup>2</sup> and PAR (light visible) = 25,81 J/cm<sup>2</sup>. In the set of

experiments illuminated with UVA only, doses were: UVA = 23.38 J/cm<sup>2</sup> and PAR = 25.81 J/cm<sup>2</sup>. In each set of experiments, the corresponding controls (without UV) were run. The cyanobacterium biomass and the pH of the culture medium were measured every 24h. Biomass was determined by a spectrophotometric method. Data obtained were subjected to two-way analysis of variance followed by the Tukey test. Significant level adopted was 95%.

Results obtained are shown in figure 1.

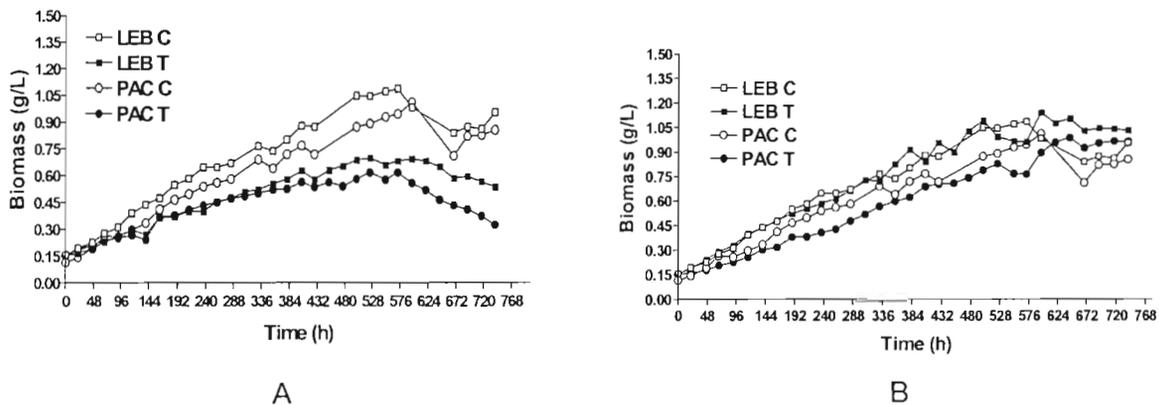


Fig. 1: Time course of biomass variation of strains LEB-52 (LEB C = control; LEB T = treated) and Paracas (PAC C = control; PAC T = treated) irradiated with UVR (A) or UVA (B).

UV doses used significantly inhibited ( $p < 0.05$ ) the *S. platensis* growth, with the Paracas strain being more sensitive than the LEB-52 strain. Control cultures exposed to visible light showed significantly ( $p < 0.05$ ) better growth than those exposed to UVR or UVA. However, UVA induced a significantly lower inhibition than the UVR, suggesting that lower doses of UVA could be used without any significant effect on cyanobacterium growth. These results suggest that UVA is not the major responsible for *Spirulina platensis* death.

## References

- [1] Belay, A.; Ota, Y.; Miyakawa, K.; Shimamatsu, H. 1993. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. *J. Appl. Phycol.* **5**: 235–241.
- [2] Hirahashi, T.; Matsumoto, M.; Hazeki, K.; Saeki, Y.; Ui, M.; Seya, T. 2002. Activation of the human innate immune system by *Spirulina*: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*. *International Immunopharmacology*, **2**: 423-434.
- [3] Tredici, M.; Chini Zitelli, G.; Biagiolini, S.; Materassi, R. 1993. Novel photobioreactors for the mass cultivation of *Spirulina* spp. *Bull. Inst. Oceanogr. (Monaco)* **12**, 89–96.
- [4] Chaumont, D. 1993. Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture. *J. Appl. Phycol.* **5**: 593–604.
- [5] Chapman, R. S.; Cooper, K. D.; Fabo, E. C.; Frederick, J. E.; Gelatt, K. N.; Hammond, S. P.; Hersey, P.; Koren, H. S.; Ley, R. D.; Noonan, F.; Rusch, G. M.; Sarasin, A.; Selgrade, M. J.; Sobolev, I.; Ward, B. J.; Werkema, T. E. 1995. Solar Ultraviolet Radiation and the risk of infectious disease: summary of a workshop. *Photochem and Photobiol.* **61** (3):223-247.
- [6] Godar, D. E. & Lucas, A. D. 1995. Spectral dependence of UV- induced immediate and delayed apoptosis: the role of membrane and DNA damage. *Photochem Photobiol.* **62**: 108-113.

## MIXOTROPHIC CULTIVATION OF *SPIRULINA PLATENSIS* IN DIFFERENT PHOTOBIOREACTOR CONFIGURATIONS

MICHELE R. ANDRADE<sup>1</sup>; ELISANGELA M. RADMANN<sup>1</sup>; VANESSA S. CERQUEIRA<sup>1</sup>; ADRIANO S. ARRUDA<sup>1</sup>; JANAÍNA F. M. BURKERT<sup>1</sup>; JORGE A. V. COSTA<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Biochemical Engineering, Federal University Foundation of Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brazil

\*Corresponding author. Address: P. O. Box 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS Brazil.  
[dqmjorge@furg.br](mailto:dqmjorge@furg.br)

*Spirulina* is a cyanobacteria rich in proteins (65-75% dry weight) normally cultivated in liquid medium in open raceway ponds (Jiménez et al., 2003; Shimamatsu, 2004). Its biomass, after drying, is an edible material of high nutritional value, which can be used as a food supplement. Therapeutics properties attributed to *Spirulina* have been studied around world, including effect against HIV (Hirahashi et al., 2002; Teas et al., 2004).

Since *Spirulina* can grow photoautotrophically using photosynthesis to fix carbon but can grow also combine autotrophic and heterotrophic metabolic processes and grow mixotrophically, mixotrophic cultivation could result in better yields.

Large-scale commercial photobioreactors (PBR) for the cultivation of *Spirulina* are usually rectangular open ponds, although for small-scale cultivation square photobioreactors of same volume are easier to construct.

Optimal temperature conditions for *Spirulina* growth is 30 – 35°C. Although most of Brazil has a tropical climate the southernmost state, Rio Grande do Sul (RS), has a mean temperature lower than that of a tropical country.

The culture medium was tap water supplemented with 10 or 20% Zarrouk's medium (Zarrouk, 1966). Mixotrophic cultivations medium was supplemented with glucose at an initial concentration 0.5 gL<sup>-1</sup>. The initial *S. platensis* biomass concentration in all the ponds was 0.15 gL<sup>-1</sup>.

This study was carried out in the city of Rio Grande-RS. *S. platensis* strain LEB-52 (Costa et al., 2001) was cultured for 40 days in 450 L open photobioreactors of two different formats (rectangular and square) both with superficial area 1.5 m<sup>2</sup>, agitation being accomplished by submerged pumps with capacity of 650 Lh<sup>-1</sup>, with no added temperature control.

Cell concentration was determined daily by measuring suspension optical density at 670 nm in spectrophotometer FEMTO 700 Plus. Maximum and minimum temperatures were registered daily by digital thermometer.

We used a 2<sup>3</sup> factorial design for experiments, as show in table 1. An ANOVA analysis was used for effects determination.

Figure 1 show *S. platensis* biomass concentration during this study. The presence of organic substrate seemed to compensate the lower inorganic carbon concentration: in the autotrophic cultures the maximum *S. platensis* biomass concentration was 1.9 gL<sup>-1</sup> occurred in water containing 20% Zarrouk's medium, while in the mixotrophics cultures the maximum *S. platensis* biomass concentration was 2.7 gL<sup>-1</sup> occurred in water containing 10% Zarrouk's medium.

In the squares PBRs, biomass concentration was increased with Zarrouk's medium concentration increase from 10 to 20%. In the rectangulars PBRs this effect was inverse.

Overall productivity in the mixotrophic cultures increased to 0.174gL<sup>-1</sup>day<sup>-1</sup> when the concentration of Zarrouk's medium in the culture medium was increased to 20%. In the autotrophic cultures overall productivity wasn't influenced by increase from 10 to 20% in Zarrouk's medium concentration.

The average maximum specific growth rate ( $\mu_{max}$ ) in the mixotrophic cultures was 0.062day<sup>-1</sup> lower than in the autotrophic cultures.

Temperatures during this study ranged from 8.5 to 36.9°C. The largest variations in temperature limits occurred after 15 days cultivation (not showed). Mixotrophic cultures responded better to the temperature variations, exhibiting better growth than autotrophics cultivation in this period.

Table 1- 2<sup>3</sup> factorial design for experiments

Run	PBR format	Cultivation	Zarrouk's medium
1	Square	Autotrophic	10%
2	Rectangular	Autotrophic	10%
3	Square	Mixotrophic	10%
4	Rectangular	Mixotrophic	10%
5	Square	Autotrophic	20%
6	Rectangular	Autotrophic	20%
7	Square	Mixotrophic	20%
8	Rectangular	Mixotrophic	20%

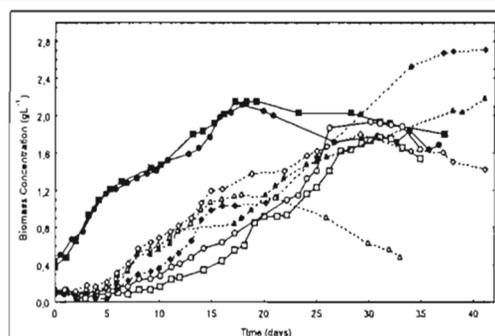


Figure 1 – Cell concentration of *S. platensis* with time (Run 1( $\Delta$ ), 2( $\diamond$ ), 3( $\blacktriangle$ ), 4( $\blacklozenge$ ), 5( $\square$ ), 6( $\circ$ ), 7( $\blacksquare$ ), 8( $\bullet$ ))

Comparing results of *S. platensis* growth in this study with those reported by Marquez et al., (1993) and Chojnacka and Noworyta (2004) both under optimal temperature and illuminance conditions, we can conclude that satisfactory *S. platensis* growth could be obtained in open ponds in Rio Grande city.

In conclusion, *S. platensis* was able to growth in open ponds in Rio Grande city climate, presenting satisfactory growth parameters, which could be increasing by manipulation of the variables studied. In squares PBRs biomass concentration was increased using Zarrouk's medium 20%. Was demonstrated the ability of the mixotrophic cultivation, with reduced concentration of Zarrouk's medium, for obtaining cellular concentrations larger than in autotrophic cultivation, although with smaller  $\mu_{max}$ . Overall productivity in mixotrophic cultures could be increased using Zarrouk's medium 20%. The authors are grateful to CAPES, CNPq, and FAPERGS for the financial support to realize this work.

## References

- Chojnacka, K.; Noworyta, A. (2004) Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 461 - 465.
- Costa, J. A. V.; Cozza, K. M.; Oliveira, L.; Magagnin, G. (2001) Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17, 439 - 442.
- Hirahashi, T.; Matsumoto, M.; Hazeki, K.; Saeki, y.; Ui, M.; Seya, T. (2002) Activation of the human innate system by *Spirulina*: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*. *International Immunopharmacology* 2, 423 - 434.
- Jiménez, C.; Cossio, B.; Niell, F. X. (2003) Relationship between physicochemical variables and productivity in open ponds for the production of *Spirulina*: a predictive model of algal yield *Aquaculture* 221, 331-345.
- Marquez, F. J.; Sasaki, K.; Kakizono, T.; Nishio, N.; Nagai, S. (1993) Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions *Journal of Fermentation and Bioengineering* 5, 408-410.
- Shimamatsu, H. (2004) Mass production of *Spirulina*, an edible microalga *Hydrobiologia* 512, 39 - 44.
- Teas, J.; Herbert, J. H.; Fitton, J. H.; Zimba, P. V. (2004) Algae - a poor man's HAART? *Medical Hypotheses* 62, 507 - 510.
- Zarrouk, C. (1966) Contribution à l'étude d'une cyanophycée. influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthese de *Spirulina máxima* Geitler Ph.D. Thesis, University of Paris.



# CULTURES INDUSTRIELLES



# INDUSTRIAL AND SEMI INDUSTRIAL PRODUCTION OF SPIRULINA, THIRD WORLD POTENTIAL (MODULAR SYSTEMS)

A. AYALA<sup>1</sup>, G. MANETTI<sup>1</sup>, R. BURGOS<sup>1</sup> & F. AYALA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Inyde S.A. (Chile)*

<sup>2</sup> *Solarium Biotechnology S.A. and AEH S.A. de C.V (México) [fayalaj@entelchile.net](mailto:fayalaj@entelchile.net), [aayalar@terra.cl](mailto:aayalar@terra.cl)*

---

## Summary

At the beginning Spirulina appeared to be an interesting alternative of rich protein biomass in order to produce some hydrocarbon fuel, but the same high protein content starts a lot of research which conclude that Spirulina is one of the most interesting source of nutrients for human consumption. "Spirulina is a source of protein and contains various vitamins and minerals. It may be legally marketed as a food or food supplement so long as it is labelled accurately and contains no contaminated or adulterated substances...", that is a definition found in an official document issued by FDA of USA at early 80's. In this new century this cyanobacterium could be a true solution for starvation and malnutrition of million peoples at Third World countries. After 15 years operation of Solarium facilities in its different production steps (small artisan low technology level, semi industrial appropriate technology, and industrial level), this company have an available know how in order to develop Spirulina production projects everywhere climatic and basic conditions allow the grows of this cyanobacterium, from the test tube to the industrial plant using local human "capital". Such technical knowledge could serve as a base for good relationship and the necessary true cooperation South-South. It has been found that it is possible to develop a reliable alternative which can operate with medium range technology methods for Spirulina production. Modular systems can start in small facilities and then scaling-up to semi industrial production. We can propose local solutions for local problems, and we can use Spirulina, "the most ancient food of the future" as a nice tool for the local malnutrition problems.....

## Introduction

When we say industrial or semi industrial production, is normal to think in a commercial activity. During the 80's commercial production of Spirulina take place in various countries and the largest producer was Mexico, which had facilities for 3 tons of spray-dried Spirulina per day. It is well known the story of Sosa Texcoco Co. which offered the ancient "Tecuitlatl" to modern Mexican people at very reasonable price. Other industrial and semi industrial attempts were developed at USA, Thailand, Taiwan and Israel.

After big efforts to promote Spirulina consumption as health food, during the second half of 90's new production facilities start out in China, India, Chile, Ecuador as well as the increasing of investments in USA's industrial plants, when definitive stop of Mexican production due a bizarre and unusual long strike, which stimulated a strong price competition.

Current main goal of industrial and semi industrial producers is to obtain a good food grade product at the lowest production cost. Producers of Third World countries are able to obtain better production costs without official subsidies considering that raw materials (basic chemicals), labour, technicians and industrial made equipments are less expensive than in the developed countries. Some industrial Spirulina producers have been redefined its commercial strategies, focusing its sales to finished goods with their own trade marks and some of them are developing other algae productions in order to obtain high value pigments.

Various developing countries have not only good climate, suitable waters, extensive and cheap lands or relatively inexpensive labour for Spirulina production. They have also technology, qualified professionals and workers, which allow to design and build diverse plant size, culture managing and to have good quality products. Moreover, some of them offer good conditions for safe investments. We are aware that in each country, local conditions dictate the choice of materials for reactor construction, Spirulina nutrition and a wholesome processing.

### **Semi industrial scale**

A very good example of semi industrial Spirulina production was established in China since early 90's and during 1995 about 80 of such settlements were in functions. We could define a semi industrial facility considering its size and annual production capacity which would be between 10 to 50 tons/year. The involved technology for semi industrial producing is a scaling up of small attempts and is not very different than industrial trials if we consider the basic flow sheet of unit operations. The differences in each system are equipment size, automatization, and of course the investment, but unit operations are almost the same.

Size of reactors (raceway ponds) in a semi industrial scale have an area between 500 a 1000 m<sup>2</sup>, covered or uncovered by a greenhouse structure of translucent polyethylene with UV treatment.

Harvesting is normally accomplished by filtration through simple sieve, directly operated over the reactors. Harvesting have at least 4 steps: a first step of netting all strange materials of diverse size, accomplished by simple nets which allow the pass of clean culture only. A second step of pre-concentration using gravity filtration or vibrating screening, where a biomass slurry of about 5 to 8% is obtained, and a third step of concentration which can use vacuum filtration, basket centrifugation or pressing the biomass. A fourth step of washing the thick cake of Spirulina biomass is possible in vacuum filtration and basket centrifugation where total solid can to increase to 20 to 23%. Using the pressing is possible to obtain to 26% of total solid but is not possible to wash the biomass.

Thick paste obtained in the previous steps must be dried and such unit operation is accomplished by trays solar driers in most of cases, but is possible that some projects utilize tray-driers gas or fuel operated or small spray-driers.

### **Industrial scale**

Current industrial scale is represented by big companies such as Earthrise, Cyanotech or Siam Algae which have been microalgae production for more than 20 years, and for other plants placed in Asia and America. These production facilities are capable to produce between 50 to 500 tons of dried Spirulina per year and we had heard about different and impressive futurists ideas for the construction of "mega plants" or giant farms which could produce thousands of tons per year.

Any industrial production of Spirulina have thousands of cubic meters of culture medium, and the surface of reactors is over 1000 m<sup>2</sup> in most of cases, is normal to find reactors of 2000, 3000 and 5000 m<sup>2</sup> with a medium service depth of 20 to 30 cm. These reactors use paddle wheels as agitation system which allows a soft movement in almost all the culture volume. An efficient mixing of Spirulina cultures is very important because it ensures that the filaments and the nutrient salts are evenly distributed within the culture volume, with nutrients readily available to the filaments. Mixing is also important in order that Spirulina filaments are evenly exposed to illumination, so that they remain photosynthetically active. Agitation can be achieved by various methods, such as airlift pumps, aeration or the most common mechanical stirring that is paddle wheel, which are in use in larger number of Spirulina settlements.

### **Mass culture controls**

**pH control:** At industrial and semi industrial production scale is possible to have only several controls, specially if reactors are open to the air. One of them is pH control, normally accomplished by CO<sub>2</sub> addition. Some culture systems utilize NaOH as a substitute of NaHCO<sub>3</sub> adjusting the pH with CO<sub>2</sub> and urea or ammonium sulphate as N source, taking care to feed such nutrients in a continuous flow maintaining it at constant but low concentrations. In such situation pH control is obligatory to maintain good culture performance. In cultures that use HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and CO<sub>3</sub><sup>=</sup>, control and adjusting the pH is very recommendable in order to maintain optimal conditions for high growth rate in a range between 8,7 and 9,5 specially if temperature range is between 25 to 35 °C.

**Contamination control:** A not negligible problem in mass production of Spirulina is contamination with undesirable species of microalgae or unwanted microorganisms that feed and also compete with Spirulina during night respiration. Chlorella and Navicula are the main species which contaminate Spirulina cultures and the protection comes from pH culture medium due to most of this species are discouraged by high pH and alkalinity, but the most important is to maintain a high Spirulina concentration.

Some protozoa could arrive very easy to the cultures, such as some amoebas species, and various from *ciliata* class. Using a relative high concentration of ammonium (but non toxic for Spirulina) for a

period of about 10 days, can decimate (or destroy) protozoa population. However some small protozoa could be allied of Spirulina due to they work eating detritus and cleaning culture medium, and never eat live Spirulina filaments. Rotifers and insects larvae are frequently found as normal inhabitants of natural lagoons or lakes where thrive Spirulina in all favourable seasons, but in the intensive cultures they are not welcome. These organisms can be eliminated harvesting it, and removed from the culture using filter nets of about 120 to 150 microns hole size for rotifers and small mosquito net of about 500 microns for insect larvae.

### **Harvesting**

At our Spirulina club, we know very well that the best alternative of harvesting Spirulina biomass would be accomplished by a system capable to remove completely all the biomass and don't produce cell breakage during the process. Lamentably such kind of harvester device is not yet available for large production scale. Current harvesting technology is based on filtration, using vibrator screens, vacuum belt filters or vacuum drum filters

Gravity filtration is used successfully for a pre-concentration unit operation with a yield of about 7 m<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>/h of a culture concentration of 700 mg per litre dry weight. The obtained biomass with 5 to 6% of total solid must be concentrated over 20% of total solids and washed. We consider the washing as a necessary step for remove adsorbed salts and can be accomplished by soft water jets directed over Spirulina cake on the bed filter or inside the centrifuge.

### **Industrial drying**

It is absolutely clear that the thick biomass cake must be dried as soon as possible in a continuous process, due to in few hours they will become fermented by associated bacteria and is possible to have its total loss, specially in hot climates. For such reason is necessary to dry the biomass immediately after concentration. Most industrial and semi industrial producers use the well know technology of spray drying, which is the same process that is used to produce powdered milk, eggs, soups, and a lot of chemicals. This ancient process has been perfected and current available units are normally automatized and computer controlled. It has many advantages, such as only few seconds are required for dehydrating algal biomass in its vacuum chamber, with a negligible damage in the nutritional composition of Spirulina and product is pasteurised very fast similar than UHTST process. Spray drying is not labour intensive and it need only one technician for its operation, and is easily to training and maintaining. With a good maintenance this kind of equipments could be operate for many years or decades. Main disadvantage of this system is a relatively high capital investment, and for its operation electric consumption is obligatory as well as gas or diesel fuel.

### **Conditioning packaging and storage**

Spirulina powder pass through a sieve immediately after drying in order to collect some gross particles normally generated on the internal wall of drying chamber, which are removed from, by vibrating of the equipment. Fine powder is packaging in oxygen barrier plastic bags which are inside fibreboard drums or carton boxes containing 20, 25, 50 or 100 Kg of spray dried powder. Finally such product can storage for many time (for years if necessary) only keeping away from humidity, light, heat and oxygen. As most of foods storage, for Spirulina is recommended a cool, dry and dark place.

### **Some limitations for semi industrial and industrial spirulina production**

Mass Spirulina production has been studied for almost 30 years, and many researchers agree in a list of problems which need solutions, specially when we are aware that once scaling up a significant decline in productivity is the true result.

We know very well that in outdoor conditions is possible to obtain high values of Spirulina biomass production... but at low level, it mean small reactors up to 250 m<sup>2</sup> and on controlled conditions of pH, light, temperature, mixing and no nutrient limitations, in a clear culture medium. However when we work at industrial or semi industrial scale, most of variables are not easily controlled, but only advising and collecting data from cultures. We must consider various situations which will affect productivity, yield, and finally production costs, for instance:

- 1) Culture temperature: in open raceway reactors, diurnal fluctuation of temperature could be very high in desert zones, (30 °C or more is very often at desert zones) During the cold season at early morning, culture temperature is over the air temperature (which is normally bellow 0 °C), but this temperature increases very fast and about 10:00 AM is 10 or 15 °C over the water temperature which

is below the minimum appropriate for *Spirulina* growth. In such season culture temperature reach a good level only afternoon.

Tropical climate is very different than arid zones, but is good too for *Spirulina* growing with a well controlled managing. Diurnal fluctuation is no more than 10 °C and minimum temperature of cultures in normally not less 20°C, excellent for photosynthesis which can begin without delay at early morning, compensating biomass losses by night time respiration.

Greenhouses are good alternative for climates with marked seasonal variations, such as in certain subtropical, semi arid or temperate zones. These allow to have excellent growth rates during the named cold season, better than open reactors during the hot season. In our geographic position (Chile South America at 20° 24' latitude, 69° 34' longitude) cold season means May to September.

2) Culture night respiration: It is well known that algae cultures maintained in the dark develop a normal respiration which could consume up to 35% of total biomass generated during photosynthetic period. This dark respiration is thermal dependent, and some studies shown that at high night time cultures temperature (about 30 °C) biomass loss reach about 40%. However at culture temperature below 15 °C loss in biomass is less than 15%. Some authors claim that could be possible to select strains capable to support dark respiration at optimal temperature for photosynthesis. Probably an ideal culture system, must be allow to regulate the temperature and go to the optimal from the light period to the dark period in few minutes and go back in few minutes again. But until now this figure is not possible at industrial scale.

3) Culture photo-oxidation: Everyday we found cultures with an over saturated O<sub>2</sub> concentration of 250% or more. This phenomenon is easily solved in small reactors by increasing speed of water flow. In big reactors with more than 1000 m<sup>3</sup> is normal to have a relatively low water flow (10 – 12 cm/sec) and during the day at high photosynthetic rates O<sub>2</sub> concentration can reach levels up to 500% of saturation which generates a strong inhibition of growth and photosynthesis. Photo-oxidation must be forewarned by an appropriated mixing of culture medium, which allows to eliminate the excess of O<sub>2</sub>.

4) Culture water consumption: In arid zones is normal to find strong evaporation rates of 1 or 2 cm per day, and when we are operating open reactors with 20 or 30 cm in depth, such evaporation are very important, increasing salt concentration, changing the optimal composition of culture medium and most probably the response of the micro-organism will be diminishing growth rate. For such reason water loss due to evaporation must be softly compensated along the day in order to maintain a constant volume of reactor.

On the other hand in tropical environments where heavy rains are normal, few hours of rain can dilute culture medium at 50% or more, changing dramatically the original composition of culture also, and may impose a severe osmotic shock on live biomass. Partial cover with translucent plastic could be a solution against the rain in tropical areas.

### **Modular production systems**

This idea have been developed considering the necessity to expand *Spirulina* production for Third World countries and to have available the know how for culture, processing and managing its own facilities, with local trained professionals, technicians and workers. Modular systems can be applied for small scale or for industrial attempts, designing the appropriated equipments, reactors, considering the size of a proposed facility.

At first stage we propose a module, which include the basic laboratory for control and strain maintenance, 2 small reactors of 10 m<sup>2</sup>, 2 reactors of 50 m<sup>2</sup> and 4 reactors of 250 m<sup>2</sup>, in such facility is possible to obtain between 50 and 65 Kg of wet *Spirulina* biomass per day, for immediate consumption or for freezing. With the same facility is possible to obtain between 10 and 15 Kg/d of solar dried *Spirulina* spaghettis. Such kind of plant could be enlarger as requirements, increasing reactors of 250 m<sup>2</sup> one by one. This module includes agitation by paddle wheels, harvesting by gravity filtration and a simple vacuum filtration, a drying system by solar tray drier, water pumps and pipes, PVC liner for reactors construction, the equipments for basic laboratory and the necessary fertilizers for full operation during the first six months. Such preliminary module could be storage in a container for sea transport, and could be carried where necessary. Moreover it could be include an electric generator if energy is not available at the desired place.

Other modules are proposed with line production reactors of 500 m<sup>2</sup>, 1000 m<sup>2</sup> and 2000 m<sup>2</sup>, and it use the appropriated size equipments for optimal operation.

Using a modular technology it should be possible to achieve economic production of Spirulina in developing countries, with methods that would be based on use of conventional energy sources backed up by solar power. Production facilities construction with cheap local material is also possible, as well as the use of some inexpensive fertilizers and CO<sub>2</sub> sources. Electric and wind power could be utilized in agitation and harvesting systems. A growing module which reach to 2500 m<sup>2</sup> of active surface, capable to produce about 10 tons of dried Spirulina per year, is a realistic prospect in warm and temperate climate and such unit of this size could be easily managed. Further enlargement of such facilities could be accomplished with the further construction of reactors with 500 or 1000 m<sup>2</sup> as need, as well as all the necessary equipments which could be locally constructed after the gained experience operating a first module of this proposed system.

In Chile, we have an interesting experience developing diverse alternatives for Spirulina production and such knowledge could be available for all countries of Third World which want to use this marvellous cyanobacterium, which I named "the most ancient food of the future", as a realistic tool for improve nutritional and life quality of million peoples specially children whose suffer hunger everyday and chronicle maladies accentuated by malnutrition. We believe that in the near future the announced cooperation South-South will be a true task for the human beings who work for their freedom and dignity.

# INDUSTRIAL LARGE-SCALE CULTURE OF *SPIRULINA SP.* FOR THE PRODUCTION OF MICROALGAE BIOMASS AND HIGH ADDITIVE VALUE PRODUCTS IN GREEK ARID SEACOASTS. A RESEARCH PROJECT

T.G. SOTIROUDIS<sup>1</sup>, E.T. NERANTZIS<sup>2</sup>, C. DELIYANNIS<sup>1</sup> AND G. KARYDAKIS<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biological Research and Biotechnology, The National Hellenic Research Foundation, 48 Vassileos Constantinou Ave. Athens 11635, Greece*

<sup>2</sup>*Technological Educational Institution of Athens, Faculty of Food Science and Nutrition, Laboratory of Biotechnology and Industrial Fermentations, Ag. Spyridonos Street, Aegaleo, Athens 12210, Greece*

<sup>3</sup>*IGME, Dept. of Geothermal Energy, Mesogeion 70, Athens 11527, Greece.*

The project (01PRAXE11, GSRT, Ministry of Development) aims to develop processes for the mass culture of edible microalgae and the cost effective production of high additive value products, especially nutritional antioxidants, by developing an integrated seawater agriculture system in available greek arid coastal land. Two culture systems, large raceway ponds and flat plate photobioreactors, will be combined for the production of low and high purity cyanobacterium *Spirulina sp.* (*Arthrospira*) biomass respectively. In this respect, a collaboration with ALGAE S.A. (Greece) has been established.

The microalgal cultivation will be based on a photosynthetic process using sunlight, CO<sub>2</sub> and nutrition elements contained in a fresh water/sea water culture medium heated by geothermal waters. Geothermal CO<sub>2</sub> will be used for nutrition algal media, while geothermal energy will be used for heating *Spirulina* culture systems and for drying algal biomass. The geothermal energy used in this way as well as setting up the cultivation ponds in a greenhouse contribute to increasing the daily yield by 20-30% (spring and autumn), and the cultivation season is prolonged (from March until November). The use of freely released geothermal CO<sub>2</sub> reduces the production costs of *Spirulina* biomass by over 25% (Fournadzieva et al, 2002).

Seawater pumped inland for aquaculture will also be used for irrigating planted mangroves near lagoons. This will be the first effort for planting mangroves in non-native Mediterranean environment. Microalgae open ponds, lagoons and mangroves will constitute a seawater farm. Mangrove ecosystems provide important services to coastal communities. Some of these are: (a) They serve as nursery grounds for marine life, (b) they protect the shore of the lagoons from erosion, (c) they reduce pollution of near-shore coastal waters, (d) they are important recreational grounds. Wastes from the microalgae ponds will be directed to the mangrove-planted area for irrigation and reduction of the pollution. By planting a large number of these salt tolerant plants we will green a substantial portion of coastal desert making the surrounding area more attractive to visitors (Sato et al, 1998).

Nutritional supplements produced from microalgae have been the primary focus of microalgal biotechnology for many years, while the role of dietary antioxidants and their potential benefits in health and disease have attracted great attention (Kehler and Smith, 1994). Although the occurrence of antioxidant compounds in plants and plant foods is well known (Sotiroudis et al., 2003) the antioxidant/free radical scavenging characteristics of *Spirulina sp.* are poorly known, except those concerning the protein phycocyanin constituent of the microalga (Romay et al., 1998; Belay, 2002). In this respect, the evaluation of free radical scavenging capacities of *Spirulina* extracts produced from the microalga, cultured in Greece, would be important for the exploitation of new antioxidants for foods and cosmetics. We found that the hot water extract of *Spirulina* powder contained high molecular weight sulfated polysaccharide component(s), as revealed by the formation of specific methylene blue dye-polysaccharide complexes (Jiao and Liu, 1999). These *Spirulina* polyanions are able to drastically reduce the DMPD and ABTS free radicals. We have further examined the antioxidant activities of *Spirulina* powder constituents, extracted with various organic solvents, that is, acetone, acetone/water (80%) and methanol, expressed as polyphenol (4-methylcatechol) antioxidant equivalents and found that all extracts contained polyphenols as determined by Folin-Ciocalteu reagent. For the determination of the antioxidant activity of the extracts, we have evaluated the amount of the dry mass of the extracts needed to reduce by 50% the initial concentration of DPPH. The order of the efficiency of the extracts for free radical reducing capacity was acetone extract > acetone/water extract > methanol extract. On the other hand, the order of the efficiency of the solvents for the extraction of polyphenols, as determined by Folin-Ciocalteu reagent, was acetone/water > methanol > acetone.

Accordingly, high purity *Spirulina* biomass can be effectively used as a source for the production of high additive value antioxidant components for commercial use in pharmaceuticals, cosmetics, food and animal feed.

### Experimental

*Spirulina* powder was a product of ALGAE S.A. Therma, Nigrita, Greece. *Spirulina* sulfated polysaccharide was extracted with boiling water and the extract was treated with 10% trichloroacetic acid and dialyzed against distilled water (Hayashi and Hayashi, 1996). Algal sulfated polysaccharide concentrations were determined with methylene blue (Jiao and Lieu, 1999). Total sugars of the polysaccharide were estimated by the phenol-sulfuric acid assay with glucose standard (Dubois et al., 1956). The antioxidant activity of polysaccharide and polyphenol extracts were determined using N,N-dimethyl-p-phenylenediamine (DMPD) radical (Fogliano et al., 1999), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical (Nenadis and Tsimidou, 2002) and ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) radical (Schlesier et al., 2002) assays. Determination of total phenolics was performed by the use of the Folin-Ciocalteu method (Gutfinger, 1981).

### References

- Belay A. (2002) The potential application of *Spirulina (Arthrospira)* as a nutritional and therapeutic supplement in health management. *J.Amer.Nutr.Assoc.* 5, 27-48.
- Dubois, M., Gilles, D.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances *Anal.Chem.* 28, 350-356.
- Fournadzieva, S., Pilarsky, P., Arvanitis, A., Fytikas, M., Koultziakis, E. (2002) Use of geothermal fluids for cultivation of the microalga spirulina in Nigrita-Serres. *Proceedings of the 7<sup>th</sup> National Conference on Renewable Energy Sources (Patras, Greece 6-8/11/2002)*, Institute of Solar Technology, Vol.B, pp.97-104.
- Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., Ritieni, A. (1999) Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *J.Agr.Food.Chem.* 47,1035-1040.
- Gutfinger T (1981) Polyphenols in olive oils. *J Am Oil Chem Soc*, 58: 966-968.
- Hayashi, T., Hayashi, K. (1996) Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina platensis*. *J.Nat..Prod.* 59,83-87 .
- Jiao, Q., Liu, Q. (1999) Simple spectrophotometric method for the estimation of algal polysaccharide concentrations. *J.Agr.Food.Chem.* 47, 996-998.
- Kehler, J.P., Smith, C.V. (1994) Free radical in biology:sources, reactivities and roles in the etiology of human disease. In: Frei, B. (Editor), *Natural Antioxidants in Human Health and Disease*. Academic Press, San Diego, pp. 25-62.
- Nenadis N, Tsimidou M (2002) Observations on the estimation of scavenging activity of phenolic compounds using rapid 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) tests. *J Am Oil Chem Soc*, 79: 1191-1195.
- Romay, C., Armesto, J., Ramirez, D., Gonzalez, R., Ledon, L., Garcia, I. (1998) Antioxidant and anti-inflammatory properties of c-phycoocyanin from blue-green algae. *Inflamm.Res.* 47, 36-41.
- Sato, G.H., Ghezze, T., Negassi, S. (1998) The Manzanar project: towards a solution to poverty, hunger, environmental pollution, and global warming through sea water aquaculture and silviculture in deserts. *In Vitro Cell Dev.Biol. Anim.* 34, 509-511.
- Schlesier, K., Harwat, M., Bohm, V., Bitsch, R. (2002) Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Rad.Res.*, 36, 177-187.
- Sotiroudis, T.G., Kyrtopoulos, S.A., Xenakis, A., Sotiroudis, G.T. (2003) Chemopreventive potential of minor components of olive oil against cancer. *Ital.J.Food Sci.* 15, 169-185.

## PRODUCTION DE SPIRULINE EN INDE

THOMAS SEBASTIAN

*Parry Nutraceuticals Ltd, Parry House 5th Floor, 43 Moore Street, Chennai 600 001, India*

---

### Résumé

La production estimée de Spiruline en Inde est d'environ 300 tonnes par an. Cette production est principalement utilisée comme complément de régime alimentaire dans le monde entier. De petites quantités sont cependant utilisées pour l'aquaculture, la nourriture animale et en cosmétique. Les propriétés encourageantes pour la santé de la Spiruline cultivée en Inde ont été largement étudiées dans ce pays : la lutte contre les déficiences en vitamine A chez les enfants en pré-scolarité, l'augmentation du taux de vitamine A durant la grossesse et l'allaitement, le traitement de l'anémie due à la déficience en fer, l'apport en complément nutritionnel aux enfants mal nourris, son utilisation pour le NIDDM, l'hyperlipidémie, l'arthrite... Les études sur les animaux ont porté sur l'action de la Spiruline sur l'hyperlipidémie, l'hépatotoxicité induite par l'ingestion d'alcool ou les médicaments anti-tuberculose, ses effets anti-stress... Sur le marché local, plus de 50 compagnies pharmaceutiques assurent la promotion de la Spiruline comme complément de régime.

Parry Nutraceuticals, qui fait partie du « Chennai based Murugappa Group » a lancé en Inde une production commerciale de *Spirulina* et de micro-algues, *Dunaliella* et *Haematococcus*. Le lieu de production se situe dans une ferme de 120 acres à Oonaiyur, un hameau du Tamil Nadu, loin de la pollution industrielle et agricole et loin des villes. L'alimentation en eau claire se fait à partir de puits profonds. Des systèmes de récolte d'eau de pluie permettent de recharger en eau et maintenir les niveaux. La Spiruline produite dans cette ferme est cultivée sous conditionnement dans des bassins type « raceway », récoltée, lavée et concentrée sur des écrans vibrateurs et autres concentrateurs, puis séchée et pulvérisée en fines poudres de densités variables. Chaque jour les contenus nutritionnels de la production sont analysés avec les teneurs en phytopigments, caroténoïdes, phycocyanine et chlorophylle. Quotidiennement des analyses sont faites sur la microbiologie, les légères impuretés, les phéophorbides et la microcystine. Tous les 3 à 6 mois des analyses de métaux lourds, résidus de pesticides etc. sont effectués. La Spiruline produite dans cette ferme est exportée vers plus de 30 pays avant d'approvisionner le marché local. La Spiruline est commercialisée sous forme de poudre, tablettes et capsules... La production est certifiée par les normes ISO 9001 (Quality Management Systems), ISO 14001 (Environmental Management Systems) et HACCP (Food Safety Standards) avant la certification GMP.

### Abstract

The estimated production of *Spirulina* in India is around 300 MT per year. *Spirulina* produced in India is primarily used as a food/dietary supplement worldwide though smaller quantities are used in aquaculture, animal feed and in cosmetics. The health promoting properties of *Spirulina* produced in India has been extensively studied in this country. Its use in combating Vitamin A deficiency in pre-school children, in improving Vit.A status during pregnancy and lactation, in iron deficiency anemia, as a nutritional supplement for malnourished children, in NIDDM and hyperlipidemics, in rheumatoid arthritis etc are some of the studies carried out in humans. Animal studies include its effect in hyperlipidemia, in alcohol-induced hepatotoxicity, hepatoprotective activity in antitubercular drugs-induced hepatotoxicity, anti-stress activity etc. In the domestic market *Spirulina* is promoted as a dietary supplement by more than fifty pharmaceutical companies.

Parry Nutraceuticals, part of Chennai based Murugappa Group has pioneered commercial production of microalgae *Spirulina*, *Dunaliella* and *Haematococcus* in India. The production facilities are located inside a 120-acre farm in Oonaiyur, a hamlet in Tamil Nadu, away from industrial and agricultural pollution and population centers. The requirement of clean water is met from a series of deep borewells with rainwater harvest systems to recharge and maintain the ground water levels. *Spirulina* produced at this farm is cultivated under controlled conditions in raceway type ponds; harvested, washed and concentrated using vibratory screens and other concentrators and spray dried into fine powders of varying bulk densities. Each day's produce is analyzed for its nutritional content including the phytopigments carotenoids, phycocyanin and chlorophyll. Daily analyses also include microbiology, light filth, pheophorbides and microcystin. Analysis of heavy metals, pesticide residues etc are carried out once in three to six months. *Spirulina* produced at this facility is exported to more

than 30 countries besides catering to the domestic market. *Spirulina* is marketed in the form of powder, tablet and capsules. The production facilities are certified under ISO 9001 Quality Management Systems, ISO 14001 Environmental Management Systems and HACCP Food Safety Standards besides GMP certification.

## PRODUCTION INDUSTRIELLE EN EQUATEUR

HALDEMANN FRANÇOIS

BIORIGIN Sa - Z.I, Maisomex - 1217 Meyrin - Suisse

### Résumé

Notre site de production est situé sur la ligne équatoriale sur les Andes à 2550m d'altitude. Cette situation nous offre les avantages suivants : un climat stable, 12h de photopériode journalière et une forte intensité lumineuse.

Nous avons développé une stratégie de recyclage du milieu de culture. Pour ce faire, nous avons construit une station d'épuration du milieu filtré avec plusieurs fosses anaérobies et plusieurs fosses avec aération forcée. Le milieu de culture est recyclé ainsi depuis 2001.

### Summary

Our production site is located on the equator at more than 8500 feet above sea level. Our site offers the following advantages: very stable climate, 12 hours of photoperiod all year long and strong light intensity.

We have developed a recycled system for the filtered culture medium. A plant has been built with some anaerobic ponds and other ponds with aeration. The culture medium had been recycled since 2001.

### Le recyclage de notre milieu de culture de spiruline : l'expérience d'Aldanempres. Cia Ltda Quito-Equateur

Notre site de production est situé sur la ligne équatoriale sur les Andes à 2550m d'altitude. Cette situation nous offre les avantages suivants : un climat stable, 12h de photopériode journalière et une forte intensité lumineuse.

Notre système de production est un Setlik type avec un plan incliné (figure 1). Cette technique nous amène à travailler avec une forte concentration de spiruline (environ 1 à 1,3 g de matière sèche/l) et un ratio volume sur surface relativement faible (90 litres/m<sup>2</sup>).



Fig. 1 : Plan incliné



Fig. 2 : Aération



Fig. 3 : Plateau d'aération

Nous avons rapidement imaginé qu'il serait possible et souhaitable du point de vue économique mais aussi environnemental de limiter au maximum les purges de notre milieu de culture. S'il n'est vraisemblablement pas imaginable d'éviter quelques rejets issus du nettoyage des bassins, il est par contre possible de recycler la totalité du milieu filtré tout au long de l'année.

Jusqu'en 2001 nous avons pratiqué une purge journalière équivalente ou supérieure à 1% du volume en culture soit 5 à 8 m<sup>3</sup> par jour. Cependant, le recyclage de la majeure partie du milieu filtré directement dans la culture (soit environ 35 à 40 m<sup>3</sup>/jour) posait des problèmes de salissure du milieu de culture, notamment liée à la charge en matière organique relative à la filtration.

Il est relativement difficile de se procurer du bicarbonate de sodium en Equateur car ce produit est enregistré par le CONSEP, l'organisme d'état qui gère les produits chimiques pouvant être utilisés dans

la transformation de stupéfiants. De plus, de par son statut de produit apparaissant dans la liste du CONSEP, le bicarbonate est relativement cher (environ 0,45 USD/kg pour l'achat d'une tonne.)

Grâce à notre fumure carbonée, issue principalement par du dioxyde de carbone, nous n'avons cependant pas les problèmes engendrés par l'utilisation de bicarbonate, à savoir une augmentation progressive en sodium du milieu de culture.

Notre station de traitement du milieu de culture est composée d'une première partie de plusieurs bassins fonctionnant de manière anaérobie, suivie d'une autre partie fonctionnant de manière aérobie avec aération forcée.

La dizaine de bassins successifs de environ 100m<sup>3</sup> chacun permet de traiter 50m<sup>3</sup>/jour. Soit une durée moyenne de rétention d'environ 20 jours.

Les bassins fonctionnant de manière aérobie sont aérés depuis le bas par une turbine (figure 2).

Les avantages de notre station de recyclage sont les suivants :

- Possibilité de segmenter le flux pour intervenir sur un seul secteur (par ex: nettoyage, réserve de milieu prêt à répartir dans des bassins)
- Intervention de manière physique et biologique
- Recyclage total du milieu filtré.

La DBO passe d'environ 15 mg/l à l'entrée du système, à moins de 8 mg/l à la sortie.

Nous avons apporté des améliorations en 2003 sur la partie aérobie à savoir l'utilisation de petits plateaux d'aération (figure 3) permettant de mieux maîtriser la taille des bulles et, par là même, la capacité d'échange en oxygène avec le milieu.

Nous estimons qu'il est encore possible d'apporter des améliorations à notre système, notamment en optimisant la filtration de spiruline.

Cependant, nous estimons que le recyclage de 5-10m<sup>3</sup> par jour pour un milieu de culture estimé à 4,5 USD/m<sup>3</sup> est intéressant tant du point de vue économique (>10000 USD/an), mais aussi du point de vue environnemental.

# LA PRODUCTION DE PHYTOPLANKTON : L'EXPERIENCE DE LA SOCIETE MICRO ALGUES PROVENCE

OLIVIER LIGNON

*Société microalgues Provence, Route du Chevalet, 05700, Orpierre. provence.spiruline@free.fr*

---

## Résumé

Cette intervention portera sur notre expérience dans la production de microalgues avec les avantages, les inconvénients d'une unité de production ainsi qu'un point de vue sur l'orientation de la production de phytoplancton. Micro algues Provence installée depuis 1997 à la limite des Hautes Alpes et des Alpes de Hautes Provence, est une unité de production de différentes espèces de micro algues. Créée sur des fonds privés, d'une part sur l'initiative de personnes ayant une expérience tant dans la bio industrie que dans la culture de spiruline et d'autre part sur le constat suivant : l'industrie de la cosmétique a axé fortement sa recherche vers l'utilisation de molécules naturelles issues du monde végétal. Le phytoplancton est capable de synthétiser des molécules variées et spécifiques au monde aquatique, il devient donc particulièrement intéressant pour les secteurs de la diététique, de la cosmétique, et de la pharmacie. La société dispose d'un laboratoire où se déroulent les premières phases de la production. Les microalgues vont ensuite se développer sous serres (deux bassins de 90 m<sup>2</sup>). Pour optimiser nos productions de biomasse, toutes nos cultures se font en mode continu, avec nos propres milieux de culture et des paramètres contrôlés. La récolte est réalisée soit par centrifugation, soit par filtration, la biomasse est ensuite congelée ou séchée. Les espèces actuellement produites sont des microalgues dites « classiques » : Spiruline, Chlorelle, Porphyridium et Phaeodactylum.

## Abstract

This intervention will relate to our experience in the production of microalgae with the advantages, the disadvantages of a manufacturing unit as well as a point of view on the orientation of the production of phytoplankton. Micro Provence algae installed since 1997 at the limit of the Hautes Alpes and the Alpes de Haute Provence is a manufacturing unit of various species of micro algae. Created on private funds, on the one hand on the initiative of people having experience as well in the bio industry as in the culture of spirulina and on the other hand on the following established fact: the industry of the cosmetic strongly centered its research towards the use of natural molecules resulting from the vegetable world. The phytoplankton is able to synthesize molecules varied and specific to the aquatic world, it thus becomes particularly interesting for the sectors of dietetics, the cosmetic, and pharmacy. The company has a laboratory where the first phases of the production proceed. The microalgae then will develop under glasses (two ponds of 90 m<sup>2</sup>). To optimize our production of biomass, all our cultures are made in continuous mode, with our own culture media and of the controlled parameters. Harvest is carried out either by centrifugation, or by filtration, the biomass is then frozen or dried. The currently produced species are micro algae known as "traditional": *Spirulina*, *Chlorella*, *Porphyridium* and *Phaeodactylum*.

# **SANTE MALNUTRITION**



# STRATEGIES DE LUTTE CONTRE LES CARENCES EN MICRONUTRIMENTS, EN PARTICULIER EN FER, DANS LES PAYS EN DEVELOPPEMENT

JACQUES BERGER

*Directeur de recherches, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UR106 "Nutrition, Alimentation, Sociétés", 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier cedex 5, [j.berger@fpt.vn](mailto:j.berger@fpt.vn)*

---

## Résumé

Les carences en micronutriments en particulier les carences en fer, vitamine A et iode, représentent un problème majeur de santé publique des pays en développement. Les risques de carences évoluent au cours du cycle de vie et sont particulièrement élevés lorsque les besoins augmentent. Leurs conséquences sont multiples pour les femmes en âge fertile, lors de la grossesse et de l'allaitement, pour les nourrissons et les enfants. Elles influencent négativement le développement, en particulier cognitif, de l'enfant, provoquent des pertes de productivité et éducationnelle, augmentent la morbidité et la mortalité maternelle. Les carences de la prime enfance ont des implications au cours de la vie adulte et constituent un facteur de risque pour les futures générations avec des répercussions non négligeables en terme économique. Le contrôle des carences en micronutriments s'intègre dans la lutte contre la pauvreté et contribue au développement des pays concernés.

Lutter efficacement contre ces carences dans les pays en développement implique d'intégrer différentes approches. La supplémentation en micronutriments est nécessaire quand les carences sont importantes et réclament une action rapide. L'enrichissement en micronutriments d'aliments consommés par l'ensemble d'une population ou par des populations cibles est une approche à plus long terme, d'un meilleur coût-efficacité, actuellement en plein essor notamment dans le cadre d'un partenariat public-privé. L'adjonction de micronutriments au niveau familial aux aliments destinés aux enfants et jeunes enfants est une alternative. La diversification alimentaire et l'amélioration des pratiques alimentaires visent à augmenter la consommation et la biodisponibilité des micronutriments. Ces interventions sont d'autant plus efficaces qu'elles intègrent des mesures de santé publique comme le contrôle des infections et la promotion de l'allaitement maternel. Le succès du contrôle des carences en micronutriments requiert une volonté politique affirmée et la collaboration active de la communauté scientifique, de l'industrie alimentaire, des consommateurs, des agences internationales, bilatérales et des ONG.

## Abstract

Micronutrient deficiencies, especially iron, vitamin A and iodine deficiencies represent a major public health problem in developing countries. The risks of deficiencies evolve during the life cycle and are particularly high when the needs increase. Their consequences are multiple among women in fertile age, at the time of pregnancy and breast-feeding, among infants and children. They influence negatively the development, especially cognitive, of the child, cause productivity and educational losses, increase the morbidity and the maternal mortality. The deficiencies in infancy have implications during the adult life and constitute a risk factor for the future generations with substantial impact in economic term. The control of micronutrient deficiencies is part of the fight against poverty and contributes to the development of the countries.

The effective control of micronutrient deficiencies in developing countries implies to integrate various approaches. Micronutrient supplementation is needed when prevalence of deficiencies is high and requires a fast action. Fortification with micronutrients of food consumed by the whole population or by target populations is a better cost-efficacy long-term approach, currently in full rise within the framework of a public-private partnership. The addition of micronutrients at the family level to food intended to infants and young children is an alternative. Food diversification and the improvement of the food practices aim at increasing the consumption and the bioavailability of the micronutrients. These interventions are more effective since they integrate public health measures such as the control of infections and the promotion of the breast-feeding. To be successful, the control of micronutrient deficiencies requires strong political commitment and the active collaboration of the scientific community, the food industry, the consumers, the international and bilateral agencies and NGO.

## **Les carences en micronutriments : un problème de santé publique aux conséquences non négligeables**

Dans les pays en développement (PED), les carences en micronutriments représentent un problème de santé publique aux conséquences physiologiques et économiques non négligeables (1). Les principales carences identifiées concernent les carences en iode, fer et vitamine A (2), mais d'autres carences comme la carence en zinc, vitamine B12, riboflavine et acide folique co-existent probablement même si leur existence et importance n'ont pas encore été bien étudiées. La carence en fer touche près de 3,5 milliards de personnes à travers le monde principalement les femmes à partir de l'adolescence, les nourrissons et les jeunes enfants (2). La carence en vitamine A concerne environ 127 millions d'enfants d'âge préscolaire dont 4,4 millions présentent des signes de xérophtalmie et près de 20 millions de femmes enceintes, avec 25-35% des cas recensés en Afrique (3). La carence en iode concernerait environ 2 milliards de personnes avec près de 740 millions de goitreux (2) et près de 27% de la population mondiale présenteraient une consommation inadéquate en zinc. Dans les PED, ces différentes carences sont rarement isolées et souvent additionnelles.

Les conséquences de ces carences sur la santé de l'individu sont multiples. La carence en fer, qui dans sa forme la plus sévère résulte en anémie, se traduit chez l'adulte par une diminution de la capacité physique (4) et de la productivité (5). Chez la femme enceinte, les anémies sévères sont responsables de 20% des décès maternels (6). Elles augmentent les risques de morbidité et de mortalité fœtale et néonatale ainsi que le risque de prématurité et de faible poids du nourrisson à la naissance (7). Les enfants anémiques sont intellectuellement moins performants et présentent des troubles du comportement (8) et présenteraient une taille inférieure et une dynamique de croissance ralentie (9, 10). La résistance aux infections et l'immunocompétence sont diminuées (11). La carence en vitamine A est la principale cause de cécité et de troubles visuels (xérophtalmie) et augmente les risques de morbidité et de mortalité probablement par un effet sur l'intégrité des barrières épithéliales et des fonctions immunologiques (12). Elle augmente le risque de carence en fer et d'anémie notamment par un effet négatif sur la mobilisation des réserves en fer (13). La carence en iode est responsable de la formation de goitre mais surtout de retardement intellectuel pouvant aboutir au crétinisme. Elle a un impact négatif sur la croissance et elle est associée à une baisse de la résistance aux infections avec une augmentation de la morbidité et de la mortalité et à un taux élevé de mort-nés et d'avortements (14). La carence en zinc a un impact négatif sur le système immunitaire et sur la croissance et elle est associée avec un risque plus élevé de morbidité notamment de diarrhées (15). Les implications économiques de ces carences, notamment de l'anémie ferriprive, sont loin d'être négligeables : baisse de la force productive, augmentation des coûts de santé, perte de capital humain et social et diminution du PNB (16).

Les carences apparaissent principalement lorsque les apports en micronutriments ne permettent pas de couvrir les besoins, en particulier ceux élevés des populations à risque. Les besoins en micronutriments correspondent aux quantités nécessaires pour compenser les pertes physiologiques ou liées à des infections, et répondre aux circonstances particulières de la vie, comme durant les périodes de croissance accélérées et au cours de la grossesse. Dans les PED, ces carences sont principalement liées au faible contenu et/ou la faible biodisponibilité des micronutriments des régimes alimentaires. La carence en iode dépend du faible contenu en iode des sols et de l'environnement ou de la présence de facteurs goitrigènes dans les régimes. La carence en vitamine A résulte d'une consommation inadéquate d'aliments riches en rétinol ou précurseurs de la vitamine A (17, 18). La carence en fer résulte principalement de la présence dans le régime d'inhibiteurs de l'absorption comme les phytates ou tannins, très présents dans les aliments d'origine végétale qui constituent le plus souvent la base de l'alimentation des populations les plus pauvres des PED et/ou de l'absence de promoteurs de l'absorption comme par exemple la vitamine C (19).

D'autres facteurs peuvent être aussi responsables de ces carences. Les infections aiguës ou chroniques et/ou les infestations parasitaires. La carence en fer peut résulter d'hémorragies liées à certaines pathologies tumorales et les parasitoses digestives, principalement l'ankylostomiase augmentent sensiblement les pertes (20). Le paludisme s'accompagne d'une hémolyse qui provoque régulièrement une anémie mais la majorité du fer libéré est récupérée et réutilisée pour la synthèse de nouvelles molécules d'hémoglobine (21). Certains facteurs antinutritionnels comme certaines pratiques et tabous s'additionnent parfois.

L'importance de ces carences en micronutriments en terme de santé publique et leurs conséquences sur la santé de l'individu justifient la mise en œuvre d'interventions. La présentation qui va suivre

focalisera sur les différentes stratégies d'intervention possibles, plus spécialement dans le cadre de la lutte contre la carence en fer qui reste la carence la plus prévalente et la plus difficile à prévenir et à contrôler.

### **Développer des stratégies d'intervention**

#### Bien évaluer la situation :

La connaissance par les pays de la prévalence et de la sévérité des carences, de leurs facteurs étiologiques, de leur distribution géographique et des groupes à risque concernés est essentielle. La plupart des PED dispose d'enquêtes épidémiologiques nationales plus ou moins récentes ou pour le moins d'informations recueillies au travers d'enquêtes plus limitées qu'il sera peut-être nécessaire de compléter ou d'affiner. Ces informations ainsi que les conséquences de ces carences en terme de santé publique et d'impact économique et la disponibilité de stratégies d'intervention réalisables et économiquement viables doivent permettre aux autorités sanitaires et politiques des pays concernés de prendre la mesure de l'ampleur du problème et de planifier des interventions.

#### Un partenariat multisectoriel indispensable :

Le succès d'une intervention requiert l'implication du secteur public et la définition d'une politique de nutrition publique. La mise en œuvre d'un Plan National d'Action pour la Nutrition (1) est un des éléments dont dispose les pouvoirs publics, mais la définition d'une intervention ne peut toutefois concerner que ce seul secteur. Un partenariat multisectoriel incluant notamment la communauté scientifique, les pouvoirs publics, les agences internationales les ONG, le secteur privé mais aussi de la société civile notamment les consommateurs et bénéficiaires est souhaitable et considéré comme l'approche à privilégier. Ce partenariat doit être initié dès le début du projet, préciser les rôles de chacun et permettre l'échange constant d'informations appropriées. Le secteur public, soutenu par les organisations internationales et bilatérales, a pour rôle notamment d'informer, motiver, conseiller, contrôler et soutenir le secteur privé et d'assurer la diffusion de l'information auprès des populations. La communauté scientifique responsable de la composante recherche et développement doit démontrer la faisabilité et l'impact du programme. Le secteur privé doit participer à la définition des moyens et techniques à mettre en œuvre pour atteindre les objectifs. La société civile notamment les consommateurs destinataires des interventions bien informée doit se sentir concernée.

#### Définir les populations cibles :

La définition de la population cible est très importante pour la définition des stratégies à mettre en œuvre. Les interventions peuvent être dirigées vers l'ensemble de la population ou pour répondre aux besoins spécifiques d'un groupe de population présentant des risques particuliers. Les premières concernent par exemple l'enrichissement en fer et vitamines B des farines de blé (22) ou de maïs (23), l'enrichissement en fer de la sauce soja en Chine (24) ou de la sauce de poisson au Vietnam (25). Les secondes focalisent par exemple sur la production d'aliments de complément au lait maternel de haute valeur énergétique enrichis en micronutriments pour les nourrissons et jeunes enfants (26) ou la mise en place de déjeuners scolaires appropriés pour les scolaires (27) ou de biscuits enrichis (28) ou la supplémentation fer-folate des femmes durant la grossesse (29, 30).

#### Définir les interventions :

Les programmes à mettre en œuvre pour contrôler les carences en micronutriments doivent intégrer différentes approches comme la supplémentation, les approches alimentaires telles que la diversification alimentaire et l'enrichissement d'aliments, et des mesures globales de santé publique et de contrôle des infections et pathologies (19). Il est important d'indiquer que ces interventions sont complémentaires et non compétitives et que leur choix dépend de la prévalence, de la sévérité et des facteurs étiologiques des carences ainsi que des groupes à risque identifiés. Il est souvent recommandé de les mettre en œuvre simultanément du fait de leur impact différent dans le temps et de leur faisabilité en fonction des différents contextes.

#### La supplémentation

La supplémentation consiste en l'apport d'un nutriment sous forme médicamenteuse. Cette approche est d'intérêt lorsque le déficit en fer est important et doit être corrigé rapidement ou lorsque l'on cherche à atteindre les groupes à risque comme les femmes enceintes et les jeunes enfants pour lesquels le fer du régime ne suffit pas à couvrir leurs besoins élevés. Les recommandations usuelles visent en premier lieu à la supplémentation en fer-folate, quotidienne et universelle des femmes durant

la grossesse jusqu'à deux mois post-partum (29, 30). Quand la prévalence de l'anémie est élevée la supplémentation en fer doit être étendue aux femmes en âge de procréer et aux jeunes enfants.

En fait, seule la supplémentation anténatale est appliquée, le plus souvent avec une orientation thérapeutique. Dans la majorité des cas, cette supplémentation, délivrée par les services de santé des pays, n'a pas d'impact en terme de santé publique du fait d'une couverture insuffisante des populations à risque, de l'absence d'engagement politique et de support financier, de carences dans l'approvisionnement et la distribution des suppléments aux centres de santé, des croyances et pratiques culturelles, de la formation inadéquate des pourvoyeurs, de l'éducation des bénéficiaires, de la présentation et des caractéristiques des suppléments, des effets collatéraux indésirables (31).

Des alternatives ont été proposées, parmi lesquelles la supplémentation intermittente en fer, en général hebdomadaire. Des essais réalisés chez des enfants d'âge préscolaire et scolaire (32-34), des adolescentes (35, 36), des femmes en âge de procréer (35) et enceintes (37, 38), montrent que la supplémentation en fer hebdomadaire ou bi-hebdomadaire a un effet bénéfique sur le statut en fer et la réduction de la prévalence de l'anémie, comparable dans la plupart des cas à la supplémentation quotidienne, avec l'avantage de réduire les effets secondaires (32) et d'optimiser son coût-efficacité. Certaines études indiquent toutefois que cette approche serait moins performante chez la femme enceinte (39) et le nourrisson (40) en terme de concentration finale en hémoglobine et de réduction de la prévalence d'anémie.

Le statut en fer de l'individu et ses besoins physiologiques comme la durée de la supplémentation déterminent l'efficacité et le choix de l'approche. La majorité des études précédentes a été réalisée chez des individus anémiques. Or la supplémentation hebdomadaire se veut avant tout une approche préventive, visant à doter l'individu non anémique de réserves en fer et à éviter l'apparition d'une carence en fer notamment lors de l'absence de programmes d'enrichissement d'aliments en fer (31).

Chez la femme, cette approche consiste en la prise hebdomadaire d'un supplément en fer-folate plusieurs mois avant, puis pendant la grossesse et la période d'allaitement. Elle vise à lui assurer un statut en fer satisfaisant tout au long de sa vie reproductive et lui permettre d'aborder sa grossesse avec des réserves en fer optimales afin d'éviter la survenue d'une carence en fer au cours de celle-ci (41). Pour les nourrissons, les jeunes enfants et les adolescents, la supplémentation hebdomadaire préventive peut s'envisager comme une alternative à la stratégie d'enrichissement en fer d'aliments quand ceux-ci ne sont pas disponibles. L'efficacité et la durabilité de cette approche nécessitent l'information adéquate des populations, la participation des organisations communautaires telles que les écoles et les différentes associations comme par exemple les clubs de femmes. L'implication du secteur industriel pour la production de suppléments adaptés à cette approche est requise.

Dans les PED les carences en plusieurs micronutriments sont souvent concomitantes. Des essais de supplémentation associant deux ou plusieurs micronutriments sont en cours d'évaluation chez les nourrissons, les jeunes enfants et les femmes enceintes.

#### Enrichissement en micronutriments

L'enrichissement («fortification» en anglais) est défini comme l'addition à un aliment d'un ou plusieurs nutriments essentiels, normalement ou non contenus dans l'aliment, avec l'objectif de prévenir ou corriger une carence affirmée en un ou plusieurs nutriments dans l'ensemble d'une population ou dans des groupes de population spécifiques (42).

L'enrichissement d'aliments en micronutriments, pratiqué déjà depuis longtemps dans les pays industrialisés, a permis l'élimination des carences en micronutriments (43, 44). La conférence internationale sur la Nutrition de 1992 a souligné l'importance et la pertinence de cette approche pour lutter contre les carences en micronutriments dans les PED (1). Elle est considérée, quand elle est possible, comme l'approche de meilleur coût-efficacité pour améliorer le statut en micronutriments des populations ce qui est un gage de pérennité (45). Elle est socialement acceptable car, le plus souvent, elle ne modifie pas les habitudes alimentaires ni les aliments consommés. Le rôle principal de l'enrichissement en micronutriments des aliments est la prévention des carences, mais les produits enrichis contribuent aussi à l'élimination des carences installées.

Une des premières étapes concerne le choix du véhicule alimentaire à enrichir qui doit être consommé régulièrement et en quantité suffisante par la population cible. L'absence de véhicule alimentaire suffisamment consommé ou de manière régulière peut conduire à l'abandon d'un programme d'enrichissement. Le véhicule alimentaire doit pouvoir être enrichi dans des unités de production centralisées et la technologie d'enrichissement doit être simple et peu coûteuse. Le choix doit porter

sur un aliment ayant des qualités (couleur, odeur) pouvant masquer les éventuelles modifications qui pourraient intervenir lors de l'enrichissement. Les véhicules alimentaires les plus souvent utilisés, notamment au niveau national, sont des farines de céréales (blé ou maïs) ou des condiments comme le sel, le sucre ou les margarines (42, 46).

L'étape suivante consiste alors dans le choix du ou des fortifiants et des niveaux d'enrichissement: Un bon fortifiant doit être stable et ne pas produire de modifications organoleptiques notables de l'aliment véhicule ou des aliments auxquels il est mélangé. Il doit avoir une bonne biodisponibilité et la conserver au cours du stockage et de l'utilisation. Il doit être facilement disponible en complément alimentaire et d'un coût abordable.

Le choix de ces fortifiants ne présentent pas de gros problème en ce qui concerne l'enrichissement en iode, le plus souvent sous forme d'iodate de potassium (46, 47). Il en est de même pour l'enrichissement en vitamine A, essentiellement sous forme de palmitate de rétinol (48). C'est plus compliqué pour le fer. Les composés en fer les plus utilisés ont fait l'objet d'une excellente revue (43). Les composés de fer solubles dans l'eau sont plus aisément absorbés. Mais ce sont aussi ceux qui produisent le plus de problèmes organoleptiques indésirables tels que changements de couleur et de saveur, oxydation des lipides et rancissement. Les composés peu solubles dans l'eau mais solubles en milieu acide présentent une bonne absorption avec l'avantage d'avoir moins d'effets organoleptiques néfastes. Les composés peu solubles en milieu acide ne provoquent pas de modifications organoleptiques, mais leur absorption est très variable du fait de leur faible solubilité dans le suc gastrique. Enrichir un aliment consiste donc à trouver le meilleur compromis entre biodisponibilité et effets organoleptiques indésirables.

Parmi les composés les plus utilisés on peut citer : le sulfate de fer principalement utilisé dans les aliments lactés pour nourrissons; le fumarate de fer dans les céréales pour enfants (49) et les farines de céréales (22, 23) ; le pyrophosphate ferrique dans les céréales pour enfants et les poudres chocolatées; et récemment le pyrophosphate ferrique micronisé dispersible (50) qui aurait une meilleure biodisponibilité. Le fer élémentaire a aussi été très largement utilisé pour l'enrichissement des farines de céréales, en particulier de blé, le plus souvent sous forme de premix contenant des vitamines du groupe B (22). Cependant les effets bénéfiques de cet enrichissement sur le statut en fer des populations sont sujets à caution du fait de la biodisponibilité très variable de certains fers élémentaires et de l'absence d'études ayant montré leur efficacité. En fait le seul composé de fer élémentaire acceptable comme fortifiant serait le fer électrolytique (325 mesh) qui ne présente toutefois qu'une biodisponibilité moitié moindre de celle du sulfate de fer (51).

Le choix d'un "bon" composé en fer ne suffit pas à lui assurer une bonne absorption. En effet, les composants de l'aliment véhicule comme de ceux des autres composants du régime peuvent interférer. Certains, les activateurs, augmentent l'absorption, d'autres, les inhibiteurs, la diminuent. Les inhibiteurs les plus puissants sont les phytates, les tannins, et certaines protéines comme les protéines de soja (52). L'activateur le plus puissant est l'acide ascorbique (53) dont l'effet dose dépendant est fonction des autres activateurs ou inhibiteurs du régime (54). L'adjonction de vitamine C à l'aliment fortifié est une solution relativement onéreuse et sa dégradation lors du stockage peut poser problème: son effet bénéfique sur le fer élémentaire et le fumarate de fer est discutable (55). L'utilisation de composés où le fer est protégé des inhibiteurs est une alternative. Un composé en particulier présente des potentialités intéressantes : l'éthylène diamine tétracétate de fer et de sodium (NaFeEDTA). Il est stable et particulièrement intéressant pour les aliments nécessitant un stockage prolongé et des températures de préparation élevées ou qui contiennent des inhibiteurs du fer non-héminique (56). Il a l'avantage non seulement de conférer une meilleure absorption au fer qu'il contient, mais aussi de favoriser l'absorption de l'ensemble du fer non héminique du régime et celle du zinc (56). Dans le cas de régime contenant des inhibiteurs de l'absorption de fer, l'absorption du fer du NaFeEDTA, de l'ordre de 7-10%, est 2 à 3 fois supérieure à celle du sulfate de fer (57). Ajouté à de la sauce de poisson (25, 58), du curry (59) du sucre (60) le NaFeEDTA améliore le statut nutritionnel des populations.

Les quantités de micronutriments à ajouter à l'aliment véhicule dépendent de plusieurs facteurs. Tout d'abord des besoins des populations cibles; des apports quotidiens de micronutriments par l'alimentation et de la consommation de l'aliment enrichi; de la biodisponibilité estimée des micronutriments lors de la consommation de cet aliment (seul ou dans un repas); de la législation en cours dans le pays lorsqu'elle existe et des recommandations internationales. En général les niveaux d'enrichissement admis sont entre 15 et 30% des RDI. Des études d'efficacité biologique en condition

contrôlées sont alors nécessaires afin de prouver l'impact positif et l'absence d'effets secondaires ou néfastes de l'aliment enrichi.

#### Amélioration des pratiques alimentaires et diversification des régimes

L'amélioration des pratiques alimentaires et des styles de vie a pour but d'augmenter la consommation d'aliments riches en micronutriments. La consommation régulière d'huile de palme rouge apparaît comme une solution intéressante dans la lutte contre l'avitaminose A (61). Pour la carence en fer l'idéal est de tendre vers la consommation régulière d'aliments contenant du fer héminique (viandes, volailles, poisson, abats) mais ces produits sont souvent trop onéreux et inaccessibles aux populations défavorisées. Dans les PED, les régimes alimentaires sont souvent à base de céréales, de racines et de tubercules qui contiennent des quantités non négligeables de fer mais aussi des inhibiteurs de son absorption. Les pratiques traditionnelles qui réduisent les phytates et polyphosphates, comme le décorticage des céréales, le trempage, la germination qui active les phytases endogènes et la fermentation qui favorise un pH optimum pour l'activité des phytases, augmentent la biodisponibilité du fer. La préparation et la consommation de ces aliments avec des aliments riches en acide ascorbique (papaye, chou-fleur, tomates, agrumes...) permettent d'accroître l'absorption de fer (62). La préparation et le stockage des aliments dans des ustensiles en fer augmenteraient leur contenu en fer en particulier en présence d'aliments "acides". En revanche, la friture ou la cuisson prolongée de la viande réduit l'absorption de fer. La consommation de boissons comme le thé, riche en tannins, ou d'aliments riches en calcium doit être diminuée ou recommandée en dehors des repas.

La recherche agronomique a aussi un rôle à jouer à travers la sélection variétale de plantes présentant des quantités supérieures de micronutriments (fer, vitamine A) et/ou des quantités inférieures d'inhibiteurs et/ou des quantités supérieures de promoteurs de l'absorption de fer.

#### Les mesures de santé publique

Dans les pays tropicaux, d'autres facteurs s'additionnent pour aggraver la carence en fer et justifient la mise en œuvre de mesures de santé publique. Le traitement des infestations parasitaires intestinales par des antihelminthiques améliore le statut en fer (11, 63). Cet effet reste toutefois modeste en l'absence d'apport de fer et nécessite, du fait des reinfestations fréquentes des traitements périodiques (63). Ces mesures peuvent être renforcées par l'amélioration des conditions sanitaires et de l'hygiène de vie. Le paludisme, responsable de plus de 50% des anémies graves en zones endémiques, est diminué par l'utilisation prophylactique d'antimalariques, l'utilisation de moustiquaires et l'entretien de l'environnement visant à diminuer le développement des anophèles. La prévention de certaines infections par la vaccination permettrait de réduire la gravité de l'anémie chez les jeunes enfants (64). La promotion de l'allaitement maternel exclusif au moins jusqu'à l'âge de 4 mois diminue la fréquence des infections, améliore le statut en fer et l'état nutritionnel global du nourrisson. Le faible contenu en fer du lait maternel est contrebalancé par son absorption élevée (50%). L'espacement des naissances contribue à diminuer l'impact de la grossesse sur le statut en fer de la femme. Un court délai de ligature du cordon ombilical à la naissance augmenterait les réserves en fer de l'enfant.

#### Evaluer l'efficacité de l'intervention

##### Efficacité en conditions contrôlées

Cette évaluation appelée "efficacy" en anglais a pour objectif de déterminer si une intervention est efficace ou plus efficace qu'une autre dans des conditions idéales. Une bonne étude repose sur une étude randomisée, réalisée en double-aveugle, incluant un groupe témoin et dans laquelle la consommation régulière et en quantités appropriées de l'aliment enrichi ou non ou du supplément est rigoureusement contrôlée. Les variables ou indicateurs mesurés doivent être choisis avec soin afin d'optimiser les résultats. Ce peuvent être des variables biologiques comme la mesure de la concentration d'hémoglobine ou de contenus sériques en micronutriments ou des variables fonctionnelles comme la croissance ou les performances intellectuelles ou physiques. De nombreux exemples d'études d'efficacité existent en particulier dans le cadre de la supplémentation en fer (34, 65, 66) ou d'enrichissement d'aliments (25, 67).

##### Efficacité opérationnelle ou en conditions réelles ("effectiveness" )

Démontrer une efficacité en conditions contrôlées ne garantit pas que le programme aura un effet lorsqu'il sera mis en œuvre. Il est donc indispensable d'évaluer l'efficacité du programme dans les conditions réelles du terrain.

Cette évaluation est réalisée après la mise sur le marché et la promotion du supplément ou de l'aliment enrichi ou de la stratégie proposée. La méthodologie utilisée repose le plus souvent sur la comparaison de deux sites différents dont seulement un bénéficie de l'intervention et/ou sur des évaluations avant-après sur les mêmes sujets ou des sujets différents. Elle requiert en général des échantillons de population plus importants qu'une étude "d'efficacité", parfois des communautés entières. Les variables mesurées peuvent être aussi des variables biologiques ou physiologiques ou d'autres comme la consommation d'aliment enrichi par les populations cibles. Un des avantages de cette évaluation, réalisée le plus souvent sur des périodes assez longues, généralement plus d'une année, est qu'elle peut aussi permettre, si les bons indicateurs sont choisis, de mettre en évidence d'éventuels effets négatifs des interventions. Cette évaluation n'est pas pour différentes raisons toujours réalisée alors qu'elle constitue un argument essentiel pour convaincre les décideurs politiques et les bailleurs de fond à investir dans des actions de nutrition publique.

### **Conclusion**

Malgré l'état actuel des connaissances, les carences en micronutriments, en particulier la carence en fer, représentent toujours un problème de santé publique pour les populations aux ressources limitées notamment des pays en développement. Cet état de dénutrition nuit au développement de l'individu et de la société dans laquelle il vit. Lutter contre ces carences s'inscrit dans la lutte contre la pauvreté et pour le développement.

Dans l'attente d'un accès pour tous à une alimentation saine, équilibrée et assurant la couverture des besoins nutritionnels, prévenir et contrôler les carences en micronutriments pour tous les groupes d'une population dont les besoins sont différents implique d'intégrer différentes interventions contribuant à augmenter les apports et diminuer les pertes en micronutriments. Ces interventions incluent la supplémentation et l'enrichissement d'aliments en micronutriments, l'amélioration des pratiques alimentaires et la diversification des régimes, les mesures de santé publique. L'efficacité et l'impact des interventions doivent être évalués et un système de suivi du programme mis en place afin d'assurer la pérennité du programme et d'envisager les ajustements nécessaires au cours de son développement.

Le succès de ces interventions passe par la participation active des individus. L'information et l'éducation des populations, notamment à travers les campagnes de mobilisation sociale, sont essentielles car les carences en micronutriments induisent peu de symptômes visibles, facilement reconnaissables par les individus qui de fait appréhendent mal la réalité du problème et ses conséquences. La mise en place de plans nationaux pour la nutrition incluant comme une des priorités la lutte contre ces carences et la volonté de participation concertée des secteurs publics de la santé et de l'éducation, des industries agroalimentaires, de la communauté et des médias devraient contribuer aux succès des interventions et au contrôle des carences en micronutriments.

### **Références**

- 1) Conférence Internationale sur la Nutrition (CIN). Les grands enjeux des stratégies nutritionnelles. Rome: FAO/OMS, 1992.
- 2) ACC/SCN. Fourth report on the world nutrition situation. Nutrition throughout the life cycle. Geneva: ACC/SCN in collaboration with IFPRI; 2000.
- 3) West KP. Extent of vitamin A deficiency among preschool children and women of reproductive age. *J Nutr* 2002;132(9):2857S-66S.
- 4) Gardner GW, Edgerton VR, Senewiratne B, Barnard RJ, Ohira Y. Physical work capacity and metabolic stress in subjects with iron deficiency anemia. *Am J Clin Nutr* 1977;30:910-7.
- 5) Basta S, Soekirman M, Karryadi K, Scrimshaw N. Iron deficiency anemia and the productivity of adult males in Indonesia. *Am J Clin Nutr* 1979;3:916-25.
- 6) Viteri F. Prevention of iron deficiency. In: Institute of Medicine NAPE, editor. Prevention of micronutrient deficiencies. In "Board of international health, food and nutrition". Tools for policy makers and public health workers. Washington; 1997: 45-103.
- 7) Allen LH. Pregnancy and iron deficiency: Unresolved issues. *Nut Rev* 1997;55(4):91-101.
- 8) Lozoff B, Brittenham GM, Viteri F, Wolf AW, Urrutia JJ. Developmental deficits in iron-deficient infants: effects of age and severity of iron lack. *J.Pediatr.* 1982;101(6):948-51.

- 9) Fairweather-Tait SJ. Iron deficiency in infancy: easy to prevent - or is it ? *Eur J Clin Nutr* 1992;46(Suppl 4):S9-S14.
- 10) Chwang L, Soemantri AG, Pollitt E. Iron supplementation and physical growth of rural Indonesian children. *Am J Clin Nutr* 1988;47:496-501.
- 11) Berger J, Dyck JL, Galan P, Aplogan A, Schneider D, Traissac P, Hercberg S. Effect of daily iron supplementation on iron status, cell-mediated immunity, and incidence of infections in 6-36 month old Togolese children. *Eur J Clin Nutr* 2000;54:29-35.
- 12) Ross A. The relationship between immunocompetence and vitamin A status. In: Sommer A, West KP, eds. *Vitamin A deficiency: health, survival and vision*. New York: Oxford University Press, 1996:251-73.
- 13) Bloem MW, Wedel M, Van Agtmaal EJ, Speek AJ, Saowakontha S, Schreurs WHP. Vitamin A intervention: short-term effects of a single, oral, massive dose on iron metabolism. *Am J Clin Nutr* 1990;51:76-9.
- 14) de Benoist B, Delange B. La carence iodé: bilan et perspective pour le futur. *Cahiers Santé* 2002;12(1):9-17.
- 15) Brown KH, Peerson JM, Rivera J, Allen LH. Effect of supplemental zinc on the growth and serum zinc concentrations of prepubertal children: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2002;75(6):1062-71.
- 16) Hunt JM. Reversing productivity losses from iron deficiency: The economic case. *J Nutr* 2002;132(4):794S-801.
- 17) de Pee SWC. Dietary carotenoids and their role in combating vitamin A deficiency: a review of the literature. *Eur J Clin Nutr* 1996;50 (supp):S38-53.
- 18) de Pee S, Bloem MW, Gorsten J, Sari M, Satoto, Yip R, Schrimpton R, Muhilal. Reappraisal of the role of vegetables in the vitamin A status of mothers in Central Java, Indonesia. *Am J Clin Nutr* 1998;68:1068-74.
- 19) Berger J, Dillon J. Stratégies de contrôle de la carence en fer dans les pays en développement. *Cahiers Santé* 2002;12(1):22-30.
- 20) Masawe AEJ. Nutritional anaemias. *Clin Haematol* 1981; 10 (3) : 815-842.
- 21) Fleming AF. Haematological manifestations of malaria and other parasitic diseases. *Clin Haematol* 1981; 10: 982.
- 22) Hertrampf E. Iron Fortification in the Americas. *Nutrition Reviews* 2002;60(7 (1)):22-25.
- 23) García-Casal MN, Layrisse M. Iron Fortification of Flours in Venezuela. *Nutr Rev* 2002;60(7(1)):26-29.
- 24) Mannar V, Gallego EB. Iron Fortification: Country Level Experiences and Lessons Learned. *J Nutr* 2002;132(4):856S-58S.
- 25) Thuy P, Berger J, Davidsson L, Khan N, Lam N, Cook J, Hurrell RF, Khoi HH. Regular consumption of NaFeEDTA fortified fish sauce improved iron status and reduced anemia prevalence in anemic Vietnamese women. *Am J Clin Nutr*, 2003;78:284-290.
- 26) Berger J, Trèche S, Salvignol B, Khan N, Goudeau C. Fortified complementary food - The Vietnam experience. In: Association AS, editor. *Optimizing early child nutrition. Integrating strategies for fortified complementary feeding. Proceedings from the national seminar and workshop; Jakarta, Indonesia, 26-27, September; 2001: 37-43.*
- 27) Berger J, Aguayo V, San Miguel JL, Tellez W, Lujan C. Estrategias de control de la anemia ferropénica en niños bolivianos residentes a gran altitud. In: Berger J SMJ, Arce RM, Fernandez E, Aguayo, editor. *Anemias por deficiencia de hierro en la región andina: Definición y estrategias de intervención: ORSTOM; 1996: 227-48.*
- 28) Lailou A, Monvois C, Berger J. Bisavit-A: an innovative solution to combat micronutrient deficiency in Vietnam. *Sight and life Newsletter* 2003:3-7.
- 29) WHO/UNICEF/UNU. *IDA: Prevention, assessment and control. Report of a joint WHO/UNICEF/UNU consultation, Geneva, World Health Organization. Geneva. 1998.*
- 30) Stoltzfus RJ, Dreyfuss ML. Guidelines for the use of iron supplements to prevent and treat iron deficiency anemia. *INACG/WHO/UNICEF. ILSI Press. 1998 : 1-39.*

- 31) Viteri FE. Iron supplementation for the control of iron deficiency in populations at risk. *Nutr Rev* 1997; 55 (6): 195-209.
- 32) Liu XN, Kang J, Zhao L, Viteri F. Intermittent iron supplementation in Chinese preschool is efficient and safe. *Food Nutr Bull* 1995 ; 16 (2) : 139-145.
- 33) Schultink W, Gross R, Gliwitzki M, Karjadi D, Matulesi P. Effect of daily vs twice week iron supplementation in Indonesian Preschool children with low iron status. *Am J Clin Nutr* 1995; 61: 111-115.
- 34) Berger J, Aguayo VM, Tellez W, Lujan C, Traissac P, San Miguel JL. Weekly iron supplementation is as effective as 5 day per week iron supplementation in Bolivian school children living at high altitude. *Eur J Clin Nutr* 1997 ; 51 : 381-6.
- 35) Angeles-Agdeppa I, Schultink W, Sastroamidjojo S, Gross R, Karyadi D. Weekly micronutrient supplementation to build iron stores in female Indonesian adolescents. *Am J Clin Nutr* 1997; 66: 177-83.
- 36) Tee ES, Kandiah M, Awini N, Chong SM, Satgunasingam N, Kamarudin L, Milani S, Dugdale AE, Viteri FE. School-administered weekly iron-folate supplements improve hemoglobin and ferritin concentrations in Malaysian adolescent girls. *Am J Clin Nutr* 1999; 69: 1249-1256.
- 37) Ridwan E, Schultink, Dillon D, Gross R. Effects of weekly iron supplementation on pregnant Indonesian women are similar to those of daily supplementation. *Am J Clin Nutr* 1996 ; 63 : 884-90.
- 38) Chew F, Torun B, Viteri FE. Comparison of weekly and daily iron supplementation to pregnant women in Guatemala (supervised and unsupervised). *FASEB J*. 1996; 10: A4221.
- 39) Beaton GH, McCabe GP. Efficacy of intermittent iron supplementation in the control of iron deficiency anaemia in developing countries : an analysis of experience. Final report to the Micronutrient Initiative,. Support : Micronutrient Initiative and the Canadian International Development Agency (CIDA). GHB Consulting, Toronto, Canada, 1999 : 1-124.
- 40) Ninh NX, Berger J, Quyen DT, Khan NC, Traissac P, Khoi HH. Efficacité de la supplémentation en fer quotidienne et hebdomadaire pour le contrôle de l'anémie chez le nourrisson en milieu rural au Viêt Nam. *Cahiers Santé*. In press.
- 41) Viteri FE. A new concept of iron deficiency: community-based preventive supplementation of at-risk groups by the weekly intake of iron supplements. *Biomed Environment Sciences* 1998; 11: 46-60.
- 42) FAO/WHO. Codex Alimentarius, Volume 4, 2nd edition. 1994.
- 43) Hurrell R. Preventing iron deficiency through food fortification. *Nutr Rev* 1997;55(6):210-22.
- 44) Ramakrishnan U, Yip R. Experiences and Challenges in Industrialized Countries: Control of Iron Deficiency in Industrialized Countries. *J Nutr* 2002;132(4):820S-24S.
- 45) World Bank. Enriching lives: overcoming vitamin and mineral malnutrition in developing countries: development in practice. Washington DC: World Bank, 1994.
- 46) Lofti M, Venkatesh Mannar M, Merx R, Naber-van den Heuvel P. Micronutrient fortification of foods. Current practices, research and opportunities: The Micronutrient Initiative (MI), c/o International Development Research Center (IDRC)/International Agriculture Centre (IAC); 1996.
- 47) WHO/UNICEF/ICCIDD. Recommended iodine levels in salt and guidelines for monitoring their adequacy and effectiveness, 1996.
- 48) Wirakartakusumah M, Hariyadi P. Technical aspects of food fortification. *Food Nutr Bull* 1998;132:101-108.
- 49) Hurrell RF, Furniss DE, Burri J, Whittaker P, Lynch SR, Cook JD. Iron fortification of infant cereals: a proposal for the use of ferrous fumarate or ferrous succinate. *Am J Clin Nutr* 1989;49:1274-82.
- 50) Fidler MC, Davidsson L, Zeder C, Hurrell RF. Erythorbic acid is a potent enhancer of nonheme-iron absorption. *Am J Clin Nutr*. 2004;99(1):99-102.
- 51) Turner L. Monterrey workshop summary: evaluating the usefulness of elemental iron powders. *Nutr Rev* 2002;60(7):S16-S17.

- 52) McPhail P, Bothwell TH. The prevalence and causes of nutritional iron deficiency anemia. In: Fomon S, Zlotkin S, eds. *Nutritional Anemias*. Nestlé Nutrition Workshop Series: Nestec Ltd., Vevey/Raven Press, Ltd., New York; 1992:1-12.
- 53) Hallberg L, Brune M, L R. Effect of ascorbic acid on iron absorption from different types of meals. Studies with ascorbic acid given in different amounts with different meals. *Ann Nutr Appl Nutr* 1986; 40A:97-113.
- 54) Siegenberg D, Baynes RD, Bothwell TH, MacFarlane BJ, Lamparelli RD, Car NG, McPhail P; Schmidt V, Tal A, Mayet F. Ascorbic acid prevents the dose-dependent inhibitory effects of polyphenols and phytates on nonheme-iron absorption. *Am J Clin Nutr* 1991;53:537-41.
- 55) Hurrell RF. Fortification: Overcoming Technical and Practical Barriers. *J Nutr* 2002;132(4):806S-12.
- 56) Davidsson L, Kastenmayer P, Hurrell RF. Sodium iron EDTA [NaFe(III)EDTA] as a food fortificant: the effect on the absorption and retention of zinc and calcium in women. *Am J Clin Nutr* 1994;60:231-37.
- 57) INACG. Iron EDTA for food fortification: The Nutrition Foundation/ILSI; 1993.
- 58) Garby L, Areekul S. Iron supplementation in Thai fish-sauce. *Ann Trop Med Parasitol* 1974;68:467-76.
- 59) Ballot D, McPhail A, Bothwell T, Gilloomy M, Mayer FG. Fortification of curry powder with NaFe(II)EDTA in an iron-deficient population: report of a controlled iron-fortification trial. *Am J Clin Nutr* 1989;49:162-69.
- 60) Viteri F, Alvarez E, Bulux J, Pineda O, Gonzales H, Mejia LA, et al. Iron fortification in developing countries. *Nutrition in Health and Disease* 1994:345-354.
- 61) Zagre NM, Delpuch F, Traissac P, Delisle H. Red palm oil as a source of vitamin A for mothers and children: impact of a pilot project in Burkina Faso. *Public Health Nutr* 2003;6(8):733-42.
- 62) Allen LH, Ahluwalia N. Improving iron status through diet. The application of knowledge concerning dietary iron bioavailability in human populations. USAID-OMNI. 1997 : 1-83.
- 63) Stoltzfus RJ, Dreyfuss ML, Hababuu MC, Albonico M. Hookworm control as a strategy to prevent iron deficiency. *Nutr Rev* 1997; 55 (6): 223-232.
- 64) Dallman PR, Siimes M, Stekel A. Iron deficiency in infancy and childhood. *Am J Clin Nutr* 1980; 33: 86-118.
- 65) Liu XN, Kang J, Zhao L, Viteri FE. Intermittent iron supplementation in Chinese preschool children is efficient and safe. *Food Nutr Bull* 1995;16(2):139-46.
- 66) Beaton G, McCabe G. Efficacy of intermittent iron supplementation in the control of iron deficiency anemia in developing countries : an analysis of experience. Toronto, Canada: Micronutrient Initiative and the Canadian International Development Agency (CIDA). GHB Consulting; 1999.
- 67) Berger J, Phu PV, Salvignol B, Hoan NV, Khan NC, Tuong PD, Trèche S. Regular consumption of complementary foods fortified with micronutrients improves iron status of Vietnamese infants. 2004 INACG symposium, Lima, Peru.

# EVALUATION DE L'EFFICACITE DE LA SUPPLEMENTATION EN SPIRULINE DU REGIME HABITUEL DES ENFANTS ATTEINTS DE MALNUTRITION SEVERE

DR HERBERT DEGBEY, DR BOUREIMA HAMADOU, DR HABOU OUMAROU

*Consultant OMS, Niger*

---

## Objectifs de l'étude

### Objectif général :

Tester l'efficacité de la récupération nutritionnelle chez les enfants malnutris graves par adjonction de la spiruline au régime à base de bouillie de mil ou autre céréale.

### Objectifs spécifiques :

- Evaluer la rapidité de l'amendement des signes cliniques lors de la prise de spiruline.
- Evaluer la rapidité et l'importance de la normalisation des signes biologiques lors de la prise de spiruline chez les enfants malnutris.
- Evaluer la rapidité et l'importance de la récupération nutritionnelle lors de la prise de spiruline

## **.La malnutrition au Niger**

La malnutrition constitue le principal facteur aggravant de toutes ces maladies avec plus de 39,8% des enfants de moins de 5 ans qui souffrent d'une insuffisance pondérale, dont 19,5% sous une forme sévère.

Cette malnutrition est multifactorielle. Ses causes directes sont la carence alimentaire due à une pluviométrie capricieuse la pauvreté des sols et les aladies des enfants.

Les principaux indicateurs du pays sont :

- Population totale : 11.100 .000 habitants
- Mortalité 0-5 Ans 274‰
- Taux d'accroissement annuel : 3.2 %
- Indice synthétique de fécondité : 8,0
- Espérance de vie à la naissance : 45,6 ans ;
- Taux de mortalité maternelle : 700/100 000 naissances vivantes
- Seuil de pauvreté : 61,4%

## **Méthodologie**

### Type d'étude

Il s'agit d'une étude prospective, portant sur les enfants présentant une malnutrition protéino-énergétique sévère.

### Echantillonnage

L'étude a porté sur 56 enfants sévèrement malnutris admis dans le service de pédiatrie A de l'hôpital national de Niamey.

Les enfants ont été sélectionnés selon les critères de l'indice poids pour taille. Sont considérés comme malnutris sévères les enfants dont le rapport P/T, exprimé en score d'écart type( ET ), est inférieur ou égal à -3ET.

Sont inclus dans l'étude tous les enfants: âgés de 6 à 24 mois révolus présentant une malnutrition protéino-énergétique sévère.

Son exclus de l'étude :

- les enfants sévèrement malnutris âgés de moins de 6 mois ou de plus de 24 mois;
- les enfants sévèrement malnutris nécessitant une transfusion ou une réanimation intensive, ou incapable de s'alimenter.

- les enfants présentant des œdèmes autres que carentiels( d' origine cardiaque, rénale, endocrinienne ou iatrogène).

### Déroulement de l'étude

- Pour chaque enfant retenu une fiche individuelle de renseignements a été remplie.
- Chaque enfant recevait 10g de spiruline en poudre reparti en 2 prises journalières mélangées à la bouillie de mil pendant 2 semaines.
- Le suivi clinique des enfants a été standardisé à l'aide d'une fiche d'observation avec une réévaluation quotidienne.

### Difficultés

- L'étude comparative avec un autre aliment n'a pas été possible.
- Difficultés dans la réalisation des examens de laboratoire

### Observations

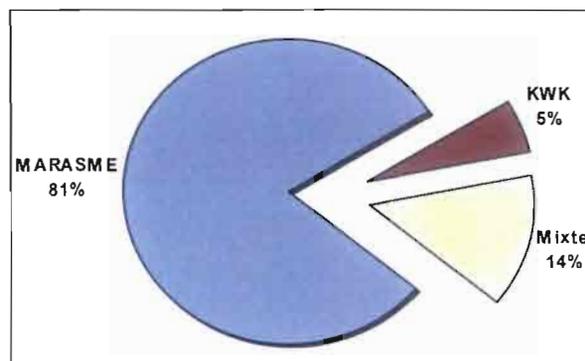


Fig 1 : Répartition des enfants selon le type de malnutrition

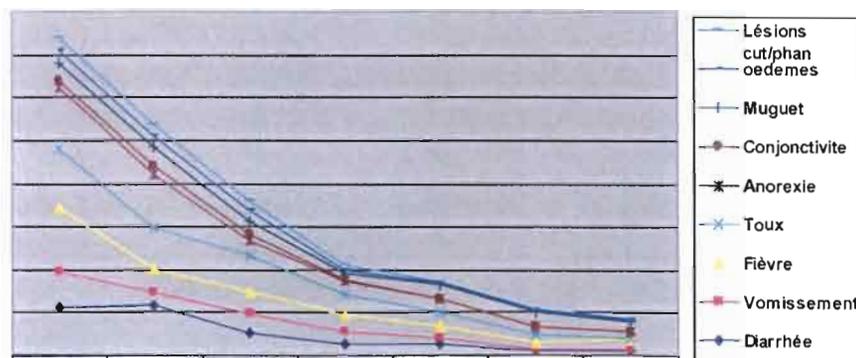


Fig. 2 : Evolution des signes cliniques sous spiruline

Dans cette figure on remarque une décroissance rapide de toutes les courbes dès le 4e – 8e jour de la prise en charge normale des enfants avec supplémentation en spiruline

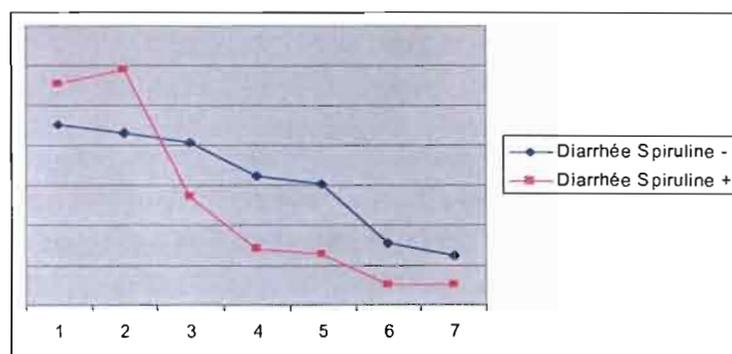


Fig 3 : Evolution de la diarrhée avec et sans spiruline

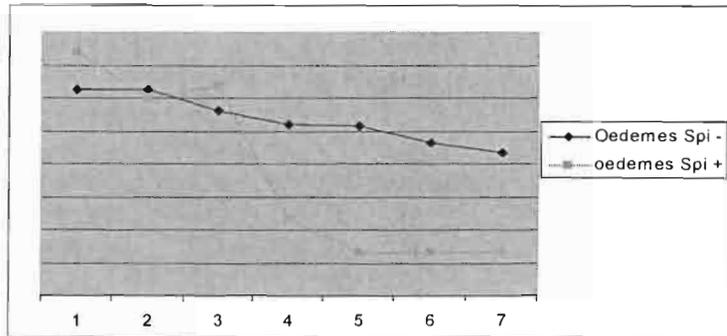


Fig 4 : Evolution des œdèmes avec et sans spiruline

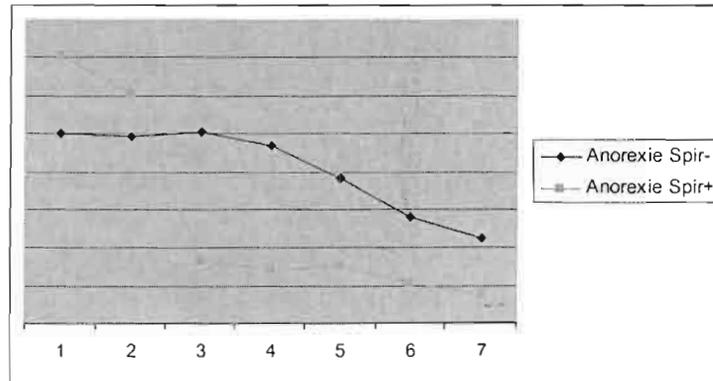


Fig. 5 : Evolution de l'anorexie avec et sans spiruline

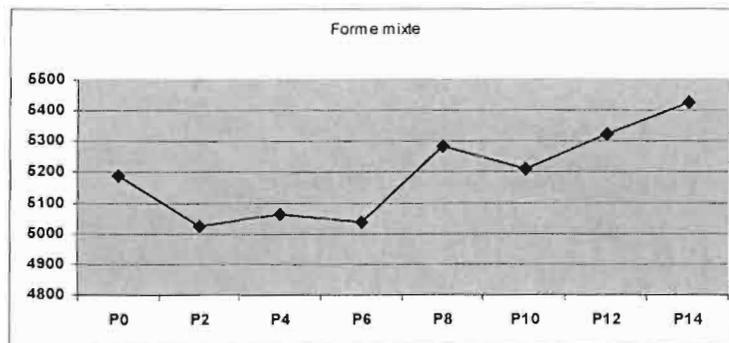


Fig. 6 : Evolution pondérale moyenne des enfants atteints de forme mixte de malnutrition

La courbe pondérale des enfants ayant une forme mixte de malnutrition montre une légère chute du poids initiale suivie d'une ascension lente de la courbe. Progression 4,54%

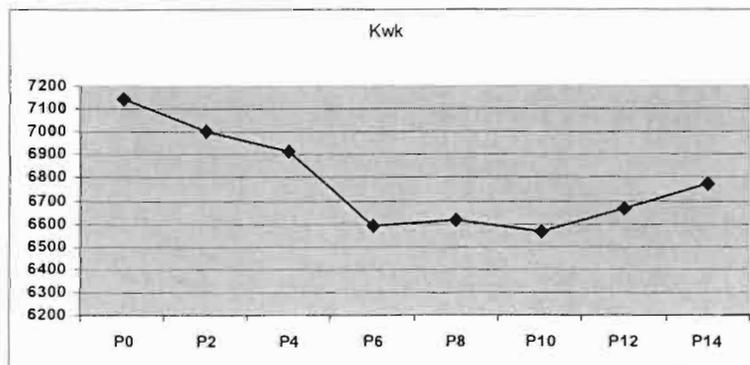


Fig. 7 : Evolution pondérale moyenne des enfants atteints de kwashiorkor

La courbe des enfants atteints de kwashiorkor montre une chute progressive du poids pendant la première semaine suivie d'une courte stabilisation puis d'une remontée du poids. (-5,1%)

Tab 1 : Evolution moyenne des paramètres mesurés pendant l'étude

Evolution moyenne de la protidémie entre J0 et J14		
Protidémie	J0	J14
Moyenne (g/l)	55,438	73,209
Progression (%)	32,05	
Evolution moyenne de l'albuminémie entre J0 et J14		
Albuminémie	J0	J14
Moyenne (g/l)	26,85	35,08
Progression (%)	30,65	
Evolution moyenne de l'albuminémie chez les enfants avec diarrhée		
Albuminémie	J0	J14
Moyenne avec diarrhée (g/l)	25,65	26,61
Progression (%)	3,74	
Moyenne sans diarrhée (g/l)	27,54	35,19
Progression (%)	27,77	
Evolution moyenne de la préalbuminémie		
Préalbuminémie	J0	J14
Moyenne (g/l)	0,16	0,25
Progression (%)	56,25	
Evolution moyenne de la préalbuminémie en fonction du type de malnutrition		
Type de malnutrition Préalbuminémie	Marasme	Kwk et forme mixte
J0	0,16	0,15
J14	0,25	0,27
Progression (%)	56,25	80
Evolution moyenne de la préalbuminémie en fonction de la diarrhée		
Préalbuminémie	J0	J14
Moyenne avec diarrhée (g/l)	0,16	0,15
Progression (%)	-6,66	
Moyenne sans diarrhée (g/l)	0,15	0,26
Progression (%)	73,33	
Evolution moyenne de l'hémoglobine entre J0 et J14		
Hémoglobine	J0	J14
Moyenne (g/dl)	8,567	8,954
Progression (%)	4,51	

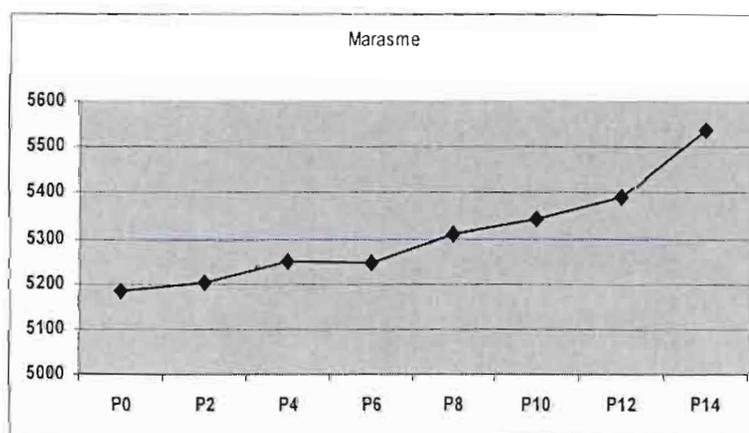


Fig. 8 : Evolution pondérale moyenne des enfants atteints de marasme.

Les enfants atteints de marasme on une courbe ascensionnelle très régulière: progression 6,8%

#### Acceptabilité de la spiruline

- Sur les 56 mères d'enfant 55 ont accepté de donner le produit et le juge efficace.
- Une hésitation à cause de l'odeur.
- Les enfants ont accepté le produit sans aucune contrainte.

- Au total très bonne acceptabilité mère enfant de la spiruline.

#### Devenir des malades

	Effectif	Pourcentage(%)
Améliorés	44	78,572
EVD/Sortis sur insistance parents	6	10,714
Décédés	6	10,714
Total	56	100

La mortalité observée, 10,7% est de loin inférieure à celle observée dans le service pour le même type de malades, soit 30%.

#### Conclusions

- Malgré les importants moyens déployés par les autorités du Niger le problème de la malnutrition continue à se poser avec acuité dans le pays.
- Les nombreux programmes de récupération nutritionnelle ont montré leur limite.
- La spiruline de par ses qualités nutritives remarquables, sa facilité d'emploi et sa grande acceptabilité peut constituer une solution dans le renforcement de certains programmes de nutrition.
- La réduction du coût de production est possible cela d'autant plus qu'il existe au Niger une zone très favorable à la culture de cette micro algue.

# LA SPIRULINE, UNE REPONSE A LA MALNUTRITION EN INDE

DENIS VON DER WEID

*ANTENNA Technologie, [www.antenna-france.org](http://www.antenna-france.org)*

---

## **Résumé**

La malnutrition est un état pathologique dû à l'usage prolongé d'une nourriture ne fournissant pas l'ensemble des éléments nécessaires à la santé.

Dans les pays à très faible revenu, la malnutrition est surtout due à la faible disponibilité d'aliments de qualité. Ainsi, même sans famine, c'est la basse qualité des aliments disponibles qui provoquent une "malnutrition chronique", entraînant de nombreuses maladies et pouvant fragiliser à vie, voir détruire l'organisme humain.

Selon l'OMS et l'UNICEF, un enfant sur trois en Afrique et un enfant sur cinq en Asie souffrent de malnutrition. Ils ne sont, la plupart du temps, pas victimes de famines, mais plutôt d'un manque de vitamines et autres micro-nutriments. Non traitées chez l'enfant, ces carences conduisent à des conséquences irréversibles telles que retard mental, cécité, infections fatales et problèmes liés à la croissance. Les trois déficiences en micro-nutriments les plus fréquentes sont des carences en vitamine A, en fer et en iode.

Les victimes de la malnutrition sont principalement les enfants (0 - 5 ans) et les femmes.

Alors que l'OMS donne pour consommation nécessaire 2400 KCal/jour, 30 % de la population indienne consomme une moyenne de 1600 KCal/jour.

53% des enfants de l'Inde souffrent de malnutrition chronique (en Afrique, cette proportion est estimée à 32%).

74% des enfants de moins de 3 ans sont atteints d'anémie. Dans certains états, ce pourcentage est de 84%.

## **Abstract**

Malnutrition is a clinical condition arising from prolonged reliance on food that lacks the elements essential to good health.

In poor countries, malnutrition is due to lack of food quality rather than quantity. Even if there is no actual famine, the poor quality of available foodstuffs results in chronic malnutrition, which leads to a large number of diseases and weakens or even destroys the body.

According to the World Health Organisation (WHO) and UNICEF, one in three children in Africa and one in five in Asia suffer from malnutrition. In most cases, they are not victims of famine but of a lack of vitamins and other micro-nutrients. Left untreated in children, these deficiencies can have irreversible consequences such as mental retardation, blindness, fatal infections and growth problems. The most common micro-nutrient deficiencies are of vitamin A, iron and iodine.

The main victims are children (0 to 5) and women.

WHO recommends 2400 Kcal per day. About 30% of the Indian population has a daily intake of only 1600 Kcal.

53% of children are suffering from chronic malnutrition and 74% of children under 3 are anaemic. In some states this percentage is 84%.

74% of children less than 3 years old are suffering from anemey. In some states, this proportion is 84%.

## **La malnutrition**

La malnutrition est un état pathologique dû à l'usage prolongé d'une nourriture ne fournissant pas l'ensemble des éléments nécessaires à la santé.

Dans les pays à très faible revenu, la malnutrition est surtout due à la faible disponibilité d'aliments de *qualité*. Ainsi, même sans famine, c'est la basse qualité des aliments disponibles qui provoquent une "malnutrition chronique", entraînant de nombreuses maladies et pouvant fragiliser à vie, voir détruire l'organisme humain.

Selon l'OMS et l'UNICEF, un enfant sur trois en Afrique et un enfant sur cinq en Asie souffrent de malnutrition. Ils ne sont, la plupart du temps, pas victimes de famines, mais plutôt d'un manque de vitamines et autres micro-nutriments. Non traitées chez l'enfant, ces carences conduisent à des

conséquences irréversibles telles que retard mental, cécité, infections fatales et problèmes liés à la croissance. Les trois déficiences en micro-nutriments les plus fréquentes sont des carences en vitamine A, en fer et en iode.

Les victimes de la malnutrition sont principalement les enfants (0 - 5 ans) et les femmes.

Alors que l'OMS donne pour consommation nécessaire 2400 KCal/jour, 30 % de la population indienne consomme une moyenne de 1600 KCal/jour.

- 53% des enfants de l'Inde souffre de malnutrition chronique (en Afrique, cette proportion est estimée à 32%).
- 74% des enfants de moins de 3 ans sont atteints d'anémie. Dans certains états, ce pourcentage est de 84%

### **La spiruline dans la lutte contre la malnutrition - l'Ecopark de Madurai**

Ce projet a été initié par Antenna Technologie, en 1995.

La réduction de la malnutrition dans cette région de l'Inde où le taux de malnutrition infantile avoisine les 30%.

L'Ecopark est un site d'environ 2 hectares de terre, sur lesquels sont cultivés de la spiruline, des jardins familiaux, des plantes médicinales, des bassins de pisciculture. Une trentaine de personnes travaillent sur le site et plusieurs villages poursuivent une production de spiruline en collaboration avec l'Ecopark.

La spiruline est produite dans une vingtaine de bassins de 20 m<sup>2</sup> chacun sur le site. La récolte est de 100 kg par mois. Elle est distribuée aux enfants à raison d'un gramme par jour, ce qui est suffisant pour rétablir des enfants qui souffrent de carences en vitamine A et en fer. Cette carence en vitamine A est l'une des principales déficiences infantile en Inde. Elle est responsable de la xérophtalmie, maladie oculaire qui touche plus de 60 millions d'enfants et rend irrémédiablement aveugle plus de 500'000 d'entre eux chaque année.

La sécurité alimentaire passe par une appréhension globale du problème : Depuis cinq ans, l'Ecopark organise des formations en nutrition et santé pour les femmes. Des formateurs leur enseignent à cultiver un jardin nutritionnel, à composer des menus équilibrés et à ajouter la spiruline aux repas ou bouillies de sevrage. Les femmes sont également sensibilisées au VIH e peuvent parfois bénéficier d'un programme de microcrédits.

Un comité local composé de médecins pédiatres, biochimistes, association de diabétiques, comité-femmes se réunit pour décider de la gestion et de la distribution de la spiruline produite à Madurai. Un tiers de la spiruline produite est distribuée gratuitement et deux tiers sont revendus (Madurai, Bombay) pour assurer l'autonomie financière du projet.

#### Organisation de la distribution:

Plus de 1000 enfants bénéficient de la spiruline de Madurai. 1 gramme de spiruline sèche est distribuée dans une boule composée de maïs et de *jaggery*.

Une femme du village est désignée pour la distribution dans chaque ménage.

Une distribution supplémentaire est organisée pour les groupes les plus vulnérables: orphelins, réfugiés, petites filles...

Divers produits pour distribuer cette spiruline et adaptés aux produits locaux ont été testés: spiruline+ jus de citron, spiruline + riz soufflé, spiruline dans un biscuit.

Antenna a introduit ou participé à la mise en place de six programmes spiruline dans le cadre de la malnutrition en Inde:

Villes	Nom projet/personne	M <sup>2</sup>	Nb d'enfants
<i>Madurai</i>	Devamanoharan	380	1000
<i>Kanyakumari</i>	Centre médical	80	100
<i>Alampoondy</i>	Centre médical	100	300
<i>Auroville</i>	Hendrick	250	
<i>Hyderabad</i>	Marica school	60	300
<i>Karnataka</i>	Réfugiés tibétains	?	
<i>Rajasthan</i>	Université		
<i>Maharashtra</i>	Sadbav foundation		
<i>Bombay</i>	Bidonville		1200

Deux études cliniques<sup>2</sup> menées par le Madurai Medical College ont permis de convaincre les autorités médicales et locales du bien fondé de notre programme spiruline.

Une étude clinique est également en cours à Bombay dans un bidonville. Cette étude est menée sur 1200 enfants de 6 mois à 3 ans, par le Prof. Potdar.

Conclusion : des démarches sont nécessaires pour élaborer une stratégie de diffusion de la spiruline auprès des autorités médicales et politiques, locales et régionales.

---

<sup>2</sup> "Preschool nutrition supplementation & family income booster by spirulina" Dr. K. Venkatasubramanian, Pr. N: Edwin, Madurai Medical College, Madurai, India.

# **SANTE**

# **FONCTIONS CLINIQUES**



# ***SPIRULINA* RICH IN AIDS-ANTIVIRAL SULFOLIPIDS**

KIET PHAM QUOC<sup>1</sup> AND HUBERT DURAND-CHASTEL<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Corresponding author: Tel.: 33158340233; Email: [phamquockiet@aol.com](mailto:phamquockiet@aol.com)

<sup>2</sup> Sénateur, Palais du Luxembourg, 15 ruede Vaugirard, 75006 Paris

## **Abstract**

*Spirulina 8818* contains an important proportion of SQDG attaining 40% of total lipids. Molecular species composition of SQDG in this strain differs from that of SQDG in other strains such as *Spirulina platensis* PCC 8005, *Spirulina pacifica*, *Spirulina maxima* and *Spirulina subsalsa*. These strains of *Spirulina* only synthesize C18 or C16 / C16 "prokaryotic" SQDG, while *Spirulina 8818* synthesizes not only "prokaryotic" SQDG but also C18 / C18 "eukaryotic" SQDG. The typical molecular species of "prokaryotic" SQDG are C16:0 / C16:0, C16:1 / C16:0, C18:1 / C16:0, C18:2 / C16:0,  $\gamma$ C18:3 / C16:0 and  $\gamma$ C18:3 / C16:1 while those of "eukaryotic" SQDG consist of C18:1 / C18:1, C18:1 / C18:2, C18:2 / C18:1 and C18:2 / C18:2. The C18:1 / C18:1 and C18:1 / C16:0 SQDG molecular species are potent inhibitors of HIV-1 and HIV-2 reverse transcriptase and they are interesting compounds for further development as AIDS-antiviral agents.

Keywords: *Spirulina*, Sulfolipids (SQDG), Molecular species, HIV Reverse transcriptase, Polymerase, Ribonuclease

Abbreviations: AIDS, acquired immunodeficiency syndrome; Cx, fatty acid with x carbon atoms; C16:0, palmitic acid; C16:1, hexadecenoic acid; C18:0, stearic acid; C18:1, oleic acid; C18:2, linoleic acid;  $\gamma$ C18:3,  $\gamma$ -linolenic acid ( $\Delta$ 6,9,12 octadecatrienoic acid); Cm / Cn, lipid molecular species with a "m" and a "n" carbon fatty acid esterified, respectively, on carbons 1 and 2 of the glycerol backbone of the lipid molecule; DNA, desoxyribonucleic acid; DGDG, digalactosyldiacylglycerol; GLC, gas-liquid chromatography; HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; HPLC, high-performance liquid chromatography; MGDG, monogalactosyldiacylglycerol; PG, phosphatidylglycerol; RNase, ribonuclease; RT, reverse transcriptase; SQDG, sulfoquinovosyldiacylglycerol; TLC, thin-layer chromatography.

## **Introduction**

The cyanobacterium *Spirulina* is rich in nutrients, such as proteins,  $\beta$ -carotene, iron, and  $\gamma$  linolenic acid. It has gained more and more attention, not only for foods aspects but also on the development of potential pharmaceuticals (Dyerberg, 1986; Iwata, 1990; Horrobin, 1994; Pham Quoc & Pascaud, 1996). Recent studies showed that *Spirulina* has antioxidant activity in vitro and in vivo (Miranda et al., 1998) or immuno – promoting effects (Qureshi et al., 1996). The novel sulfated polysaccharides separated from *Spirulina platensis* inhibit the replication of several viruses such as *Herpes simplex* and HIV-1 (Hayashi et al., 1996; Ayehunie et al., 1998). Specially, the sulfolipids separated from cyanobacteria such as *Lyngbya lagerheimii* and *Phormidium tenue* had the AIDS-antiviral activities (Gustafson et al., 1989). Glycolipids are major lipid components of all chloroplast membranes and photosynthetic membranes of cyanobacteria. In all lipids of cyanobacteria, the polar head moiety allows to distinguish three different types of glycolipids and one phospholipids: mono- and digalactosyl diacylglycerol (MGDG and DGDG), sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) and phosphatidylglycerol (PG), respectively. The aim of study was to analyze the molecular species of SQDG from *Spirulina 8818* rich in sulfolipids in order to observe experimentally their ability to inhibit HIV-1 and HIV-2 reverse transcriptase.

## **Materials and methods**

### Materials

*S. pacifica* was obtained from Cyanotech, USA ; *S. maxima* and *S. subsalsa* were obtained from ENS Paris; *S. platensis 8005* was obtained from Institute Pasteur Paris and *Spirulina 8818* was selected from our laboratory. These strains of *Spirulina* were grown at 30 $\pm$ 1°C for 14 days-long periods in Zarrouk medium and illuminated with cool white fluorescent lamps providing 100  $\mu$ E/m<sup>2</sup> /s. the biomass of *Spirulina* was harvested and freeze-dried.

Authentic compounds of MGDG, DGDG, PG and lipase (type XI or A1) from *Rhizopus arrhizus* were purchased from Sigma Chemical Co, USA. SQDG was extracted from fresh spinach leaves.

### Extraction of total lipids and fatty acid analyses

Total lipids were extracted by method of Bligh & Dyer (1959) and separated by TLC on silica-gel plates (Lepage, 1967). The different lipid classes were transmethylated after addition of heptadecanoic acid C17:0 as internal standard (Metcalf et al., 1966). Fatty acid methyl esters were quantified by GLC on a capillary column coated with carbowax 20M (Demandre et al., 1986). Results are mean values of at least three independent samples, each analyzed in duplicate. The standard deviation was always less than 3%.

### Purification of SQDG

SQDG was purified on a silica-gel column with the elution system chloroform/ methanol / formic acid (100:18:3.5, v/v/v) and the fractions containing SQDG were combined. The combined mixture was applied to second column and washed with chloroform / methanol (95:5, v/v) and then chloroform / methanol (90:10, v/v). Purified SQDG were obtained by elution with chloroform / methanol (80:20, v/v).

### Analysis of SQDG molecular species

The SQDG molecular species were separated by HPLC in a WATERS apparatus with a UV-VIS variable wavelength detector (205 nm) on a reverse phase column (300 x 7.8 mm) packed with 5 µm ODS Ultrasphere with the elution system methanol / water (95 : 5, v/v) at 3.0 ml / min flow rate ( Xue et al, 2002 ).

### Positional analysis of fatty acids in SQDG molecular species

Each fraction separated by HPLC was hydrolyzed with purified lipase A1 from *Rhizopus arrhizus* (Fisher et al., 1973). The products of hydrolysis: 2-acyl-lyso-SQDG and free fatty acids liberated from carbon 1 of the glycerol were separated by TLC with hexane / diethyl ether / formic acid (50:50:1, v/v/v) or chloroform / methanol / acetic acid / water (65:35:4:4, v/v/v/v). Finally, these hydrolytic products were converted to their methyl esters and analyzed by GLC.

### Enzymatic assays

The purified reverse transcriptases of HIV-1 and HIV-2 were p66/p51 and p68/p55 heterodimers, respectively. The RT-associated DNA polymerase and RNase H activities were assayed as described in detail by Loya et al., 1992.

## **Results**

### Lipids and fatty acids of five strains of *Spirulina*

Small changes in lipid content were observed when five strains of *Spirulina* were cultivated under the same conditions of culture described previously. The total lipids reached from 6.5% to 7.2% of dry weight [Table 1]. The lipid composition of all strains of *Spirulina* confirmed the presence of four polar lipids: MGDG, DGDG, SQDG and PG. MGDG was predominant and reached about 41.3, 42.3, 46 and 46.7% of total lipids in *S. subsalsa*, *S. pacifica*, *S. maxima* and *S. platensis 8005* respectively, while the proportion of MGDG was only 34% of total lipids in *Spirulina 8818*. Particularly, the content of SQDG increased significantly and reached 40.5% of total lipids in this strain while this proportion of SQDG was about 20% in other strains [Table 1].

TABLE 1: Polar lipid composition of strains of *Spirulina*

Strains	Polar lipids (weight %)				Total lipids (% dry weight)
	MGDG	DGDG	SQDG	PG	
<i>S. platensis 8005</i>	46.7±0.4	11.5±0.5	22.2±0.5	19.5±0.5	7.1±0.3
<i>S. pacifica</i>	42.3±0.5	17.5±0.5	18.4±0.6	21.8±0.6	6.8±0.4
<i>S. maxima</i>	46.0±0.8	11.3±0.3	21.4±0.6	21.2±0.3	7.0±0.5
<i>S. subsalsa</i>	41.3±0.5	16.0±0.4	17.3±0.4	25.3±0.4	6.5±0.3
<i>S. 8818</i>	34.0±0.6	14.4±0.4	40.5±0.5	11.0±0.3	7.2±0.3

In all strains of *Spirulina*, the major fatty acids were C16:0 and  $\gamma$ C18:3 ; C18:2 and C18:1 were less abundant. In *S. platensis 8005*, *S. pacifica*, *S. maxima* and *S. subsalsa*, the fatty acid composition of these strains always exhibited more C16 than C18 fatty acids [Table 2].

TABLE 2 : Total fatty acid composition of strains of *Spirulina*

Strains	Total fatty acids (mol %)*						Ratios C16/C18
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	$\gamma$ C18:3	
<i>S. platensis 8005</i>	50.2	1.2	1.3	10.5	16.0	20.8	51.4 / 48.6
<i>S. pacifica</i>	49.8	4.0	1.5	7.2	17.2	20.3	53.8 / 46.2
<i>S. maxima</i>	51.0	3.0	1.4	8.3	15.6	20.7	54.0 / 46.0
<i>S. subsalsa</i>	51.5	2.8	2.1	9.8	14.9	18.9	54.3 / 45.7
<i>S. 8818</i>	34.7	1.3	1.0	20.1	18.0	24.9	36.0 / 64.0

\*Standard deviation was always less than 0.3 %

In contrast, the fatty acid composition of *Spirulina 8818* showed that total fatty acids as well as those of SQDG contained much more than 50 mol% of total C18 fatty acids [Table 3]. According to the previously reported data and to the concept of “prokaryotic” and “eukaryotic” lipids, this let us expect considerable changes in the molecular species of lipids and especially in the SQDG.

TABLE 3 : Fatty acid composition of sulfolipids (SQDG) of strains of *Spirulina*

Strains	Fatty acids (mol %)*						Ratios C16/C18
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	$\gamma$ C18:3	
<i>S. platensis 8005</i>	55.8	1.1	0.9	11.1	27.0	4.1	56.9 / 43.1
<i>S. pacifica</i>	52.8	5.2	1.0	10.0	27.3	3.7	58.0 / 42.0
<i>S. maxima</i>	53.4	4.2	1.2	11.0	26.3	3.9	57.6 / 42.4
<i>S. subsalsa</i>	54.5	3.8	0.7	11.9	25.9	3.2	58.3 / 41.7
<i>S. 8818</i>	43.2	1.5	0.5	20.6	29.2	5.0	44.7 / 55.3

\*Standard deviation was always less than 0.3 %

#### Molecular species of SQDG from *S. platensis 8005* as control and *Spirulina 8818*

Molecular species of SQDG were separated by HPLC. They were collected and further identified through their fatty acid components on carbon 1 and 2 of glycerol. The positional analysis of fatty acids confirmed that in three C18/C16 molecular species, C18:1/C16:0, C18:2/C16:0 and  $\gamma$ C18:3/C16:0, the fatty acid C16:0 was 97%, 95% and 98% esterified on the carbon 2 of the glycerol, respectively. On the other hand, in three C18/C18 molecular species, C18:1/C18:1, C18:1/C18:2 and C18:2/C18:1, the fatty acid C18:1 was found esterified on carbon 1 and 2 of the glycerol backbone (data not shown).

TABLE 4: SQDG molecular species composition of two strains of *Spirulina*

Molecular species		SQDG molecular species (mol %)			
C18/C16 (prokaryotic)	C18/C18 (eukaryotic)	<i>S. platensis 8005</i>		<i>S. 8818</i>	
$\gamma$ C18:3/C16:1		1.0		1.0	
	$\gamma$ C18:3/C18:2		nd		nd
	C18:2/C18:2		nd		t
$\gamma$ C18:3/C16:0		0.8		1.5	
	C18:2/C18:1		nd		5.6
	C18:1/C18:2		nd		3.4
	C18:1/C18:1		nd		0.5
C18:2/C16:0		76.9		76.4	
C18:1/C16:0		5.5		10.1	
C16:0/C16:0		15.8		2.0	
C16:1/C16:0		t		t	
Molecular species ratio* C16or C18/C16 C18/C18		100	0	90.5	9.5

\*Ratio of prokaryotic SQDG to eukaryotic SQDG; nd, not detected; t, trace

In SQDG from *Spirulina platensis 8005*, the typical molecular species were: C16:0/C16:0, C16:1/C16:0 as trace, C18:1/C16:0, C18:2/C16:0,  $\gamma$ C18:3/C16:0 and  $\gamma$ C18:3/C16:1. The “prokaryotic” C18/C16 or C16/C16 molecular species of SQDG were detected in *S. platensis 8005*, while the “eukaryotic” C18/C18 SQDG molecular species were not found. In SQDG from *Spirulina 8818*, we found the same “prokaryotic” C18/C16 or C16/C16 SQDG molecular species already present in *S. platensis 8005* but the “eukaryotic” C18/C18 SQDG molecular species were also present

in reaching about 9.5 mol% of total SQDG molecular species. The most abundant fatty acid combinations among these “eukaryotic” molecular species were C18:1/C18:2, C18:2/C18:1, while C18:1/C18:1 and C18:2/C18:2 as traces [Table 4].

#### Inhibition of DNA polymerase and RNase H activities of HIV-1 reverse transcriptase by SQDG

Extracts of total SQDG from three different strains of *Spirulina* inhibited the DNA polymerase activity of HIV-1 reverse transcriptase at least 90% at different concentrations of total SQDG from 242 to 370 µg/ml [Table 5].

TABLE 5 : Effect of total sulfolipids of strains of *Spirulina* on DNA polymerase of HIV-1 reverse transcriptase

<u>Strains</u>	<u>Concentrations of total sulfolipids (µg/ml)</u>	<u>Residual enzymatic activity (%)</u>
<i>S. platensis</i> 8005	353 ± 5	10 ± 2
<i>S. maxima</i>	370 ± 4	10 ± 2
<i>S. 8818</i>	242 ± 5	10 ± 2

#### Inhibition of DNA polymerase activity of HIV-2 reverse transcriptase by SQDG

The separation of the active molecular species of SQDG from these extracts of total SQDG was realized by HPLC. The results of enzymatic assays [Table 6] indicated that C18:1/C18:1 and C18:1/C16:0 SQDG inhibited strongly the DNA polymerase activity with a little effect on the RNase H function.

TABLE 6: Inhibition of DNA polymerase and RNase H activities of HIV-1 reverse transcriptase by sulfolipids of *Spirulina 8818*

<u>Molecular species</u>	<u>DNA polymerase (a)</u>		<u>RNase H (b)</u>
	IC50 (µg/ml)	IC90 (µg/ml)	( % of initial enzymatic activity )
Prokaryotic :			
C18:1 / C16:0	23.9±3.8	73.6±2.8	64 ± 6
C18:2 / C16:0	75.4±2.9	281.4±4.8	100
γC18:3 / C16:0	178.0±12.4	533.1±13.0	100
C16:0 / C16:0	106.1±12.0	451.8±12.5	47 ± 4
C16:1 / C16:0	87.4±3.3	302.0±3.2	42 ± 3
Eukaryotic :			
C18:2 / C18:2	279.0±24.6	840.1±22.7	100
C18:2 / C18:1	250.9±17.7	752.8±19.7	100
C18:1 / C18:2	209.4±18.7	628.3±24.6	100
C18:1 / C18:1	20.1±1.8	68.3±2.0	60 ± 2

(a)The IC50 and IC90 values (inhibition concentrations that lead to 50% and 90% inhibition, respectively, of the initial enzymatic activities) are expressed in µg/ml.

(b)The RNase H activity was assayed in the presence of inhibitors, at a concentration of 100 µM each.

The 90% inhibitory concentrations (IC90) for DNA polymerase are 68.3 and 73.6 µg/ml respectively, while the activity of RNase H was decreased from 100% to 60% and 64% of initial enzymatic activity. Besides, the C18:2/C16:0, C16:1/C16:0 and C16:0/C16:0 SQDG molecular species also inhibited the DNA polymerase activity with IC90 ≈ 281.4, 302 and 451.8 µg/ml respectively. In contrast, the inhibitory effects of C16:1/C16:0 and C16:0/C16:0 SQDG on the RNase H activity were stronger than those of C18:1/C16:0 and C18:1/C18:1 SQDG. The residual enzymatic activity of RNase H in presence of C16:1/C16:0 and C16:0/C16:0 SQDG was 42% and 47% of initial enzymatic activity respectively. The effect of other SQDG molecular species on the RNase H function was not found.

Our results proved that C18:1/C18:1, C18:1/C16:0, C18:2/C16:0 and C16:1/C16:0 SQDG inhibited the DNA polymerase activity of HIV-2 reverse transcriptase. The 50% inhibitory concentrations (IC50) for DNA polymerase were 26.1, 33.5, 105 and 108  $\mu\text{g/ml}$  respectively [Figure 1].

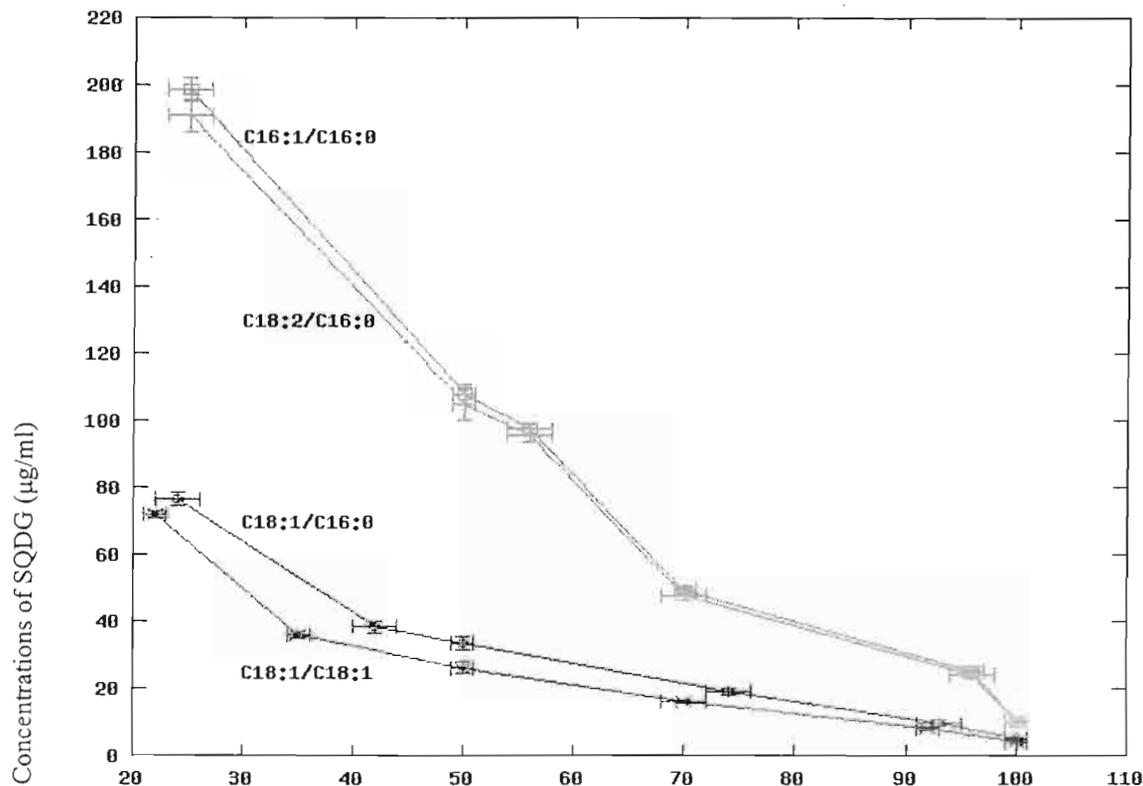


Figure 1: Effect of molecular species of SQDG of *Spirulina 8818* on DNA polymerase of HIV-2 reverse transcriptase (\* The residual enzymatic activity was calculated as percentage of the control with no inhibitor).

## Discussion

### Biosynthesis of eukaryotic SQDG molecular species by *Spirulina 8818*

Lipids of cyanobacteria, prokaryotic photosynthetic organisms, consist of three glycolipids and one phospholipids: MGDG, DGDG, SQDG and PG. They contain fatty acids with 16 or 18 carbons (C16 and C18), which are characterized by the typical distribution of the fatty acids on the glycerol backbone: C18 and C16 esterified on carbon 1 and 2, respectively, resulting in C18/C16 lipid molecular species (Sato & Murata, 1982; Murata et al., 1992). The presence of high levels of C16 (more than 50% of total fatty acids) in some cyanobacteria indicates that the C16/C16 combinations of fatty acids also occur in these organisms (Cohen & Vonshak, 1991; Wada & Murata, 1990). The presence of such C18/C16 lipids in chloroplast membranes has been interpreted in terms of cyanobacterial characteristics remaining in chloroplast through the endosymbiotic process. The analysis of molecular species of glycolipids as MGDG, DGDG and SQDG in *Spirulina* proves that the C18/C16 prokaryotic molecular species are present in all strains of *Spirulina* (data not shown). In particular, *Spirulina 8818* can synthesize not only C18/C16 SQDG but also C18/C18 SQDG, while C18/C18 or C16/C18 molecular species have been found only in eukaryotic plants: algae and land plants. The synthesis of eukaryotic lipid molecular species in *Spirulina platensis* was already reported by Pham Quoc et al.(1993,1994,1997). All these typical distribution of fatty acids have been attributed to the activities of acyltransferases which esterify selectively C16 or C18 fatty acids on carbon 1 or 2 of glycerol. These enzymes have been evidenced and purified in higher plants (Frentzen et al., 1983). *Spirulina 8818* contains the important proportions of C18:2 and C18:1 (29.2 and 20.6 mol% respectively) which can be compelled to act as a substrate for monoacylglycerol-3-phosphate acyltransferase, the key enzyme in the biosynthesis of either prokaryotic or eukaryotic glycolipids in general and SQDG in particular, and this results in the appearance of C18/C18 eukaryotic SQDG. Our observations indicate that the position specificity for C18 fatty acids in cyanobacterial lipids is not as absolute as it was previously considered. Besides, the typical distributions of fatty acids in C18/C16 and C18/C18 SQDG of *Spirulina* are due to the proportions of the individual fatty acids available for

the esterification process, but not to the inability of this organism to synthesize C18/C18 combinations. Finally, the finding of *Spirulina 8818* rich in sulfolipids is very important to produce industrially the biomass of this strain in the future.

#### Inhibition of DNA polymerase and RNase H activities of HIV reverse transcriptase by SQDG of *Spirulina 8818*

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is the cause of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) which has been a major human viral disease. The development of anti-HIV agents has been considered to be one of the most important approaches toward effective therapy for AIDS. The reverse transcriptase (RT), integrase (IN) and retroviral protease (RP) play key roles in the replication cycle of this virus. These enzymes encoded by the pol gene of HIV-1 have been regarded as the appropriate targets for the antiretroviral agents. RT is a multifunctional enzyme with two enzymatic activities: DNA polymerase and RNase H. Both functions are responsible for converting the viral genomic RNA into proviral double stranded DNA (Rey et al., 1984). This DNA is then transported from the cytoplasm into the nucleus, where it is subsequently integrated into cell DNA. The inhibition of each of the catalytic functions of RT interferes with the virus production in the host cell. Few anti-HIV compounds from cyanobacteria have been reported (Scheffler et al., 2000) and the AIDS-antiviral sulfolipids, commonly referred to as SQDG from *Lyngbya lagerheimii* and *Phormidium tenue*, were identified by Gustafson et al. (1989). Recently, the inhibitory effects of SQDG separated from a marine red alga *Gigartina tenella* and some cyanobacteria as *Oscillatoria raoi*, *O. trichoides*, *O. limnetica*, *Scytonema sp...* on HIV-1 RT have been reported by many authors (Ohta et al., 1998; Loya et al., 1998). Our present study indicates that *Spirulina 8818* contains an important quantity of anti-HIV-1 RT sulfolipids [Table 1]. Generally, the compounds that inhibit in vitro the catalytic activities of HIV-1 RT can be divided into three categories: (a) compounds that block both DNA polymerase and RNase H activities; (b) inhibitors of the DNA polymerase activity with little or no effect on the RNase H function; (c) compounds that selectively inhibit the RNase H activity without inhibiting the DNA polymerase activity. The assays with different SQDG molecular species separated from *Spirulina 8818* prove that these prokaryotic or eukaryotic SQDG molecular species are all inhibitors of only the DNA polymerase activity of HIV-1 RT. They belong to the second category (b) of the anti HIV-1 RT compounds. This inactive effect of SQDG on RNase H activity of RT is similar to that of the nonnucleoside RT inhibitors (NNRTIs) as Nevirapine, Efavirenz, Viramune, Sustiva ... Many authors proved that both sulfonic acid residue and fatty acid ester side chains of sulfolipids are required for maximal effective RT inhibition. The hydrolysis of fatty acid side chain of SQDG has completely abolished the inhibitory activity of sulfolipids. Likewise, the molecular species of SQDG without a sulfonic acid group constituent were completely inactive against the DNA polymerase activity (Loya et al., 1998). It is possible that the lipophilic groups of SQDG interact with the hydrophobic core of the enzyme, whereas the negatively charged sulfonic moiety may interact with the positively charged side chains on the enzyme. In this regard, the SQDG molecular species may be similar to the nonnucleoside RT inhibitors because these RT inhibitors interact with a hydrophobic amino acid pocket of HIV-1 RT that is close to the active site in the DNA polymerase domain (Jacobo-molina et al., 1993). Our results indicate that C18:1/C18:1 and C18:1/C16:0 are the most potent inhibitors of HIV-1 RT and also effective in inhibiting the HIV-2 RT. These SQDG molecular species block potently HIV-2 RT associated DNA polymerase with IC<sub>50</sub> as low as 26.1 and 33.5 µg/ml., while the NNRTIs inhibit only HIV-1 RT.

The total synthesis of cyanobacterial sulfolipids is described by many authors (Gordon & Danishefsky, 1992; Hanashima et al., 2000) but this synthetic route consisting of 12 stages is very complex and expensive. Whence, *Spirulina 8818*, an important source of natural sulfolipids, can be cultivated industrially in order to obtain the SQDG molecular species for further development of these compounds as anti-AIDS agents.

#### References

- Ayehunie, S., Belay, A., Baba, T. W. & Ruprecht, R.M. (1998) J. AIDS Human Retrovirology, 18, 7-12.  
Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959) Can. J. Biochem. 37, 911-917.  
Cohen, Z. & Vonshak, A. (1991) Phytochemistry 30, 1, 205-206.  
Demandre, C., Trémolières, A., Justin, A.M. & Mazliak, P. (1986) Biochim. Biophys. Acta 877, 380-386

- Dyerberg, J. (1986) *Nutr. Rev.*, 44, 125.
- Fisher, W., Heinz, E. & Zeus, M. (1973) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 354, 1115-1123.
- Frentzen, M., Heinz, E., Mc Keon, T.A. & Stumpf, P.A. (1983) *Eur. J. Biochem.* 129, 629-636.
- Gordon, D.M. & Danishefsky, S.J. (1992) *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 659-663.
- Gustafson, K.R., Cardellina, J.H., Fuller, R.W., Weislow, O.S., Kiser, R.F., Snader, K.M., Paterson, G.M.L. & Boyd, M.R. (1989) *J. Natl. Cancer Inst.*, Vol 81, 16, 1254-1258.
- Hanashima, S., Mizushina, Y., Ohta, K., Yamazaki, T., Sugawara, F. & Sakaguchi, K. (2000) *Jpn. J. Cancer Res.* 91, 1073-1083.
- Hayashi, T., Hayashi, K., Maeda, M. & Kojima, I. (1996) *J. Nat. Prod.* 59, 83-87.
- Horrobin, D.F. (1994) *Effects of fatty acids and lipids in health and disease.* Galli, C., Simopoulos, A.P., Tremoli, E. (eds), vol. 76, 77-80.
- Iwata, K. (1990) *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 36, 165-171.
- Jacobo-Molina, A., Ding, J., Nanni, R.G., Clark, A.D.Jr., Lu, X., Tantillo, C., Williams, R.L., Kamer, G., Ferris, A.L. n Clark, P., Hizi, A., Hughes, S.H. & Arnold, A. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6424.
- Lepage, M. (1967) *Lipids* 2, 244-250.
- Loya, S., Kashman, Y., Hizi, A. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* 293, 208-212.
- Loya, S., Reshef, V., Mizrahi, E., Silberstein, C., Rachamim, Y., Carmeli, S. & Hizi, A. (1998) *J. Nat. Prod.* 61, 891-895.
- Metcalfe, L.D., Schmitz, A.A. & Pelka, J.R. (1966) *Anal. Chem.* 38, 514-515.
- Miranda, M.S., Cintra, R.G., Barros, S.B. & Mancini, F.J. (1998) *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 3, 1075-1079
- Murata, N., Wada, H. & Gombos, Z. (1992) *Plant Cell Physiol.* 33, 933-941.
- Ohta, K., Mizushina, Y., Hirata, N., Takemura, M., Sugawara, F., Matsukage, A., Yoshida, S. & Sakaguchi, K. (1998) *Chem. Pharm. Bull.*, 46, 684-686.
- Pham Quoc, K., Dubacq, J.P., Justin, A.M., Demandre, C. & Mazliak, P. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1168, 94-99.
- Pham Quoc, K., Dubacq, J.P., Demandre, C. & Mazliak, P. (1994) *Plant Physiol. Biochem.* 32, 501-509
- Pham Quoc, K. & Pascaud, M. (1996) *Ann. Nutr. Metab.*, 40, 99-108.
- Pham Quoc, K. & Dubacq, J.P. (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, 1346, 237-246.
- Qureshi, M.A. & Ali, R.A. (1996) *Immunopharm. & Immunotoxicol.* 18, 457-463.
- Rey, M.A., Spire, B., Dormont, D., Barre-Sinoussi, F., Montagnier, L. & Chermann, J.C. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 121, 126-133.
- Sato, N. & Murata, N. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 710, 279-289.
- Scheffler, D.J. & Krylov, V.S. (2000) *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45, 208-227.
- Wada, H. & Murata, N. (1990) *Plant Physiol.* 92, 1062 – 1069.
- Xue, C., Hu, Y., Saito, H., Zhang, Z., Li, Z., Cai, Y., Ou, C., Lin, H. & Imbs, A.B. (2002) *Food Chem.* 77, 9 – 13.
- Zarrouk, C. (1966) *Thèse de Doctorat. Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, Paris, France.*

# LA SPIRULINE (*ARTHROSPIRA*) PEUT-ELLE AIDER DANS LE COMBAT CONTRE LE SIDA/HIV ?

AMHA BELAY

*Earthrise Nutritionals, P.O Box 270, Calipatria, CA 92233, Email: abelay@earthrise.com*

---

## Résumé

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) il y a dans le monde en voie de développement 6 millions de personnes infectées par le virus du SIDA qui pour survivre ont besoin de la thérapie anti-rétrovirale hautement active (HAART). Or seulement 400 000 d'entre elles y ont accès. Après de nombreuses années d'indifférence à cette pandémie, les compagnies pharmaceutiques commencent seulement à proposer ces anti-rétroviraux à des prix convenables. L'OMS s'efforcera de fournir la thérapie anti-rétrovirale à 3 millions de personnes pour l'année 2005. Néanmoins 5 millions de personnes ont été récemment infectées par le SIDA et 3 millions d'entre elles meurent chaque année. Cette sinistre réalité appelle à la mise en œuvre de tous les moyens possibles pour combattre la pandémie.

Le rôle des aliments et des compléments alimentaires comme stratégie naturelle thérapeutique dans la prévention et l'atténuation du SIDA a été très peu étudié. Cette communication met en évidence le rôle de la Spiruline (*Arthrospira*) dans la prévention, l'atténuation, la diminution de la progression de la maladie et toute amélioration de la qualité de vie des personnes affectées par le virus du SIDA.

Il apparaît dans la littérature que la Spiruline régule favorablement le système immunitaire en augmentant l'activation macrophage, l'activité des cellules T et l'activité des cellules naturellement destructrices. Il a aussi été démontré que la Spiruline augmente la production de gamma interféron, ce qui peut éventuellement rendre les virus inactifs, que l'eau extraite de la Spiruline avait une activité antivirale contre notamment le virus humain immunodéficient (HIV-1) et que le virus simplex de l'herpes (HSV-1). Les polysaccharides sulfatés polyanioniques de la Spiruline sont aussi des candidats potentiels aux microbicides anti-HIV.

Des observations sur les animaux et les patients atteints du SIDA ont montré qu'une nourriture altérée avait une influence sur la progression de la maladie. Des déficiences en micronutriments provoquent le dysfonctionnement des cellules immunitaires dû au déséquilibre du rapport Th1/Th2. Elles provoquent également la production de radicaux libres à l'origine de complications secondaires qui accélèrent la progression de la maladie et les infections opportunistes. Nous discuterons du rôle potentiel de la Spiruline comme complément nutritionnel et thérapeutique dans le combat contre le HIV/SIDA.

## Abstract

According to the World Health Organization (WHO) there are currently six million people infected with HIV in the developing world that need access to highly active anti-retroviral therapy (HAART) to survive. Only 400 000 have this access. After so many years of indifference to the pandemic, the pharmaceutical companies are now beginning to have the heart (HAART?) to allow access to these anti-retrovirals at affordable costs. Efforts are being made by WHO to provide antiretroviral therapy to 3 000 000 people by the year 2005. Nevertheless, 5 000 000 people get newly infected with HV/AIDS and 3 000 000 people die of AIDS every year. This grim reality calls for the use of all available means of combating the pandemic.

Very little attention has been given so far to the role of foods and nutraceuticals as natural therapeutic strategies in the prevention and mitigation of HIV/ AIDS. This paper highlights the potential role of *Spirulina* (*Arthrospira*) in the prevention, mitigation, delay of disease progression, and overall improvement of the quality of life of those affected by HIV/AIDS.

There is evidence from the published literature that *Spirulina* modulates the immune system favorably by increasing macrophage activation, T- cell activity and natural killer cell activity. *Spirulina* has also been demonstrated to increase interferon gamma production, which can potentially inactivate viruses. The water extract of *Spirulina* has been shown to have antiviral activity against a host of enveloped viruses including human immunodeficiency virus (HIV-1) and Herpes simplex virus (HSV-1) among others. The polyanionic sulfated polysaccharides of *Spirulina* are also potential candidates for anti-HIV microbicides.

Evidence from animal models and observations on AIDS patients show that altered nutritional status has influence on the course of AIDS progression. Micronutrient deficiencies result in immune cell dysfunction resulting in imbalance in the Th1/Th2 ratio. Micronutrient deficiencies also result in the production of free radicals that cause secondary complications that hasten disease progression and opportunistic infections. The potential role of *Spirulina* as a nutritional and therapeutic supplement in the fight against HIV/AIDS will be discussed.

# RECHERCHES SUR LES APPLICATIONS ET FONCTIONS CLINIQUES DE LA SPIRULINE EN CHINE

JIAN-HONG LI

*Life science College, Nanjing Normal University, 210097, Nanjing, PR China,  
lijianhong@pine.njnu.edu.cn, jhli6308@public1.ptt.js.cn*

---

## Résumé

La Spiruline est produite en Chine depuis le début des années 80. Vers la fin de 1997, le domaine de culture de Spiruline atteignait 1 000 000 m<sup>2</sup> et la plus grande production de poudre sèche par an était de 1 500 000 kg. Le produit était directement utilisé pour la santé, comme complément alimentaire et nourriture pour l'aquaculture.

Dans les 10 dernières années, l'attention des chercheurs s'est portée sur les fonctions cliniques de la Spiruline. De nombreuses observations expérimentales ont été faites sur les rats et les humains. La Spiruline s'est révélée compenser les dommages causés au système sanguin par la radiation et la chimiothérapie, protéger les organes des lésions dues à l'ozone et aux radicaux, empêcher la formation de fibromes dans le foie, inhiber les tumeurs, réduire le GHb pour les diabétiques non insulino-dépendants, empêcher l'apoptose du thymus et des cellules hématopoïétiques, empêcher les maladies intestinales, faire régresser l'altération de la mémoire d'apprentissage de la souris induite par l'aluminium etc. Les effets de la Spiruline ont été observés sur les rats en simulation d'apesanteur. La Spiruline a aussi été utilisée avec les médecines traditionnelles chinoises.

Les polysaccharides provenant de la Spiruline sont des composants très efficaces. Parmi ses nombreuses fonctions nous pouvons citer l'amélioration de l'immunité, l'affection directe des cellules hématopoïétiques, l'inhibition du développement des tumeurs et des cellules de Hela.

Mots clés : Spiruline, fonctions cliniques, Polysaccharide, Chine

## Abstract

Since the middle of 1980's, *Spirulina* has been produced in China. By the end of 1997, the culturing area of *Spirulina* was about 1 000 000 m<sup>2</sup>, the highest yield was about 1 500 000 kg dry powder per year. The products was directly used as health food, nutrition supplementary in foods, and feed to aquiculture.

In the last ten years, more researchers' attentions were absorbed on the clinical functions of *Spirulina*. Many experimental observations had been done on rats and human. A lot of evidence demonstrated *Spirulina* be effective to recover blood system damages caused by radiation or chemotherapy, protect organs from harm caused by ozone or radicals, prevent the formation of liver fibrosis, inhibit tumors, reduce the GHb in non - insulin dependent diabetes, inhibit thymus and hematopoietic cell apoptosis, prevent intestinal diseases, improve learning-memory impairment of mice induced by aluminium and so on. Under the simulated weightlessness condition, the effects of *Spirulina* on rats were observed; *Spirulina* also was used together with Chinese traditional medicines.

Polysaccharide of *Spirulina* seemed to be a very effective component. It do many functions, not only by improving the immunity, but also directly affecting hematopoietic stem cells, and inhibiting the growth of tumor or Hela cells.

Key Words: Spirulina, Clinical Function, Polysaccharide, China

**THE EFFECTS OF A HIGH CHOLESTEROL DIET, WITH OR WITHOUT  
SUPPLEMENTATION WITH SPIRULINA PLATENSIS, ON THE LEVELS OF  
CHOLESTEROL, TRIGLYCERIDES AND HIGH-DENSITY LIPOPROTEIN CHOLESTEROL  
IN RABBITS**

LUCIANE MARIA COLLA<sup>1</sup>, ANA LUIZA MUCCILLO-BAISCH<sup>2</sup>, JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Fermentations, Engineering and Architecture Faculty, University of Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, Brazil

<sup>2</sup>Department of Fisiological Sciences, Federal University Foundation of Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brazil

<sup>3</sup>Laboratory of Biochemical Engineering, Department of Chemistry, Federal University Foundation of Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brazil

\*Corresponding author Address: P.O. Box 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil.

[dqmjorge@furg.br](mailto:dqmjorge@furg.br)

Recently it was verified that natural antioxidants can inhibit the hypercholesterolemia, being proven their effect in many cases; one of the most known cases is the "French paradox", an apparent compatibility of a diet with high fat ingestion with a low incidence of atherosclerosis, due to the consumption of red wine, which presents considerable amounts of antocyanins, natural pigments with phenolic structure. Considering the high cost of the medicaments, alternative treatments for the control of the hypercholesterolemia have been used in the popular medicine, as the ingestion of capsules of poly-unsaturated fatty acids or fruits and vegetables extracts that present substances with antioxidant potential, as the eggplant and the mate. Among the substances with antioxidant potential, are the ascorbic acid and the phenolic compounds (Gardner et al., 2000). The cyanobacterium *Spirulina* is cultivated and commercialized worldwide due to its nutritional characteristics including high concentrations of protein (~65%), vitamins and mineral salts. Preparations of *Spirulina* are also used for their therapeutic properties in the treatment of many diseases, including hypercholesterolemia and atherosclerosis.

The aim of this study was to verify the opposite effects of cholesterol and *Spirulina platensis* diets on the levels of cholesterol, triglycerides and HDL-cholesterol in rabbits. Fifteen males New Zealand white rabbits, weighing 3496±336g, 8 weeks old, were included in this study. Animals were housed individually and water was provided at libitum. After adaptation, 15 rabbits were equally divided in five groups. All animals in the five groups were fed daily with 100 g of feed, being the feed specific to each group.

The first group of animals (SDG-standard group) was fed with a standard feed-SD (Nuvital Nutrients, Brazil). The second group (CDG-cholesterol diet group) was fed with a cholesterol added diet (CD-cholesterol diet), containing 3.5g of cholesterol per 1,000g of SD. The cholesterol was dissolved in 100g of swine fat previously heated. The third group (CSDG-Cholesterol-*Spirulina* diet group) was fed with a *Spirulina* added diet (CSD-cholesterol-*Spirulina* diet) prepared with the addition of 5.0g of *Spirulina platensis* biomass (Delaware, Brazil) per 1,000g of the cholesterol added diet (CD), the animals been provided by 0.5 g of *Spirulina*/day. The fourth group (CSDG30) was fed with the CD in the first month and with the CSD in the second month of treatment. The swine fat was used to aggregate homogeneously the powder of cholesterol and the *Spirulina* biomass to the feed. However, as the swine fat is constituted by saturated fat, it was necessary to evaluate the influence of this one on the animals' lipoprotein levels. In this way, a fifth group of animals (FDG-fat diet group) was fed with a fat diet (FD), prepared by the addition of 100g of swine fat in 1,000g of standard feed. Determinations of humidity, proteins, lipids and ashes were accomplished using the proposed methodology of A.O.A.C (1995) to determine the final composition of the diets.

Approximately 4 mL of blood was drawn from the central ear artery of the rabbits at 0, 30 and 60 days of treatment. Serum total cholesterol, triglycerides and high-density-lipoprotein (HDL) were assayed using commercial enzyme kits (Wiener Lab, Argentina; Lab Test, Brazil) on Vitalab Selectra 2 equipment. Data are expressed as means ± standard deviations of the mean (SD). Statistical differences between the groups were determined with Student's test with p<0,05 considered statistically significant.

The composition analysis of the diets demonstrated some variations on the percentiles of humidity, ashes, proteins and lipids. The standard feed (SD) has presented the lowest lipid content (5.19%) when compared with the others diets (~13.80%), what can be explained because this diet was not added of swine fat. The cholesterol added in CD (cholesterol-diet) and CSD (cholesterol-*Spirulina*-diet) (350 mg/100g) caused no differences on lipids percentiles, even though it could cause significant differences on the serum lipids levels.

Table 1: Results of total-cholesterol (TC), triglycerides (TGL) and HDL-cholesterol in the rabbits in 0, 30 and 60 days of treatment.

	Time (day)	SDG	CDG	CSDG	CSDG30	FDG
TC (mg.dL <sup>-1</sup> )	0	28.0±9.5	59.3±35.8	26.0±10.6	46.3±15.0	21.0±2.0
	30	25.0±6.2	626.7±76.7	368.3±50.6	535.3±305.4	68.0±27.9
	60	24.3±7.4	1054.3±100.9	515.7±162.9	923.0±101.5	42.7±33.8
TGL (mg.dL <sup>-1</sup> )	0	71.0±18.5	34.0±13.8	31.3±13.3	58.7±21.5	46.7±9.6
	30	64.0±47.1	58.0±17.3	62.0±5.6	70.7±55.8	40.7±7.0
	60	66.0±31.1	166.3±36.7	97.0±47.6	45.3±11.1	37.0±6.1
HDL (mg.dL <sup>-1</sup> )	0	21.0±1.7	38.0±22.5	18.3±6.1	29.3±10.5	14.7±2.8
	30	15.3±4.6	63.7±18.2	57.7±13.4	36.7±20.6	22.7±5.0
	60	15.3±2.5	73.3±31.4	91.0±15.7	49.0±13.7	28.6±17.8

SDG: standard diet group; CDG: cholesterol diet group; CSDG: cholesterol-*Spirulina* diet group; CSDG30: cholesterol-*Spirulina* diet group-with *Spirulina* after the 30<sup>th</sup> day; FDG: fat diet group.

We found that the levels of serum cholesterol decreased from 1054 ± 101 mg/dL in the rabbits fed with the cholesterol diet (CD) to 516 ± 163 mg/dL in those fed with the cholesterol-*Spirulina* diet CSD (significant at p < 0.0001). When *S. platensis* was added to the diet 30 days after the start of the experiments (CSDG30) serum triglyceride levels were 45 ± 11 mg/dL as compared to 66 ± 37 mg/dL for rabbits fed with the CD for 60 days (significant at p = 0.0039). The levels of serum high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol was 91.0 ± 15.7 mg/dL for rabbits fed with the CSD as compared to 73 ± 31 mg/dL those fed a CD (significant at p = 0.1533). The results obtained for the variation of the levels of total cholesterol, triglycerides and HDL-cholesterol in rabbits by the supplementation of *Spirulina* in the diet are in agreement with the results found by other authors, mainly related to the total cholesterol. The elevation in the total cholesterol caused by a cholesterol rich diet was suppressed by the supplementation of 16% of *Spirulina* in mice (Kato et al., 1984). In the studies accomplished by Iwata et al. (1987), the addition of 5, 10 and 15% of *Spirulina* in mice diets caused significant inhibition in total cholesterol, triglycerides, phospholipids and HDL-cholesterol levels in the hyperlipidemia caused by fructose. Nakaya et al. (1988), in studies accomplished in humans, demonstrated significant decrease in LDL levels, but not for HDL, whose levels stayed constant, while Ramamoorthy and Premakumari (1996) observed significant increase in the levels of HDL. The presence of antioxidant compounds and poly-unsaturated fatty acids in the microalgae *Spirulina* can be the cause of the properties of *Spirulina* on the decrease of serum lipids levels (Kurushima et al., 1995; Miranda et al, 1999).

## References

- A.O.A.C. (1995). Official methods of analysis. 16. ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington.
- Gardner, P.T.; White, T.A.C.; McPhail, D.B.; Duthie, G.G. (2000). The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. Food Chemistry, 68, 471-474.
- Iwata, K.; Inayama, T.; Kato, T. (1987). Effects of *Spirulina platensis* on fructose-induced hyperlipidemia in rats. J. Jap. Soc. Nutr. Food Sci., 40, 463-467.

- Kato, T.; Takemoto, K.; Katayama, H.; Kuwabara, Y. (1984). Effects of *Spirulina* (*Spirulina platensis*) on hypercholesterolemia in rats. J. Jap. Soc. Nutr. Food Sci., 37, 323-332.
- Kurushima, H.; Hayashi, K.; Shingu, T.; Kuga, Y.; Ohtani, H.; Okura, Y.; Tanaka, K.; Yasunobu, Y.; Nomura, K.; Kajiyama, G. (1995). Opposite effects on cholesterol metabolism and their mechanisms induced by dietary oleic acid and palmitic acid in hamsters. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1258, 251-256.
- Miranda, M.S.; Cintra, R.G.; Barros, S.B.M.; Filho, J.M. (1998). Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 31, 1075-1079.
- Nakaya, N.; Honma, Y.; Goto, Y. (1988). Cholesterol lowering effect of *Spirulina*. Nutr. Rep. Int., 37, 1329-1337.
- Ramamoorthy, A.; Premakumari, S. (1996). Effect of supplementation of *Spirulina* on hypercholesterolemic patients. J. Food Sci. Technol., 33 (2),124-128.

# DIFFERENCES IN THE SENSIBILITY OF MULTI-DRUG RESISTANT (MDR) AND NON-MDR HUMAN TUMOR CELLS TO DIFFERENT CONCENTRATIONS OF *SPIRULINA PLATENSIS*

LOPES, T.M.<sup>1</sup>; COSTA, J.A.V.<sup>2</sup>; TRINDADE, G.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiological Sciences, Graduate Program in Physiological Sciences – Comparative Animal Physiology, Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), CP 474, 96201-900 Rio Grande, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratory of Biochemical Engineering, Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, Brazil

\*Corresponding author. Address: P.O. Box 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil.  
[dqmjorge@furg.br](mailto:dqmjorge@furg.br)

## Abstract

Multi-drug resistance (MDR) occurs when tumor cells simultaneously acquire resistance to more than one apparently unrelated chemotherapeutic agent, the best studied MDR mechanism involving the over expression of P-glycoprotein (Pgp). Treatment of MDR tumors by conventional chemotherapy is presently a major concern for researchers, since such tumors need additional drugs to attack the MDR phenotype. The cyanobacterium *Spirulina platensis* grows in alkaline lakes and has been shown to have therapeutic properties, including the reduction of cholesterol, inhibition of the immune system and antioxidant and antitumor properties. In the present study the sensibility of the MDR human tumor cell line Lucena and that of the non-MDR human tumor cell line K562 to different concentrations of *S. platensis* extracts were compared. The cells were maintained in RPMI-1640 medium with 10% fetal bovine serum at 37°C and the trypan blue exclusion technique used to measure cell viability, immediately after the addition of the *S. platensis* extract and 24 and later. All experiments, including non-treated controls, were run in triplicate. The K562 line presented a significantly lower number of viable cells in comparison to the control when treated with the more concentrated *S. platensis* extracts, indicating a cytotoxic effects of the extracts. However, no significant differences were found between cells of the Lucena line treated or untreated with *S. platensis* extracts, suggesting a possible modulating role for *S. platensis* in regard to over expression of P-glycoprotein.

Keywords: Human tumor cell, P-glycoprotein, *Spirulina platensis*

Treatment of MDR tumors with conventional chemotherapy is presently a major concern for researchers, since these tumors need additional drugs to revert the MDR phenotype. Multidrug resistance (MDR) is a phenomenon in which tumoral cells, selected for resistance to a chemotherapeutic agent simultaneously acquire resistance to several apparently unrelated drugs [1]. The best studied MDR mechanism involves the over expression of P-glycoprotein (Pgp) [2]. *Spirulina platensis* is a cyanobacterium, which has been the target of many studies, due to its several therapeutic properties, such as reduction of cholesterol [3], activation of the immune system [4] antioxidant [5] and antitumoral [6] activity.

This work compared the sensibility of two human tumoral cell lines K562 (non MDR) and Lucena (MDR) at different concentrations of *S. platensis* extracts.

To reach this objective the cells were grown in RPMI - 1640 medium (Sigma) with 10% fetal bovine serum (GIBCO), 1% of antibiotic and antimicotic (GIBCO) in disposable plastic flasks, at 37°C.

The experiment was made in a cellular culture plate contain 24 wells. All tests and controls were run in triplicate.

Each well received 1ml of medium with  $2 \times 10^5$  cell. ml<sup>-1</sup> and 50µl of *S. platensis* dissolved in an specific concentration, which were of 0.5, 1.5 e 2.5 mg/ml. *S. platensis* was obtained in lyophilized form.

Cell viability was measured by trypan blue exclusion immediately after treatment and again after 24h of incubation with *S. platensis*. Each experiment was repeated on three independent occasions using triplicate samples. The statistical analysis utilized was ANOVA two ways e post-hoc test Tukey Honest ( $p < 0.05$ ).

The results obtained are expressed in the graphics below:

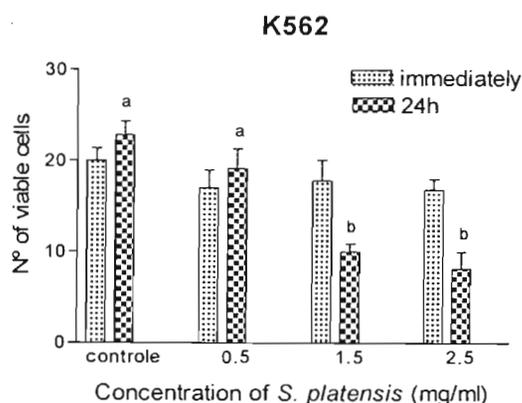


Fig. 1: Analysis of the number of viable cells along time at concentrations of 0.5, 1.5 and 2.5 mg/ml of *Spirulina platensis*. Results are presented as means + standard error of mean. Same letters indicate values not significantly different ( $p > 0.05$ ).

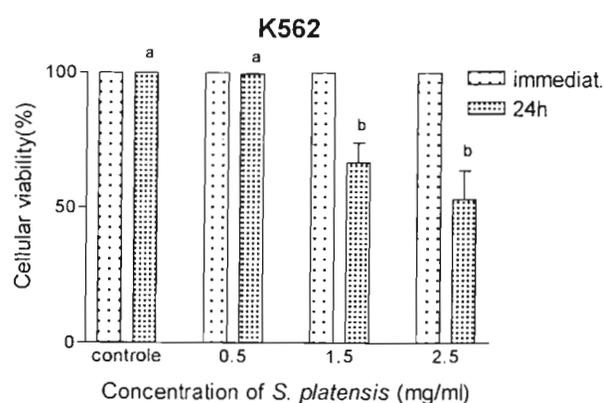


Fig. 2: Analysis of cellular viability along time at concentration of 0.5, 1.5 and 2.5 mg/ml of *Spirulina platensis*. Results are represented as means  $\pm$  standard error of the mean. Same letters indicate values not significantly different ( $p > 0.05$ ).

The results found for K562 cell line (non MDR) suggest that in a concentration between 0.5 and 1.5 mg/ml an intermediate concentration may exist with a reductive effect on the proliferation of *S. platensis*, which could indicate an antitumoral action of this cyanobacterium over the mentioned cell line. Moreover, the decrease in the number of viable cells in the concentrations of 1.5 and 2.5 mg/ml, when compared with the control, indicate a cytotoxic effect of *S. platensis*. On the other hand, the Lucena cell line has shown resistance to *S. platensis*, as expected, since this cell line expresses a MDR character by Pgp over expression (data not shown). The results obtained in this work indicate a possible modulator role of the Pgp by this cyanobacterium.

## References

- [1] M. M. Gottesman & I. Pastan, Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter, *Annu. Rev. Biochem.* 62 (1993) 385-427.
- [2] J.M. Ford, W.N. Hait, Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer, *Pharmacology.* 42 (1990) 155-199.
- [3] M.A. Devi, L.V. Venkataraman, Hypocholesteremic effect of bluegreen algae *Spirulina platensis* in albino rats, *Nutr. Rep. Int.* 28 (1983) 519-530.
- [4] T. Hirahashi, M. Matsumoto, K. Hazeki, Y. Saeki, M. Ui, T. Seya, Activation of the human innate immune system by Spirulina: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*, *International Immunopharmacology.* 2 (2001) 423-434.
- [5] Trisha Dasgupta, S. Banerjee, P.K. Yadav, A.R. Rao, Chemomodulation of carcinogen metabolising enzymes, antioxidant profiles and skin and forestomach papillomagenesis by *Spirulina platensis*, *Molecular and Cellular Biochemistry.* 226 (2001) 27-38.
- [6] T. Mishima, J. Murata, M. Toyoshima, H. Fujii, M. Nakajima, T. Hayashi, T. Kato, I. Saiki, Inhibition of tumor invasion and metastasis by calcium spirulan (Ca-SP), a novel sulfated polysaccharide derived from a blue-green alga, *Spirulina platensis*, *Clin. Exp. Metastasis.* 16 (1998) 541-550.

# DEVELOPMENT OF FOODS ENRICHED WITH THE CYANOBACTERIUM *SPIRULINA PLATENSIS*

GLORIA C. DOS SANTOS<sup>1</sup>, JORGE A. V. COSTA<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Biochemical Engineering, Federal University Foundation of Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brazil

\*Corresponding author. Address: P.O. Box 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil.  
dqmjorge@furg.br

The cyanobacterium *Spirulina platensis* contains a high content of proteins (on average 65%) of high biological value and is also a source of vitamins, minerals, pigments and polyunsaturated fatty acids and can be used not only as a food but also to supplement human diets in cases of nutritional deficiencies.

A study conducted in India on 5,000 preschool age children has demonstrated that 1g of *Spirulina* added to the diet is enough to combat malnutrition.

The acceptability of *Spirulina* to humans can be increased by using it to supplement foodstuffs and we have developed several foods enriched with *S. platensis*, including instantaneous soup, pasta, chocolate flavored powdered dessert, jelly, powdered chocolate and mixtures for lemon and chocolate flavor cake.

Pasta production consists in, basically, mix and knead the ingredients until it reach a flat pasta. After, it is extruded and dried. The other products, by presenting itself in shape of powder, have their ingredients mixed on an industrial mixer and right after their are pack it.

The used sensorial methodology was the hedonic scale of 9 points. On each analyses the judges haven't been trained, once their were on number superior to 30.

The physical-chemical analyses were conduct by the official methodology of A.O.A.C. (1995).

The Figures 1, 2, 3 and 4 presents the average scores obtained by each sample of chocolate cake, lemon cake, powdered chocolate e instantaneous soup, respectively, on hedonic scale. The Figure 4 shows 3 different samples of instantaneous soup that contained 1 g of *Spirulina* each portion.

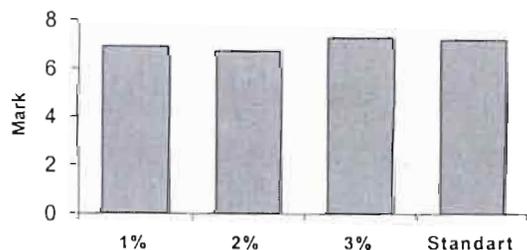


Figure 1: Average scores for chocolate cake on hedonic scale.

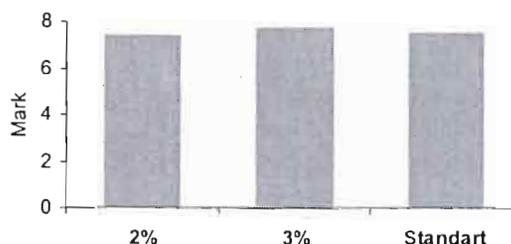


Figure 2: Average scores for lemon cake on hedonic scale.

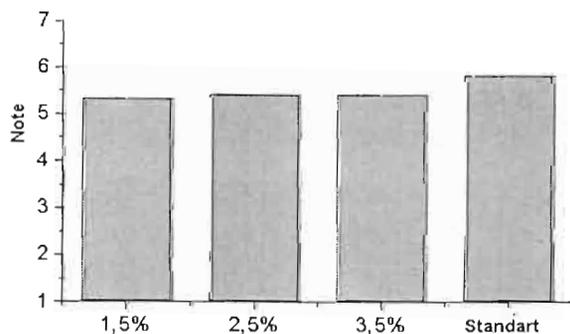


Figure 3: Average scores for powdered chocolate on hedonic scale.

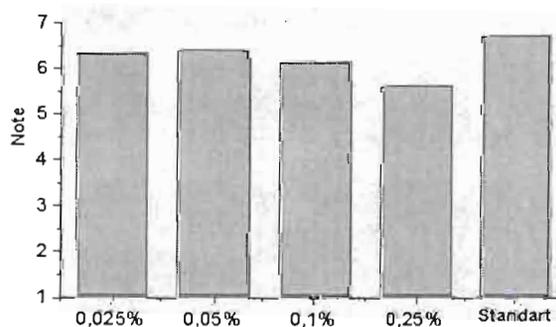
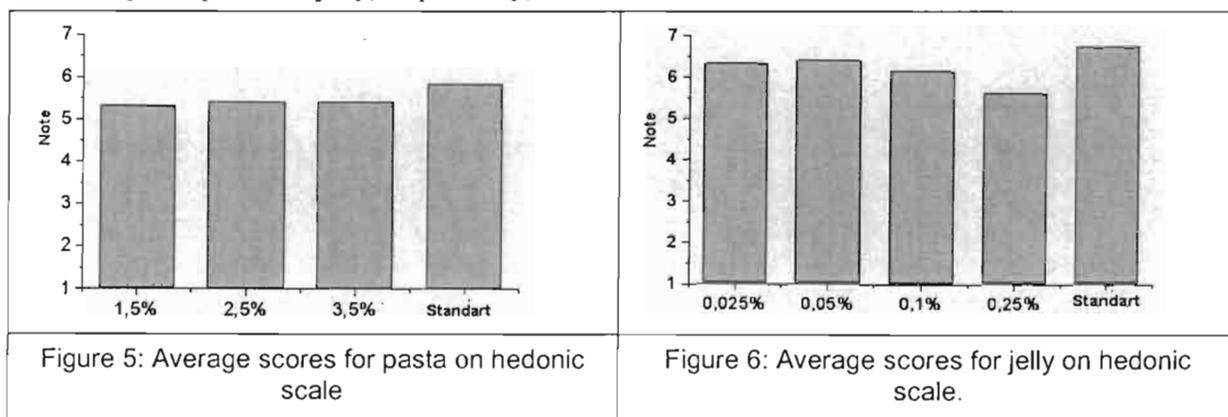


Figure 4: Average scores for instantaneous soup on hedonic scale.

On accord with the statistic analyses we are able to check that, for this products, the samples haven't present significant difference between themselves ( $p=0.05$ ). Therefore, the recipe was defined

containing 1g of *Spirulina* each portion. The Figures 5 and 6 present the average scores obtained by each sample of pasta and jelly, respectively, on hedonic scale.



On both cases, statistic analyses showed not to have any significant difference between the samples. However, the final recipes haven't been defined as the ones of higher concentration due to the observations of the evaluation files. Thereby, for pasta, the final recipe contains 2.5%, or 2.5g of *Spirulina* to each portion; and for the jelly, the concentration of the cyanobacterium is 0.05%, or 0.01g to each portion.

The Table 1 shows the results of the physical-chemical analyses carried out with the enriched foods with *Spirulina platensis* and the respective commercial standards.

Table 1: Analytical Results

Analyse (%)	M .chocolate		M.lemon		P.chocolate		Soup		Pasta		Jelly	
	3% <i>Sp</i>	Stand	3% <i>Sp</i>	Stand	1g/p	Stand	3% <i>Sp</i>	Stand	2.5% <i>Sp</i>	Stand	0.05% <i>Sp</i>	Stand
Digest	94.10	85.72	96.46	98.5	63.0	47.0	93.19	93.44	80.08	73.59	85.39	79.08
Protein	11.20	9.30	8.46	5.74	6.40	43.0	7.74	6.99	14.79	12.64	1143	10.47
Moisture	6.32	6.12	6.33	6.42	1.46	2.33	9.63	7.25	8.21	4.74	1.55	1.57
Ashes	1.71	0.71	1.35	2.33	1.38	1.12	8.68	13.93	1.03	0.87	1.08	1.01
Fat	4.18	11.90	1.63	9.58	1.80	2.63	5.41	1.69	6.17	1.65	1.62	0.97
Fiber	0.80	1.30	0.48	0.39	0.86	0.99	6.56	5.33	-	-	-	-
Carb	75.79	70.67	81.70	75.02	88.10	88.63	55.17	58.25	65.64	73.59	80.21	81.44

Digest = Digestibility; Carb = Carbohydrate; Stand = Standard

The addition of *Spirulina* exhibit itself viable on the tested levels and at the end, has been proved the enrichment, especially on protein, on the seaweed foods enriched.

### Bibliographical references

A.O.A.C.. Official Methods of Analyses of Internacional. 16<sup>th</sup> Edition. Arlington. Virginia. USA, 1995.

Henrikson, R. Microalga *Spirulina* – Superalimento del Futuro. Barcelona. Ediciones S.A. Urano, 1994.

Jassby, A.; *Spirulina*: a Model for Microalgae as human food, 1988.



# **DEVELOPPEMENT HISTOIRE**



## HISTORY OF THE SPIRULINA

HUBERT DURAND-CHASTEL<sup>1</sup> ET RIPLEY FOX<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Sénateur, Palais du Luxembourg, 15 rue de Vaugirard, 75006 Paris*

<sup>2</sup> *215 route de Jalaguère 34190 Laroque riplebox@club-internet.fr*

---

I wish to present you a short outline of the origin of spirulina. The present international symposium is very significant of the development already reached. Maybe not as fast as we would have wished, but let us remind that, in the United States, the development of the soybean took several decades.

Though algae were probably the first life forms on earth three billions years ago, they were as many other microorganisms, the subject of studies only quite recently.

During the Second World War, the Carnegie Institute in Washington studied algae, very interested in their antiviral activities and later in the production of new nutritional sources with a rich and high quality protein content.

Furthermore, the Stanford Research Institute developed the process system of culture, considering algae likely to be a potential renewable energy opportunity. But these general studies hardly concerned the spirulina (arthrospira), algae of the tropical belt of the globe.

Before Christopher Columbus discovered the New World in the 15th century, the Aztecs, in Mexico, have already been consuming spirulina for ages, particularly spirulina growing on the alkaline lake of Texcoco, located close to Mexico City. They had indeed noticed that added with their usual diet, the indian corn, spirulina allowed a better absorption of this cereal that they mixed with a spicy sauce of tomatoes called "chimoli".

In 1939, French botanist identified spirulina in Africa, near the lake Chad, where traditional people were consuming it crumbled with millet and with a sauce similar to the Mexican chimoli. In 1964, a French expedition in the Sahara, reported the interest of spirulina, sold at many markets, in Fort Lamy for instance. The French Petroleum Company studied it and presented all its benefits at the 7<sup>th</sup> international congress of petrochemistry in Mexico in 1967, dealing with the use of carbon dioxide spreading all around the world. As a result of this congress, began a joint-venture between the French Petroleum Institute and a Mexican company of sodium alkalis, Sosa Texcoco S.A., whose general manager I was. The aim was to go from the laboratory step to the pilot-plant step, with culture ponds, drying and conditioning process of spirulina for its marketing.

As soon as a regular production started in 1976, the Japanese, experts in algae, were interested in buying spirulina for their daily diet and also for carps koi, which are fed with spirulina for its rich carotene pigments that enhance their bright orange markings and make them very attractive.

A small world market has been developed laboriously from the Mexican production reaching 300 tons per year, and after 1980, from different new plants in the United States (California and Hawaiï), Myanmar (Ex-Birma), Benin, Thailand, Burkina Faso, Ecuador, Madagascar, Senegal, ...

At the same time, various studies of spirulina were undertaken, particularly in France (Dr Ripley Fox) and in Hawaiï, many of them pointing its therapeutic benefits in several areas, especially for the immune system.

It is in this new direction that are moving towards the research of spirulina, and I am now handling over to Dr Pham Quoc Kiet, who has worked intensively on the sulfolipids of spirulina to expose them to you.

### **Histoire de La Spiruline**

Je souhaite vous présenter un bref aperçu de l'origine de la spiruline ; le symposium international auquel nous assistons, constitue la très belle illustration du développement déjà atteint ; il n'a peut-être pas été aussi rapide qu'il eut été souhaitable, mais rappelons-nous qu'aux Etats-Unis le développement du soja a demandé plusieurs décades.

Les algues, filles aînées du soleil et de l'eau, probablement les premiers êtres vivants de notre planète il y a environ 3 milliards d'années, n'ont fait l'objet d'études qu'assez récemment, comme beaucoup d'autres microorganismes.

Le système de culture des algues par procédé a été développé par le Stanford Research Institute, qui les considérait comme une nouvelle potentialité d'énergie renouvelable. Mais ces études générales ne concernaient guère la spiruline (*arthrospira*), algue de la ceinture tropicale du globe.

Avant la découverte des Amériques par Christophe Colomb au 15<sup>e</sup> siècle, les Aztèques, au Mexique, consommaient déjà depuis des temps immémoriaux la spiruline récoltée en particulier dans le lac alcalin de Texcoco, situé près de la ville de Mexico ; ils avaient en effet remarqué qu'une légère addition de spiruline à leur nourriture de base, le maïs, permettait une meilleure assimilation de cette céréale qu'ils préparaient avec une sauce pimentée de tomates « le chimoli ».

En 1939, des botanistes français avaient identifié la spiruline en Afrique, notamment dans le lac Tchad ; les populations locales la consommaient avec le millet avec une sauce très semblable au « chimoli » mexicain.

Une expédition française dans le Sahara, en 1964, souligna l'intérêt de la spiruline qui se vendait dans de nombreux marchés, à Fort Lamy notamment. L'Institut Français du Pétrole l'étudia, et en présenta toutes ses qualités au cours du 7<sup>e</sup> congrès international de pétrochimie en 1967, à Mexico, traitant de l'utilisation du gaz carbonique, proliférant déjà dans le monde ; il en résulta une joint-venture entre l'Institut français et une société mexicaine d'alcalis sodiques, Sosa Texcoco, dont j'étais le Directeur général ; il s'agissait de passer du stade du laboratoire au stade usine-pilote avec bassins de culture, séchage et conditionnement de la spiruline pour sa commercialisation.

Dès le début de la production régulière en 1976, les Japonais, spécialistes des algues, furent clients et achetèrent la spiruline pour leur nourriture ainsi que pour l'élevage des carpes « koi », auxquelles les caroténoïdes de la spiruline donnent une très belle brillance orange, très appréciée.

Un petit marché mondial se développa donc laborieusement à partir de la production mexicaine annuelle de 300 tonnes et ensuite, après 1980, avec différents nouveaux producteurs aux USA (Californie et Hawaï), au Myanmar (ex-Birmanie), au Bénin, en Thaïlande, au Burkina Faso, en Equateur, en Chine, à Madagascar, au Sénégal, etc....

Parallèlement, de multiples études sur la spiruline ont été réalisées, en particulier en France (Dr Ripley Fox) et à Hawaï, beaucoup d'entre elles faisant ressortir des qualités thérapeutiques dans différents domaines, dont le système immunitaire.

C'est dans cette nouvelle direction que s'orientent aujourd'hui les recherches sur la spiruline, et je passe maintenant la parole à mon associé le Docteur Pham Quoc Kiet qui a beaucoup travaillé en particulier sur les sulfolipides de la spiruline.

# LES CYANOBACTERIES POUR LA SANTE, LA SCIENCE ET LE DEVELOPPEMENT

DR. RIPLEY D. FOX

*La Roquette - 34190 Saint Bauzille de Putois*

---

## **Abstract**

Mention is made of the biochemical possibilities of Spirulina. Attention is called to Mix-Drying as a means for boosting considerably the demand for and production of Spirulina. Spirulina's role in combating AIDS is referenced as well as its future utility on Mars.

Lastly, the use of polysaccharide-providing Cyanobacteria in combating desertification is outlined.

Il est fait mention des possibilités biochimiques de la spiruline. L'auteur attire l'attention sur la possibilité d'utiliser le Mix-Drying pour augmenter considérablement la demande – et la production – de spiruline. Il parle aussi du rôle de la spiruline pour lutter contre le SIDA ainsi que son utilité future sur Mars.

Enfin, l'utilisation de Cyanobactéries pourvoyeuses de polysaccharides pour combattre la désertification est soulignée.

## **New Uses of Spirulina**

We all know that pigments of Spirulina are used as fluorescent markers in analytical microscopy and colorants for food products. It wouldn't surprise me if a bright young biochemist would come up with a host of other chemical-derived uses of Spirulina. But I am, alas, not that young man.

However, there are four under-exploited uses which I believe are about to become important. First, commercial sales of Spirulina keep hovering around a modest sum. Are we at 3000 tons a year today? Combining Spirulina with any cereal of choice would not only offer more agreeable and more nourishing products to the general public, but it would open up the possibility of selling many thousands of tons through the World Food Program and organizations such as U.S.AID and numerous Non-Governmental Organizations. I refer to Mix-Drying of Spirulina which I have discussed already at this symposium. As the ratio by weight of cereal to Spirulina is about 10 to 1 it is obvious that a powerful joint venture could skyrocket the sales of Spirulina – and the health of a lot of children could be improved spectacularly.

Two members of this symposium will be talking about the contribution Spirulina can make toward the defeat of the battle against the human race being waged by the AIDS viruses. The sulfolipids and polysaccharides produced by Spirulina are showing great promise in their ability to hinder viral replication.

We need to get field trials underway immediately and not wait for double-blind tests that no one will finance, and the interminable delays that the legal troops of the pharmaceutical industries will use to block Spirulina's access to the sick and dying while they tear Spirulina apart looking for the magic molecule. If Spirulina can help, let us find out right away. Those stricken with AIDS will be only too glad to help.

The boon to Spirulina farming is only too obvious.

Coming up on the horizon is the planet Mars. Today there is enough evidence for us to believe that the salty and perhaps alkaline waters which once were spread on the surface of Mars and which we will be finding beneath the ground, once supported Archaeobacteria and perhaps even something akin to Spirulina. The minerals and the carbon dioxide needed by Spirulina are there and it is obvious that once man gets there he will be hungry. The European Space Agency and NASA have developed elaborate systems for using Spirulina to regenerate oxygen from carbon dioxide given off by the astronauts, and to recycle their wastes to provide them with food. By the time we get to Mars, in all probability nanotechnology manufacturing techniques will be far enough developed to enable the building of giant transparent domes to cover Mars habitations and Spirulina farms. Not as much a fantasy as it was only a month ago.

And, fourth, Cyanoprokaryotes can live without rain for a lot longer than you or I can. Pringsheim said he revived a sample of "blue-green algae" that had lain dry for 90 years in his laboratory. I suppose someone else had put them there. I have yet to live that long. But I have kept dried samples of Dihé from Chad in my laboratory for 35 years, and every time I put them into Zarrouk medium they revive and multiply. I have also taken a pinch of desert sand from the spot where four corners of the

American States of Arizona, New Mexico, Utah, and Colorado touch. This, too, when put into Zarrouk's medium became a flourishing culture within a few weeks – not Spirulina this time, but probably one of the 1 to 2- $\mu$  diameter Oscillatoria.

The genus, Phormidium, secretes copious quantities of polysaccharides – as does Spirulina under certain circumstances. Many of the Cyanobacterial Family Chroococcales create masses of mucilaginous polysaccharides. These gels retain large quantities of water. And that is just what the desert lacks. There always is an edge to the desert. It may be an oasis or just a fringe of sparse grasses. That is the place to start to stop desertification. A mulch of dried Cyanobacteria prepared as suggested by G.S.Venkataraman, spread as a ring around existing greenery will take on passing molecules of water and fix them into new Cyanobacterial cells and new polysaccharides. And this in turn provides nourishment for soil-building fungi. If man, cattle, and goats, etc.. Can be kept away from this area, the sands can be covered with grasses, shrubs, and even small trees within as short a time as 3 years. This was done in Senegal. The National Botanical Research Institute of Lucknow, India, treated an area of several hectares this way and created a young forest from the desert, with even a tiny stream flowing through it in less than 15 years!

The solutions are there. Yesterday's man had the courage to build thousands of kilometres of stone-walled terraces for farming in nearly every country in the world. Today we must find a way to dominate our politics so as to defend and extend all of our planetary life support systems. Cyanobacteria can help us do just that.

# UTILISATION TRADITIONNELLE DE LA SPIRULINE (*ARTHROSPIRA* SP.) AU TCHAD

DR MICHEL BROUERS

Centre Universitaire de Biotechnologie Algale (CUBIA) Université de Liège B22, Sart Tilman 4000  
LIEGE - BELGIQUE

---

## Résumé

En 1999-2000, le Centre Universitaire de Biotechnologie Algale (CUBIA) de l'Université de Liège, Belgique et le bureau d'études Tractebel Consult (Bruxelles, Belgique) ont été sélectionnés suite à un appel d'offres international pour effectuer plusieurs missions au Tchad dans le cadre d'une étude de pré faisabilité pour le développement de la production de spiruline. L'équipe belge était constituée de 4 experts de Tractebel et CUBIA (le chef de projet, un biologiste spécialiste en micro-algues, un hydrogéologue, une socio-économiste) associés à un socio-économiste du bureau d'études tchadien SOGEC. Cette équipe était assistée par deux cadres de SODELAC (Société de développement du lac), le responsable du projet et le Directeur Technique.

Cette étude, financée par la banque africaine de développement (BAD) pour le compte de la SODELAC, avait pour but d'évaluer les possibilités pour l'optimisation de la production artisanale et l'utilisation traditionnelle de la spiruline au Tchad et pour un développement pré industriel et industriel. Les principaux résultats généraux et scientifiques acquis au cours de ces missions et relatifs à l'utilisation traditionnelle de la spiruline au Tchad sont présentés et discutés.

## Abstract

In 1999-2000, the University Centre for algal Biotechnology (CUBIA) of the University of Liège, Belgium and Tractebel Consult (Brussels Belgium) were selected following their answer to an international invitation to tender for performing several missions in Chad in the frame of a prefeasibility study for development of Spirulina production in Chad. The Belgian team was composed of four experts from Tractebel and CUBIA (the project manager, one biologist specialised in microalgae, one hydro geologist, one socio economist) associated with one socio economist from the Chadian research consultancy SOGEC. The team was assisted by two senior executives of SODELAC (Chadian Company for the development of lake): the project and the technical managers.

The African bank for development sponsored this study for SODELAC. The aim was to study the feasibility for development and optimisation of the artisanal production and traditional use of Spirulina in Chad and for preindustrial or industrial development of Spirulina production. Main general and scientific results of the missions related to the traditional use of Spirulina in Chad are presented and discussed.

## Introduction

En 1940, un phycologiste français Dangeart, publia un rapport traitant d'un composant alimentaire appelé le Dihé, consommé par les Kanembous vivant au Tchad et constitué par des galettes sèches de couleur verte obtenues à partir d'algues récoltées sur le rivage de lacs (appelés ouadis) situés au nord du lac Tchad.

En 1965, le botaniste belge J. Leonard qui participait à une expédition trans-saharienne belgo française fit état au Tchad de la présence de blooms algaux dans divers ouadis proches du lac Tchad et de la vente de galettes bleues vertes, issues de ces algues, sur les marchés traditionnels de Fort Lamy (actuellement N'Djaména). L'analyse microscopique et chimique d'échantillons de ces galettes par Leonard et Compère indiquât qu'elles étaient constituées presque exclusivement de la cyanobactérie *Arthrospira.sp* (appelée à l'époque Spirulina) mêlée à du sable et à quelques impuretés. L'étude révéla aussi le haut contenu en protéines et la grande richesse nutritive de cette nourriture biologique (ref.1). Ces résultats furent à la base de recherches qui conduisirent au développement industriel de la production et du marché diététique mondial de la Spiruline.

La production industrielle mondiale de spiruline dont la culture est effectuée dans des bassins agités « race way » pouvant atteindre, par bassin, des surfaces de plus de 5000 m<sup>2</sup> avoisine actuellement 3 500 à 4 000 tonnes sèches par an. La majeure partie de cette production est vendue dans les pays industrialisés sur le marché diététique sous forme de comprimés et de gélules.

Parallèlement à ce développement industriel, la tradition de consommation de la spiruline est restée très vivante au Tchad surtout dans les départements du Lac et du Kanem où persistent des dizaines

d'ouadis colonisés par la spiruline à certaines époques de l'année. Cette microalgue d'une richesse exceptionnelle en protéines (60 à 70%) reste en effet une base essentielle de l'alimentation de ces populations vivant dans une région désertique et à climat tropical où, pendant la saison sèche, les activités agricoles et d'élevage sont extrêmement réduites.

Au total, 21 sites produisant, ou ayant produit de la spiruline, ont été visités dans les préfectures du Lac et du Kanem. On observe que parmi ceux-ci, 11 étaient en production lors de ces visites et 10 ne produisaient plus principalement par manque d'eau dû à la sécheresse de ces dernières années.

L'étude a consisté entre autres à réunir :

- Les données physico-chimiques et biologiques des eaux et de la spiruline récoltées sur les sites;
- Les données hydrogéologiques, pédologiques et topographiques des sites visités;
- Les caractéristiques humaines et socio-économiques des villages avoisinant les sites.

Des fiches ont été établies sur base de mesures physico-chimiques et biologiques réalisées sur les eaux (lorsqu'elles étaient présentes), de prélèvements d'échantillons de terre, d'observations relatives aux techniques de récolte et de séchage, ainsi que sur base d'entrevues avec les chefs de village et les représentantes des groupes de femmes actives dans la récolte de la spiruline. La photo A, figure 1 présente une vue générale d'un des sites visités.

## Résultats

### Synthèse des données physico-chimiques

Les mesures physico-chimiques des eaux (lorsqu'elles étaient présentes) réalisées sur site ont porté sur les paramètres suivants :

- pH;
- conductivité;
- température;
- concentration en nitrates, nitrites, phosphates et chlorures.

Les mesures physico-chimiques sur les échantillons ramenés en Belgique ont porté sur les paramètres suivants :

- contenu en sels totaux solubles (poids sec);
- dureté carbonatée : concentration en  $\text{CO}_3^{2-}$  et  $\text{HCO}_3^-$ .

Le tableau 1 présente la comparaison entre le pH et la composition du milieu standard de Zarrouk et la moyenne des compositions mesurées dans les sites colonisés par la spiruline.

Tableau 1 : comparaison entre le pH et les compositions du milieu de Zarrouk et des milieux des ouadis colonisés par la spiruline.

Site	pH	Poids sec (g/l)	$\text{CO}_3^{2-}$ (g/l)	$\text{HCO}_3^-$ (g/l)	$\text{NO}_3$ (mg/l)	$\text{PO}_4$ (mg/l)	Cl (mg/l)
Toufou	9,81	124,2	46,5	11,3	22	200	2,400
Kayawa	9,39	74,3	7,3	6	170	90	1,060
Ouna	9,50	88,6	35,9	19,3	290	90	1,700
N'Gourtoua	9,41	45,2	3,3	9,3	2	4	800
Boulia	9,60	32,3	7	8,6	54	29	650
M'Bodou Andja	9,59	25	1,7	8	47	84	1,800
Koua	9,51	16,8	1,3	6,3	27	40	1,400
Morombou	9,06	10,1	1	4	25	19	800
moyenne	9,48	52	13	9,1	79,6	69,5	1,326
Zarrouk	9,00	20,8	1,7	8,1	1820	270	610

On observe que les concentrations en bicarbonates et en chlorures mesurées sur les sites sont, en moyenne, proches de celles du milieu standard de Zarrouk. Il n'en est pas de même pour les concentrations en nitrates et en phosphates qui sont largement inférieures, dans les eaux du site, à celles préconisées par Zarrouk.

On peut dès lors émettre l'hypothèse suivant laquelle un ajout de nitrate et de phosphate dans le milieu aurait un effet favorable sur la productivité de la spiruline. Cette hypothèse reste cependant à confirmer dans le cadre d'essais *in situ*.

#### Synthèse de l'observation microscopique des spirulines

Les échantillons prélevés au cours des missions sur les divers sites ont été analysés en microscopie optique en vue de la caractérisation de leur contenu en spirulines.

Les images obtenues ont été analysées sur écran et sur clichés photo en vue de la détermination des paramètres suivants : Forme générale des filaments, dimension des cellules constitutives, pas des spires, diamètre des spires, longueur des filaments

Les résultats conduisent aux constatations suivantes :

Les spirulines constituent le genre de microalgues prédominant dans la population des échantillons observés. Les microalgues contaminantes appartiennent essentiellement aux genres *Navicula* (diatomées) *Chlorella* et *Chroococcus*

Deux groupes morphologiques sont observés suivant les sites. L'un (type 1) est caractérisé par des filaments à spires serrées (pas des spires de 20 à 33 microns), rétrécies aux extrémités avec resserrement au niveau des articulations, l'autre (type 2) par des filaments à spires lâches (pas de 50 à 70 microns) sans resserrement au niveau des articulations.

Les types morphologiques des filaments présents dans l'eau d'un site donné ou observés dans le dihé originaire du même site sont morphologiquement similaires.

Les dimensions des cellules varient de 7 à 2 microns sans que l'on puisse déceler une relation entre la taille cellulaire et le type morphologique défini.

L'échantillon de sol, prélevé dans l'ouadi sec de Djikilia Imbro montre la présence de fragments courts et colorés de spirulines qui vraisemblablement sont à même de servir d'inoculum pour une recolonisation lors du réapprovisionnement en eau du site.

Si on base l'analyse sur les seuls critères de la systématique classique, basés essentiellement sur les caractéristiques morphologiques, on aboutit à identifier les spirulines des types 1 et 2 à *Arthrospira platensis* et à *Arthrospira maxima*, respectivement. Cette identification est justifiée principalement par la considération de la distance entre spires (pas des spires).

Toutefois la grande variabilité morphologique des spirulines et les données de la taxonomie moléculaire conduisent à considérer cette hypothèse d'identification avec prudence.

#### Organisation des femmes dans la collecte de la spiruline

Au travers des interviews menées, il apparaît que le mode d'organisation des femmes pour la collecte de la spiruline ne varie pas d'un village à l'autre, ni d'une région à l'autre.

Lorsqu'une mare (ouadi ou polder) produit de la spiruline, les femmes de 2 à 5 villages avoisinants, au nombre de 40 à 100 femmes, se regroupent sous la direction d'une femme responsable de la mare. C'est elle qui décide du jour et du moment de la collecte. Le jour de la collecte, toutes les femmes du groupe se retrouvent au bord de la mare avec leur matériel (coro, cuvette et tamis). Au signal du chef, elles pénètrent dans la mare et commencent la récolte. Aucun accès à la mare n'est autorisé en dehors de ces périodes.

Si l'activité de collecte est simultanée, elle n'est pas organisée de façon collective. Chaque femme se voit attribuer une zone et tente de ramasser la plus grande quantité possible de « dihé ». Chacune collecte pour elle-même, avec l'aide éventuelle de ses filles. Le travail salarié n'est pas du tout dans les mœurs.

La récolte est la propriété de chaque femme qui en assure le séchage; elle est utilisée au gré des besoins, soit pour l'autoconsommation, soit pour la vente.

Il n'existe aucune organisation commune de stockage, ni de structure collective de commercialisation. Il peut simplement arriver que les femmes confient leur produit à titre individuel à certaines d'entre elles qui vont au marché.

La seule forme d'organisation se situe donc au niveau de l'accès au site de récolte.

La collecte et le séchage occupent les femmes en moyenne deux heures par jour, de 7 heures à 9 heures du matin, parfois plus tard si les algues sont présentes en abondance. Le caractère aléatoire de la récolte, d'une année à l'autre et d'un jour à l'autre (liée à la présence d'eau en quantité adéquate,

d'un vent favorable et à l'absence de pluie), ne permet pas une spécialisation du travail. Il s'agit donc plutôt d'un revenu d'appoint. Quand la spiruline vient à manquer dans la région, la perte de ce complément de revenu est partiellement compensée par la vente du produit de la cueillette ou la vente de nattes fabriquées à la main par les femmes.

Cette activité est réservée exclusivement aux femmes et aux jeunes filles. Le chef du village ou chef des terres n'intervient que pour régler d'éventuels conflits dont il est saisi. Il fixe également la redevance à lui verser. Celle-ci varie souvent en fonction de la quantité récoltée et est versée soit sous forme monétaire, soit en nature (prélèvement d'une partie de la récolte).

Les femmes semblent peu enthousiastes, voire parfois hostiles à l'idée que des hommes prennent part à cette activité. Le ramassage du « dihé » est un moment privilégié de rencontre et d'échange entre les femmes, en dehors de toute présence masculine. Les gains monétaires résultant de sa vente procurent une certaine autonomie financière aux femmes qui en gèrent partiellement l'affectation.

Il n'existe pas de gestion organisée de la culture de la spiruline. Aucune action n'est menée pour favoriser son développement. Il s'agit uniquement d'une opération de collecte décidée en fonction de l'expérience. La spiruline est prélevée dès qu'elle apparaît en quantité suffisante. Il n'existe aucun permis d'exploitation, aucune limitation des quantités récoltées, aucune forme de gestion prévisionnelle des ressources.

Seuls des aménagements limités de la mare peuvent être réalisés de façon collective, par exemple la clôture des zones de collecte pour les protéger des troupeaux.

Les techniques utilisées sont ancestrales. Il ne semble toutefois pas y avoir de résistance au changement. Les femmes semblent disposées à expérimenter de nouvelles techniques de collecte et de séchage qui augmenteraient la qualité du produit. Elles sont conscientes que cela réduirait leurs efforts et augmenterait leurs gains. Différents procédés techniques ont d'ailleurs été observés (filtration à l'aide d'un tamis, séchage sur claie). C'est davantage un manque de moyens qui limite l'évolution de la technique.

#### Récolte, préconcentration et séchage de la spiruline

Les spirulines, munies de vacuoles gazeuses sont capables de se concentrer à la surface de l'eau. Sous l'effet d'un vent peu violent et dirigé dans une direction favorable, la nappe de microalgues est emportée à proximité des rives et concentrée sur les bords ou dans les criques de l'ouadi. Ces conditions sont favorables à la récolte et sont bien connues des femmes chargées de cette opération, elles conduisent à obtenir une suspension algale de consistance crémeuse ou plus ou moins pâteuse suivant l'époque et les conditions.

La récolte débute le plus souvent le matin vers 7 heures. Les femmes, venant des villages avoisinants et au nombre de 50 à plus de cent, se réunissent sous la direction de leur chef désigné qui décide de l'opportunité et donne le signal de la récolte. Celle-ci débute par un nettoyage rudimentaire de la rive en vue de la débarrasser des résidus et des algues fermentées, les femmes s'avancent alors de un à deux mètres dans l'eau et procèdent à la collecte de la suspension algale. Divers récipients sont utilisés à cet effet : cuvettes et bassins émaillés, bassins plastiques et jarres.

Dans la majeure partie des cas, la récolte est accompagnée d'une opération de pré concentration consistant en une filtration rapide de la suspension dans des paniers finement tressés. La suspension est dans ce cas versée dans le panier en utilisant de petites cuvettes et le résidu concentré filtré est rapidement transvasé dans les bassins de plus grand volume. Ces bassins sont alors transportés vers l'aire de séchage.

En vue du séchage, des aires bien exposées au soleil sont utilisées. Des dépressions circulaires d'environ 80 cm de diamètre et de quelques cm de profondeur (karo) sont aménagées dans cette zone et recouvertes d'une fine couche de sable pur (exempt d'argile et de limon) prélevé sur le site en profondeur. La suspension algale (environ 20 à 40 litres) est déversée dans la dépression en évitant de remuer le sable (déversement par débordement d'une petite cuvette placée au centre ou protection de la main lors du déversement).

L'eau est rapidement absorbée par la couche de sable ce qui conduit à la formation d'un gâteau mou de spirulines. Après 2 à 3 heures de séchage, le gâteau, d'une épaisseur de 1 à 2 centimètres est strié pour faciliter l'évacuation de l'eau résiduelle. Dès que la consistance du gâteau le permet, le dihé est retiré de la cuvette en le débitant en fragments qui sont sommairement débarrassés du sable présent sur la face inférieure puis, soit déposés sur des nattes, soit ramenés directement au village en vue de

parfaire le séchage. Le produit sec est conservé en sacs opaques (sacs Nigeria) à l'abri de la lumière et de l'humidité.

L'ensemble des opérations se séchage dure deux à quatre jours.

Les techniques artisanales de récolte et de séchage conduisent à un produit relativement impur, chargé de particules résiduelles, de sable et de fragments d'insectes. Le temps de séchage, souvent trop long, conduit à un début de fermentation et, vraisemblablement, à une perte de la qualité alimentaire de la spiruline.

Les photos présentées fig.1 illustrent les différentes étapes de production de la spiruline : collecte, préparation des moules, séchage et commercialisation du produit fini.

#### Rôle alimentaire et fonction économique de la spiruline

Pour de nombreux villages visités, la spiruline représente la source principale de protéines. Le « dihé » assure également la sécurité alimentaire des familles qui le stockent.

Au Kanem, la précarité des moyens de subsistance rend la population plus consciente de

la valeur alimentaire de la spiruline alors que dans la zone du lac, la spiruline est surtout vue comme une source de revenus régulière.

Son second rôle essentiel se situe donc au niveau économique. Contrairement aux cultures traditionnelles qui ne génèrent des revenus qu'une ou deux fois par an, après la récolte et ce de façon aléatoire, la collecte du « dihé » fournit un revenu monétaire régulier et représente d'après les enquêtes réalisées près des deux tiers des revenus d'un ménage générés par le produit des ventes au marché. Ces revenus servent à acheter du thé, du sucre, du maïs, des chèvres et des vêtements.

La spiruline joue donc un rôle important pour l'autosuffisance alimentaire et l'amélioration du niveau de vie des populations rurales de ces régions.

Le tableau 2 résume les données recueillies relatives à la production par site.

On observe ainsi que :

- dans la Préfecture du lac, la majorité de la production de spirulines est vendue; par contre, elle est surtout autoconsommée dans la Préfecture du Kanem;
- le dihé est consommé en sauce ajoutée au maïs et au mil; ses vertus curatives sont aussi reconnues dans presque tous les sites visités;
- la production moyenne journalière est d'environ 2 koros (1 koro=1,6 kg) par jour et par femme;
- la production totale, dans ces conditions, est estimée à quelque 250 tonnes;
- le tonnage par hectare est évalué en moyenne à 3 tonnes par an;
- les prix de vente sont d'environ 1.000 FCFA (1,5 €) le koro dans la région du Lac, mais varient de 2.000 à 3.000 FCFA dans le Kanem.

#### **Références**

Léonard J. & Compère P., : *Spirulina platensis (Gom.) Geitler*, algue bleue de grande valeur alimentaire par sa richesse en protéines. Bull. Jard. Bot. Nation. Bel., 37, supp. 1, 1-23. 1967

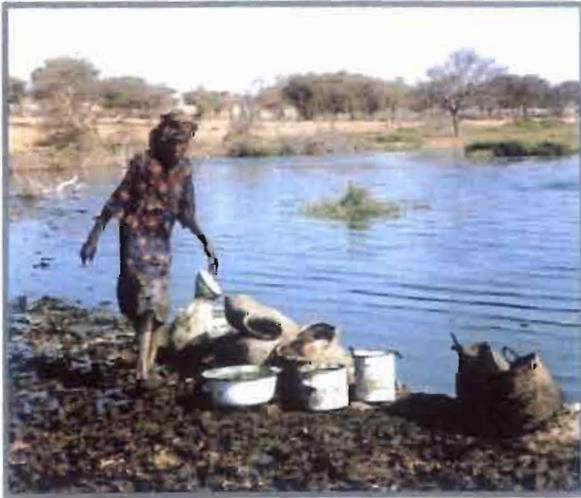




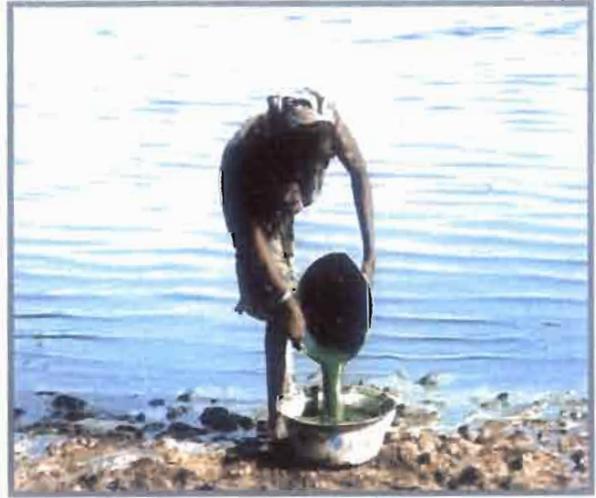
A : Ouadi de Boulia



B : spiruline concentrée en bordure



C : matériel de récolte



D : récolte et préconcentration



E : séchage sur sable



F : vente sur le marché local

Figure 1 : récolte, séchage et vente de la spiruline au Tchad

Tableau 2 – Synthèse des données relatives à la consommation de Dihé et estimation des productions

No	Site	Nombre d'habitants	Estimation superficie du lac hectares	Sites en product.pdt la mission	% ventes / auto-consom.	Forme & fréq. de consom.			Prix de vente du koro (2)	Estimation de la production			Estimation tonnes/an produites	Tonnage par ha, par an
						sauce	soins (1)	fréq. par sem		Prod./jour par femme /koro (1,6kg) (4)	Nombre de femmes actives (3)	Nombre de j./an -4		
1	Kolodorom					X	X	3	>1000					
2	N'Gourtoua		5	X	50%	X	X	3	1250	2	60	90	18	3.7
3	Latirou	216	4		90%	X	X	2 à 3		2	40	90	12	3.1
4	Lac Bodou	137				-	-	3	-					
5	N'Djikilia Imbro	652	8		100%	-	-	2	500 à 1000	2	100	60	20	2.6
6	Guirtina(Souya)													
7	Mare de Ouna	780	4		90%	X	X		1000	2	40	90	12	3.1
8	Boulia		2	X						2	20	90	6	3.1
9	Kayawa	213	9	X	80%	X	X	4	>1000	2	120	90	37	4.1
10	Koua est et ouest	700	6	X		X		3 à 4	500 à 1000	2	80	90	24	4.1
11	Morombou 2		7	X	90%	X	X		1000	2	40	90	12	1.7
12	M'Bodou Andja	126	6	X	90%	X	X	4	750 à 1000	2	80	90	24	4.1
13	Garar		3	X	90%	X	X		1000	2	40	90	12	4.1
14	Ameron Djara		2.5	X	90%	X	X		1000	2	30	90	9	3.7
15	Sourou		3	X	90%	X	X		1000	2	40	90	12	4.1
16	Maourou 1		5	X	90%	X		3	1000	2	40	90	12	2.4
17	Maourou 2		5	X	90%	X		3	1000	2	40	90	12	2.4
18	Indji Tchouloum		4		90%					2	40	90	12	3.1
19	Rombou	259				X	X		2500					
20	Touffou	143	10		50%	X	X		2500 à 3000	2	40	30	4	0.4
21	Barkadrossou	1231	4		10%	X	X		2000 à 2500	4	120	30	24	6.1
		Total :		87.5					Total :	36	Total :		266	3.0

(1) Enflures, caries dentaires, oreillons

(2) 1 koro de Dihé est dit pesé +/- 2 kg. Un koro acheté au marché pesait 1,6 kg

(3) moyenne de femmes actives en collecte de spirulines sur l'année.

(4) valeur moyenne (interprétée sur base des enquêtes)

**DEVELOPPEMENT  
CULTURES ARTISANALES ET  
HUMANITAIRES**



# CULTURES ARTISANALES DE SPIRULINE DANS LE TIERS MONDE POUR LUTTER CONTRE LA MALNUTRITION

CLAUDE DARCAS

*CREDESA : Centre de Recherches pour le Développement et la Santé*

---

## Attention ! : Remarques préliminaires

- Il n'y a pas que la spiruline pour lutter contre la malnutrition.
- Si les ONG se préoccupent de la spiruline, ce n'est pas toujours pour la malnutrition
- Enfin cet exposé n'est qu'un aperçu de ce qui se fait dans le tiers-monde : le tiers-monde est trop vaste pour qu'on puisse savoir réellement ou complètement ce qui s'y passe

### Première remarque

La spiruline est-elle:

- l'algue qui va faire reculer la malnutrition ?
- la panacée contre la malnutrition ?

Réponse : OUI et NON

La spiruline est-elle l'algue qui va faire reculer la malnutrition ?

Il y a malnutrition et malnutrition. En effet, malnutrition = *mauvaise santé qui résulte d'une mauvaise alimentation*. Mais qu'est-ce qu'une mauvaise alimentation ? Cela peut-être aussi bien une sous-alimentation qu'une sur-alimentation. Nous nous intéressons à la sous-alimentation.

La sous-alimentation provient de carences alimentaires dues à une alimentation déficiente en énergie et en protéines, voire à un déficit en fer (anémie), ou en vitamines (avitaminose, etc.). Ces carences résultent le plus souvent et malheureusement d'une production ou consommation insuffisante d'aliments (pour diverses raisons, aridité du sol, climat, pauvreté, ...). Mais elles peuvent aussi avoir d'autres causes :

- Facteurs infectieux
- Facteurs socio-culturels

Bien des pathologies, les maladies infectieuses en particulier, qui entraînent la malnutrition, nécessitent qu'on s'attaque en priorité à leurs origines avant de commencer à préconiser la spiruline. C'est ainsi que, par exemple, le CREDESA, au Bénin, ne recommande la spiruline pour des enfants malnutris qu'après leur déparasitage.

En ce qui concerne les facteurs socio-culturels, l'exigence d'une alimentation équilibrée oblige à informer les populations des principes de base de l'alimentation et souvent à lutter contre les mauvaises habitudes ou les tabous.

La spiruline est-elle la panacée contre la malnutrition ?

Il faut être conscient que l'on peut prévenir ou guérir la malnutrition par d'autres ressources que la spiruline.

1. En prenant soin d'avoir une alimentation équilibrée. : l'éducation nutritionnelle des parents, des mamans, est la première démarche. Le CREDESA, au Bénin, a pris au sérieux ce problème et a fait reculer la malnutrition dans la population enfantine. Les cultures diversifiées sont à encourager. Soja, maïs, haricots, fruits, légumes verts, etc, doivent se trouver sur les marchés et dans les assiettes.
2. Il n'y a pas que la spiruline. En effet, d'autres moyens bien connus et très utiles pour remédier à la malnutrition doivent être cités. Ainsi, les farines enrichies, les laits spéciaux et même désormais des extraits végétaux comme la luzerne.
3. Il faut prendre en considération les situations de crise : les cas où une restauration de la santé, quand il s'agit de malnutrition sévère, même moyenne, s'impose et exige des solutions rapides et très efficaces.

La spiruline se révèle alors particulièrement puissante

## Deuxième remarque

La spiruline va permettre de corriger les carences alimentaires responsables de la malnutrition, d'où le titre de l'exposé, mais il ne faudra pas oublier que les producteurs de spiruline, artisans ou industriels, n'ont pas que cette cible en tête, les problèmes de santé n'étant pas uniquement des difficultés liées à la malnutrition.

## **Méthodes d'obtention de la spiruline**

### Cueillette

On voit bien ce qu'est la cueillette et nous n'en parlerons pas. Cependant, au Tchad par exemple, la récolte du Dihé sur les bords des Wadis n'est pas négligeable et son utilité est reconnue (vente aux caravanes de touaregs).

### Cultures de type familial

Bassins de quelques m<sup>2</sup> seulement.

Les bassins sont des récipients peu profonds : des grandes jarres en terre cuite (Inde) ou des cuvettes en plastique ou des bassins constitués par un film ou une bâche en plastique supporté par une armature en bois.

### Cultures de type semi-artisanal ou artisanal

Une culture familiale n'est pas très loin d'une culture semi-artisanale et entre semi-artisanal et artisanal, il n'y a pas de grandes différences, sauf d'échelle dans les moyens.

La surface totale des bassins et leurs surfaces unitaires sont des éléments de différenciation.

Jusqu'à quelques milliers de m<sup>2</sup> de surface totale et avec des bassins ne dépassant pas eux-mêmes quelques centaines de m<sup>2</sup>, une production de spiruline peut sans doute encore s'appeler artisanale. Mais des petites installations très automatisées sont industrielles.

Les cultures semi-artisanales ou artisanales prolifèrent et ne peuvent que se multiplier.

C'est l'avantage de la spiruline :

- Avec une souche de spiruline,
- Avec quelques produits chimiques, de l'eau,
- Avec du soleil,
- Avec un petit bout de terrain (même très mauvais),
- Avec de bons bouquins, n'importe qui peut se lancer dans une culture de spiruline.

## **Aperçu des cultures artisanales connues**

C'est grâce à Jean-Paul Jourdan et à son édition mensuelle des «Petites Nouvelles de la spiruline» qu'il nous est possible d'avoir une idée de ce qui existe en France, en Afrique Francophone Centrale et de l'Ouest, en Inde, voire en Amérique du Sud.

### En France

Les cultures de spiruline dépassent probablement la dizaine. Elles vont de :

- quelques m<sup>2</sup> (Olivier Verbruggen et ses 1.8 m<sup>2</sup> à Lille en appartement ; ou Etienne Boileau et ses 4 m<sup>2</sup> à Montpellier, dans son jardin),
- à 150 m<sup>2</sup> (ALGOSUD, Lunel, Hérault : une serre-tunnel et en cours une extension
- à 600 m<sup>2</sup> et beaucoup plus, 500 m<sup>2</sup> (Philippe et Estelle Calamand, à Villecun, à côté de Lodève, Hérault). Cette dernière exploitation, caractérisée par une gestion très performante, n'est en opération que d'avril à septembre, particularité des cultures françaises et même européennes : il faut en descendre vers les tropiques pour bénéficier toute l'année d'une température dépassant 25°C, minimum requis.

Cédric Lelièvre et son épouse, à côté de Prades (Pyrénées Orientales), ont un projet sans doute comparable à celui des époux Calamand.

Benoît Legrain et Géraldine Laval à St André d'Olérargues (Gard) ont en projet 500 m<sup>2</sup>. Avec cette surface ils bénéficient du statut d'agriculteur et attendent une subvention de la Chambre d'Agriculture du Gard au titre "Donation Jeune agriculteur"

Vu leurs brillants états de service et le grand nombre de formation qu'elles ont permis, les installations de Jean-Paul Jourdan à Mialet (Gard) (3, 7 et 10 m<sup>2</sup>) auraient dû être inscrites au "patrimoine". Elles ne peuvent malheureusement plus être comptées, venant d'être démontées.

### En Europe

Quittant la France, nous n'avons que deux citations pour

- Espagne : Peter Schilling aux Canaries (2 petits bassins agités par des roues à aubes flottantes et un bassin de 38.5 m<sup>2</sup>). Il y a d'autres réalisations mais nous ne les connaissons pas.
- Suisse : on doit pouvoir compter d'autres installations que celle de Jacques Falquet, un outil de recherche et de pédagogie.

### En Afrique

On ne recense pas moins de 12 pays produisant ou ayant produit de la spiruline. Ce sont des pays francophones. Ne pas avoir d'informations sur des pays comme le Ghana, le Nigéria, et d'une manière générale sur les pays anglophones, ne nous autorise pas à écrire que la spiruline y est inconnue.

#### Le Tchad

La spiruline y a été redécouverte en 1940. Mais en dehors de la spiruline récoltée sous le nom de Dihé, il n'y a pas encore de productions. De nombreuses études de projets ont certes été financées par des organismes internationaux, mais sans résultat.

#### L'Algérie

Elle compte maintenant des bassins de spiruline à Tamanrasset : 16 m<sup>2</sup> construits par Kadda Hiri. En projet : production sous serre et, à plus grande échelle, d'installations de plusieurs hectares et diffusion de la technique de culture familiale dans les villages pauvres du Hoggar.

#### La Tunisie

Dominique Delobel a 200 m<sup>2</sup> de bassins (des 50 et 100 m<sup>2</sup>) à Djerba.

#### La République Démocratique du Congo

Pour mémoire, il y a eu production de spiruline (au temps du Zaïre) à l'Hôpital de Kabinda, bassins construits par Jean-Paul Jourdan dans les années 95. Installations arrêtées comme celles du Monastère des Clarisses à Kabinda également. Dans le Sud-Kivu, les efforts malheureux, du FMSCF (Fonds Mondial de Solidarité) pour implanter une production de spiruline à Kiringyé. Des stagiaires congolais avaient même été formés chez Solarium (Chili). Par 3 fois les installations ont été saccagées par les rebelles responsables de la guerre civile (voisinage du Burundi)

#### Le Bénin

Il semble être la première terre d'accueil de la spiruline en Afrique de l'Ouest.

- DAVOUGON : En 1993-1994 Etienne Boileau a implanté à Davougon (à côté d'Abomey) un pilote de 4 m<sup>2</sup> dans l'enceinte du Centre Anti-lèpre tenu par les Pères Camiliens. Pilote qui a ensuite été agrandi avec des aides diverses à 24 m<sup>2</sup> (3 bassins). Ce pilote a montré la faisabilité des techniques artisanales en milieu tropical.
- PAHOU : suite à Davougon, TECHNAP (Claude Darcas) a alors monté en 1995 un projet de production à Pahou (30 km de Cotonou), en partenariat avec le CREDESA (voir plus haut) Avec l'aide de l'Union Européenne et de la Coopération Française, 260 m<sup>2</sup> ont été construit. Extension à 500 m<sup>2</sup> en 2003 (aide japonaise). Objectif : 700 m<sup>2</sup> (bassins de 30, 40, 50 et 70 m<sup>2</sup>). Vente en sachets de 25 g, en comprimés et en gélules. La spiruline est distribuée au secteur humanitaire à travers des organisations comme SOS Villages d'Enfants, le PAN-CRS, des dispensaires. Le PPLS (Programme Prioritaire de Lutte contre le Sida) apporte un appui officiel à la spiruline.

#### Le Burkina-Faso

On note de nombreuses réalisations :

- KOUDOUGOU : un partenariat entre l'OCADES (Organisation Catholique pour le Développement et la Santé) et Gaz de France - CODEGAZ a été mis sur pied en 1999 par Pierre Ancel. Des tranches successives de bassins (50 m<sup>2</sup> à 200 m<sup>2</sup>) ont porté la surface à 900 m<sup>2</sup>. Près de 2 tonnes de spiruline avaient été produites fin 2003. Pierre Ancel a lancé le projet d'une nouvelle ferme de 3 600 m<sup>2</sup> pour couvrir les besoins du Burkina Faso. Cette réalisation se fera à Nayalgué (à côté de

Koudougou) et sera financée par le gouvernement burkinabé sur des crédits PPTE (remise de dettes par la France). Le gouvernement burkinabé accorde une grande attention au volet santé du projet et en particulier une partie de la production sera réservée à l'aide aux personnes atteintes du VIH. (25% pour le secteur humanitaire).

- LUMBILA : Vincent Guigon (Antenna Technologie) a revitalisé un projet déjà ancien entrepris à Lumbila (non loin de Ouagadougou) par l'EAU VIVE avec ITAQUE d'abord, puis avec Sébastien Couasnet (Antenna Technologie). Objectif : rénover 4 bassins de 10 m<sup>2</sup>, terminer 12 bassins de 60 m<sup>2</sup>, soit à terme 760 m<sup>2</sup>.

- NANORO : remise en route par Jacqueline et Roger Cousin d'une installation démarrée en 1996 par Etienne Boileau et Pierre Ancel, en association avec des Pères Camiliens. 2 bassins de 9 et 10 m<sup>2</sup> sont maintenant en service. Des jeunes étudiants venant de Normandie (Association SOLABURKINA), aidés eux-même par une bourse "Défi Jeunesse" reçue du Ministère Français de l'Education Nationale, ont apporté leur concours à ce redémarrage.

#### Le Togo

Pierre Ancel, avec l'aide de Gaz de France et CODEGAZ, avait lancé en 1997 une production de spiruline à l'hôpital de

- DAPAONG (nord du Togo). Les 54 m<sup>2</sup> construits sont toujours en service. La spiruline est distribuée aux enfants malnutris venant en consultation.

- AGOU NYOGBO. Un premier bassin de 10 m<sup>2</sup> a été mis en culture par Laurence Villaz et Cédric Coquet de l'association SVP (Spirale Verte et Partage), déjà partenaire de divers projets au Mali avec l'association Liber'Terre.

#### La République Centre Afrique

Il y a au moins 3 réalisations à BANGGUI :

- Le Foyer de Charité (avec Elisabeth Picard) à qui Jean-Paul Jourdan a apporté son aide et où le Dr Dupire a travaillé,

- Nutrition Santé Bangui (Dr Dupire)

- Kenose (Jean-Denis N'Gbo, assisté par Jean-Paul Jourdan). Kenose est aidé par Antenna Technologie et l'Ambassade de France a financé 8 bassins. L'objectif est d'atteindre 500 m<sup>2</sup>. Kénose est impliqué dans un programme de fourniture de spiruline au CNLS (Centre National de lutte contre le Sida)

#### Le Gabon

A PORT-GENTIL, Gérard Bruyère (TECHNAP et CODEGAZ) a lancé en 2003 avec le soutien financier de TOTAL/ELF un bassin expérimental de 10 m<sup>2</sup>. La spiruline produite est distribuée à l'hôpital voisin. Cette réalisation a été conçue comme une première étape pour un projet plus important.

#### Le Mali

Adrien Galaret (Association Liber'Terre basée à Cajarc (Lot) a lancé en 2002-2003 une construction de 3 bassins ronds de 3 m<sup>2</sup> chacun à :

- TACHARAME, un village non loin du fleuve Niger et de Gao. C'est un projet qui accompagne d'autres initiatives (alphabétisation, scolarisation)

- SAFO, à côté de BAMAKO, Vincent Guigon (Antenna Technologie) est sur un projet en 2 étapes 2 x 25 m<sup>2</sup> puis 2 fois (2 x 50 m<sup>2</sup>), soit 250 m<sup>2</sup> à terme.

#### Le Niger

- PUIITS BERMO (région de Maradi) est peut-être la 1<sup>o</sup> implantation de spiruline au Niger. Avec l'association "La Gazelle de Puits de Bermo" qui aide le dispensaire du village, la Sœur Odile et son frère, Yves Lesenne, ont construit 2 bassins en dur de 15 m<sup>2</sup>. Fonctionnement satisfaisant depuis 5 ans : 410 kg de biomasse en 2003. Distribution aux malades du dispensaire. La ferme est techniquement autonome grâce aux produits locaux (natron en particulier)

- AGHAROUS : Le projet Niger de TARGUINCA (plusieurs sites en plus de celui d'Agharous) remonte à 1999 et l'implantation à Agharous a été étudiée durant l'été 2001 par Annick Destiné avec

un Touareg (Issouf Maha) qui gère le centre d'agro-écologie de ce village. Après transformation, ce sont 3 bassins en dur de 15 m<sup>2</sup> qui sont en cours de construction (aide de TECHNAP).

- NIAMEY : CODEGAZ prépare un projet de 200 m<sup>2</sup> avec l'Evêché, en partenariat avec le BALD (Bureau d'Animation et de Liaison pour le Développement). Deux autres projets sont en préparation par Vincent Guigon (Antenna Technologie) : un pilote de formation avec l'Université de Niamey ; un projet plus important avec la coopérative de Banituri (plantes médicinales)

Le Sénégal

A KEDOUGOU (800 km de Dakar), Mme Wade, épouse du Président de la République, sponsorise une ferme de spiruline dirigée par Sébastien Couasnet. À la suite du pilote existant, c'est un projet d'un hectare de bassin qui est en cours.

A Madagascar:

La Grande Ile possède de nombreuses lagunes riches de spiruline naturelle et certaines sont exploitées (nourriture pour la pisciculture). Deux réalisations sont à citer parmi d'autres initiatives : □ TULÉAR : Mme Volonavolona (Université de Toliara), avec l'aide d'Antenna Technologie, exploite déjà 4 bassins et 6 autres sont en finition Un projet de 1500 m<sup>2</sup> devrait être financé par le Gouvernement. □ MORONDAVE : CODEGAZ (Gérard Bruyère, à la suite de Marc Boritch, et avec Jean Padernaud et Jean-Baptiste Tasaranitsé) va achever un projet lancé en 2002 dans le cadre d'un dispensaire sur un terrain de l'Evêché : 4 x 50 m<sup>2</sup> déjà en opération ; objectif 400 m<sup>2</sup>.

En Inde

C'est un pays à la pointe des réalisations, tant en recherche qu'en réalisations artisanales et surtout industrielles. Citons :

- Université de RAJASTHAN. Mme (Dr) Pushpa Srivastana, après le succès des productions artisanales de spiruline dans des villages de cette province, a transposé cette politique en l'offrant aux victimes du tremblement de terre de Gujarat. Elle a formé 286 femmes à l'algoculture et une production dans 600 m<sup>2</sup> est en marche. Une unité de production sponsorisée par le Gouvernement a été implantée à Halvad pour apporter un revenu aux femmes vivant dans la zone de Gujarat. Une autre unité a été établie à Burthal où 175 femmes en dessous du seuil de pauvreté ont été éduquées pour cultiver la spiruline.

- Auroville (Pondichéry) L'exploitant de cette "Simplicity Spirulina Farm" en bord de mer, Hendrik, a 205 m<sup>2</sup> de bassins agités manuellement. Productivité : 6.7g/m<sup>2</sup>/j en moyenne sur un an.

Antenna Technologie, très présent en Inde, est à l'origine de nombreuses actions, citons :

- MADURAI où l'Ecopark d'Antenna est un succès : 30 bassins produisent 100 kg/mois qui sont distribués aux enfants dénutris

- BOMBAY : Antenna y commence dans le plus grand bidonville un programme de réhabilitation nutritionnelle de 1 200 enfants avec la spiruline.

### **Méthodes artisanales de production**

Des livres sont nécessaires mais rien ne vaut un apprentissage sur une culture réelle. Ripley Fox (ACMA) a formé de nombreux stagiaires, ainsi que Jean-Paul Jourdan chez lui, à Mialet. Le relais est cependant et heureusement assuré. Désormais cette tâche de formation va être assumée par le CFPPA de Hyères.

## La spiruline, en théorie, c'est simple

*il faut*

*Mais il faut beaucoup d'autres choses*

- 
- de l'eau contenant des sels
  - du soleil
  - une température entre 25° C et 38° C
  - une souche pour démarrer
  - des bassins (donc des matériaux)
  - des intrants
  - de la quincaillerie : bassines, seaux, louches, entonnoirs, balai, tamis, tuyaux, des bidons.
  - une balance, de la sacherie, si possible un pH-mètre, un microscope
  - un abri / magasin / laboratoire / bureau
- et ... si possible aussi : un téléphone ! (dès que l'on sort du familial pour arriver à l'artisanal).
- 

### Les bassins

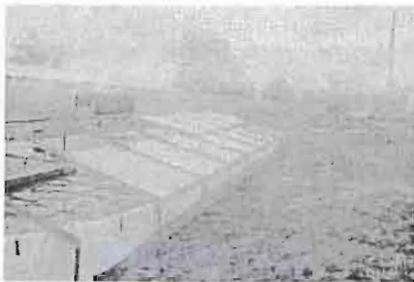
Ils peuvent être de différents types :



bois



bâche plastique



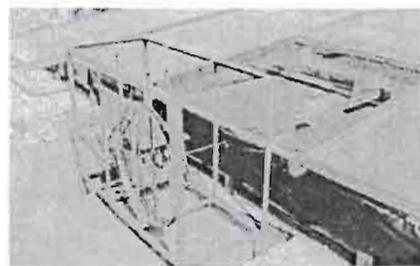
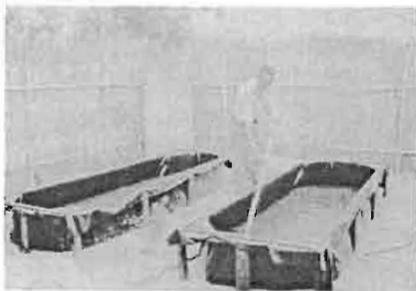
parpaings revêtus de plastique



béton

### L'agitation

Elle peut être manuelle (avec un balai) ou mieux : avec une roue à aubes ou une pompe



### Milieu de culture

La spiruline est une vaillante petite bactérie mais il faut saler son eau et il lui faut des engrais.

La photosynthèse à partir du gaz carbonique de l'atmosphère est une merveille mais s'il n'y a pas d'autres sources de carbone disponible, la productivité sera faible.

Il faut du chlorure de sodium, c'est facile à trouver et du bicarbonate, ça devrait être pareil mais ce n'est pas le cas. Dans de nombreux pays (Bénin en particulier) il n'y a pas de revendeurs et il faut s'improviser importateur. Au Niger, au Mali ; à Madagascar le natron remplace le bicarbonate. L'urée se trouve dans les pays producteurs de coton.

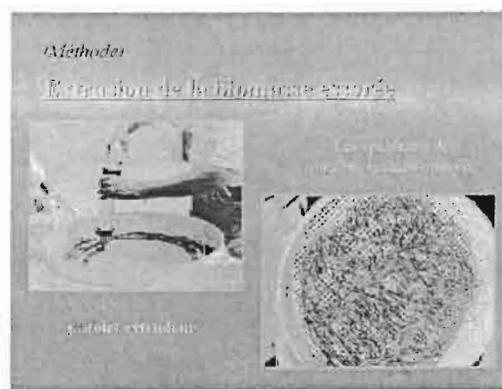
Quand les récoltes commencent il faut nourrir la spiruline

Un type de milieu d'ensemencement		Un exemple d'une nourriture d'entretien (Kg d'intrants par kg de spiruline récoltée)	
	g/litre	Bicarbonate	1.000
bicarbonate	8.00	Sucre	0.400
nitrate de K	2.00	Nitrate de potassium	0.045
phosphate diammonique	0.12	Urée	0.300
sulfate de magnésium	0.10	Phosphate diammonique	0.050
urée	0.02	Sulfate ferreux	0.005
Chaux sulfate de fer	0.02	Sulfate de magnésium	0.005
		Chaux	0.010

Si l'on se contente de cette nourriture minimum, la productivité sera faible. Il faut donc ajouter aussi du bicarbonate : environ 1 kg/kg de spiruline pour que la productivité dépasse 5g de spiruline/m<sup>2</sup>/jour.

### Récolte et extrusion

Filtration sur un tissu à mailles fines (35 à 40 µ). La récolte demande de la main d'œuvre. Des pompes peuvent remplacer l'alimentation manuelle des filtres. Mais le décolmatage des filtres exige quand même la présence d'un récolteur.



La spiruline égouttée contient 90 % d'eau. Extruder la biomasse en spaghettis enlève beaucoup d'eau et facilite le séchage

Bio-masse	g	% d'eau	Eau (g)
égouttée	10 000.	90	9 000
essorée	5 000.	80	4 000
séchée	1 075.27	7	75.27
deshydratée	1 000.	0	0.

### Séchage

Le séchage solaire est difficile en milieu tropical car l'air étant humide, le temps de séchage est trop long et des moisissures peuvent se développer.

Le séchage dans une cabine chauffée au gaz enlève 98 % de l'eau résiduelle.

La spiruline commerciale contient 7 % d'eau.

Après séchage, la spiruline est broyée en poudre et elle est généralement livrée dans cet état, dans des sachets, boîtes ou flacons.

Une clientèle existe pour des gélules ou des comprimés.

### Emballage

Pour des petites productions, l'emballage manuel est possible. Quand la production devient importante il faut réfléchir à l'utilisation de machines.

## Problèmes

La spiruline n'est pas un long fleuve tranquille. Les problèmes sont nombreux. Les algoculteurs du dimanche n'existent pas. L'amateurisme est déconseillé.

- Les intrants sont un souci majeur à cause de leur disponibilité, du prix, de la qualité. Il faut donc prévoir un fond de roulement (Plus de 10 % du coût de revient)
- La Main d'œuvre est un poste non négligeable. Elle représente entre 30 et 36% du coût de revient.
- La Bonne santé de la spiruline : C'est un souci permanent car les bassins peuvent tomber malades. Odeurs, couleurs, productivité en baisse. La forme "droite" de la spiruline est redoutée.

## Pérennité des entreprises artisanales

L'échec est souvent dû à l'assistanat permanent ou l'arrêt. Les causes sont multiples :

- taille insuffisante pour absorber les frais fixes
- intrants trop chers ou manquants
- faible productivité : climat, pluies, incidents, accidents de santé de la spiruline
- marketing ignoré
- prix de la spiruline trop cher pour le secteur humanitaire
- fonds de roulement insuffisant.
- management défaillant : formation, communication, isolement, continuité, ...

## Retombées sur le développement

- Les petites cultures semi-artisanales (moins de 500 m<sup>2</sup>) sont plutôt du domaine du bénévolat. Il faut les aider constamment mais leur utilité n'est pas en question. Offrir de la spiruline à des enfants souffreteux, ajouter une production de spiruline à de maigres cultures de mil ou sorgho est plus une mission qu'une occupation.
- Les retombées des installations dont la taille garantit la pérennité sont réelles. Nayalgué, par exemple, avec 3 600 m<sup>2</sup> et 600 kg de spiruline par mois dont 25% réservés à des enfants malnutris (16 000 enfants), 20% à des personnes vivants avec le VIH/SIDA va générer 40 emplois directs et 20 indirects.



Les projets spiruline présentés au Colloque des Embiez sont des véritables actions de développement. On ne peut que reprendre ce qu'a écrit Loïc Charpy à l'issue du colloque de Mialet en mai 2002 : «En effet, des villageois, souvent choisis parmi les plus déshérités et les moins éduqués travaillent ensemble sur un projet de production d'un produit relativement difficile à obtenir. Ils vont devoir apprendre à lire, à compter, à mesurer. Ils vont augmenter leur capacité à se prendre en charge, à inventer, pour certains à travailler. Ils vont être sensibilisés à la bonne nutrition, à l'hygiène. Même si le projet s'arrête, tout cet acquis est un plus formidable. Ils recommenceront sur un autre projet spiruline ou un projet tout à fait différent, mais ils sauront que leur misère n'est pas une fatalité et que l'accès à la connaissance qu'ils ont eu grâce aux ONG est un atout considérable».

# SPIRULINE HUMANITAIRE DANS LES P V D : PENSER AU LENDEMAIN

PIERRE ANCEL

*Ferme de Koudougou projet Nayalgue, p.ancel@wanadoo.fr*

---

## Introduction

Lorsque l'on est ONG, vouloir implanter dans les Pays en Voie de Développement des installations de culture de la spiruline est un objectif louable : lutte locale contre la malnutrition, amélioration des défenses immunitaires pour les enfants et les adultes des populations déshéritées, la spiruline, en attendant d'avoir conquis les principales organisations de santé internationales et le monde scientifique souvent sceptiques, n'en a pas moins sur le terrain de très nombreux adeptes, parmi lesquels les organisations de santé locales, les congrégations religieuses, les centres de réhabilitation nutritionnelle, les médecins et infirmiers ayant pu se rendre à l'évidence du « plus » apporté par la spiruline.

Nombreuses sont par conséquent les ONG, petites ou moyennes, à découvrir les mérites étonnants de *l'Arthrospira platensis*, vulgairement la spiruline, puis à vouloir en implanter des cultures locales. Sur le principe de la fourniture des cannes à pêche plutôt que du poisson.

Cependant, lorsque l'on a trouvé un bon partenaire local, construit avec lui quelques bassins et démarré une culture, l'essentiel du travail reste à fournir par l'ONG, ce qu'elle ignore le plus souvent. De quoi s'agit-il ? Pour atteindre le succès, l'ONG rencontrera 3 obstacles majeurs, qu'elle aura lieu de prendre en compte si possible avant le démarrage du projet. Malheureusement, ses efforts sont généralement concentrés en amont de ces obstacles : choix du partenaire, mise en place du projet, conventions, recherche de fonds, constructions, démarrage des cultures absorbent l'essentiel de son énergie... Lorsque les difficultés réelles apparaissent sur le terrain, l'ONG n'est bien souvent pas préparée.

## Obstacle 1 : maîtriser la culture

Les techniques de culture de la spiruline sont aujourd'hui bien connues des spécialistes du domaine ! Lorsque l'ONG débute dans des projets spiruline, il est rare qu'elle ait à sa disposition un de ces spécialistes. Force lui est de débiter grâce aux conseils, écrits ou oraux de ces derniers, ou grâce à quelques connaissances acquises sur des missions antérieures. Citons ainsi l'existence du manuel de culture de spiruline artisanale de Jean Paul Jourdan, celui des Idées Bleues de Giles Planchon, ainsi que l'ouvrage de Ripley Fox : « Spiruline : technique, pratique et promesses ». Enfin, il est possible depuis avril 2004 de venir se former grâce à un cycle de 400 heures au Centre de Formation Agricole de Hyères, qui devrait permettre au débutant d'arriver à une certaine maturité.

L'effet trompeur provient du fait que le démarrage d'une culture de spiruline ne pose généralement pas de problème : la souche et le milieu de culture sont neufs, les conditions de développement sont optimales. Cette période favorable, de quelques semaines à quelques mois, correspond généralement à la période de présence des représentants de l'ONG sur place. Ceux-ci repartent alors avec le sentiment de la « mission accomplie ». Les premières difficultés n'apparaissent en général qu'après le départ de l'ONG et sont accrues par trois facteurs :

- l'incapacité de l'acteur local, encore peu expérimenté, non seulement à trouver la cause, mais aussi à décrire le problème de culture rencontré,
- les difficultés et les délais de communication : langue, distance, liaison téléphonique...
- l'évolution très rapide de la spiruline, cyanobactérie, tout autant capable d'une duplication toutes les 7 heures que d'une mort subite. Nous avons ainsi pu constater la mort simultanée en quelques heures, de souches « Paracas » au Burkina Faso, développées sur trois sites différents distants de 10 à 30km... sans aucune explication rationnelle jusqu'à ce jour...

Force est de constater que la culture de la spiruline est un art relativement complexe pour le commun des mortels, encore accru par la distance. La difficulté observée, si elle a pu finalement être correctement exprimée, peut avoir plusieurs facteurs croisés. Parmi les problèmes les plus fréquemment posés, citons l'apparition des spirulines droites, spirulines fragmentées, le jaunissement plus ou moins rapide des cultures, les difficultés de filtration, de pressage, l'apparition de goût ou d'odeur désagréable, les éventuelles contaminations par d'autres algues, etc.

A cela, ajoutons que le matériel cédé par l'ONG est parfois mal adapté ou rapidement mis hors service sur le terrain : pH mètres en panne ou mal utilisés, solutions étalons et kits d'analyse périmés, etc., qui

rendront plus difficile la mise en évidence des causes, d'autant qu'elles peuvent être nombreuses, liées à des facteurs tels que température, ensoleillement, nourriture, agitation, pH, etc.

Ainsi, contrairement aux idées reçues, le maintien en exploitation d'une unité de culture n'est pas chose facile : il faut expérimenter pendant plusieurs années pour pouvoir repérer rapidement, en arrivant sur un site, grâce à l'intuition et l'observation, le problème de culture. Dans le cas contraire, il faudra tâtonner, redémarrer plusieurs fois les cultures avant d'identifier l'origine des écueils rencontrés.

## **Obstacle 2 : former du personnel local**

### Acquérir le savoir-faire

Lorsque la maîtrise de la culture par l'ONG est acquise, il s'agit alors de transmettre ce savoir à une petite d'exploitation locale. Rappelons qu'il est quasiment indispensable de disposer sur place d'un partenaire sérieux et organisé, de facilités telles que l'eau, l'électricité et le téléphone. Pour les raisons précédentes et pour l'avoir expérimentée nous-même, la spiruline « de brousse », au sein d'une communauté villageoise, telle que souhaitée par certaines ONG, si elle voit le jour ici et là, essuie souvent des échecs. Force nous est de constater que la grande majorité des implantations réussies en Afrique (durée de vie > 5ans) sont pour l'instant le fait de congrégations religieuses locales stables et organisées.

Transférer un savoir-faire ? Tout au plus pourrions-nous transférer un *savoir*, et attendre, avec la même patience dont nous avons fait preuve pour nous-mêmes, que l'exploitant local atteigne en quelques années ou dépasse même notre art de la culture.

Le transfert de savoir est relativement rapide : de quelques heures à quelques jours suivant les moyens pédagogiques et l'entendement des étudiants.

Bien choisir le futur responsable d'exploitation est essentiel : les qualités requises nous semblent à l'expérience les suivantes :

- savoir lire, écrire et communiquer rationnellement (niveau minimum : BEPC, de préférence, le baccalauréat, ou bac +2)
- savoir compter et pratiquer aisément la règle de 3 et le calcul mental
- savoir observer et ressentir les plantes : autrement dit, avoir la « main verte ». Cette qualité est souvent l'apanage des moins diplômés...
- si l'exploitation est importante, savoir commander et animer une équipe
- enfin et peut-être surtout, être totalement partie prenante de l'exploitation et de ses objectifs humanitaires

Soulignons que le responsable d'exploitation ne pourra pas être le responsable de l'organisation locale avec laquelle l'ONG a conclu un accord de partenariat, ce dernier, compte tenu de sa position, étant le plus souvent appelé à d'autres tâches. Le responsable d'exploitation devra quant à lui consacrer la majorité de son temps à la spiruline (voire la totalité pour les exploitations de plus de 3 personnes) : l'évolution rapide de la spiruline n'autorise pas l'absentéisme.

Pour la formation de l'exploitant, on s'appuiera sur les ouvrages existants déjà cités. Cependant, ils ne seront pas exploitables en l'état, car souvent trop riches. Il est nécessaire de rédiger un « mode d'emploi de la ferme » adapté aux conditions particulières du site. A titre d'exemple, le site de Koudougou dispose d'un « manuel » de 8 pages, suffisant pour décrire l'ensemble des procédures de culture (ensemencement, nourriture, mesures et contrôles, problèmes rencontrés, etc.).

Il ne reste plus alors qu'à attendre au cours des années, les coups de fil avec les explications plus ou moins claires de l'exploitant, nombreux durant le premiers mois, puis qui s'espaceront lentement au fil des années. On pourra estimer que le transfert de technologie est assuré lorsqu'il n'y aura pas plus d'un appel au secours annuel.

### Apprendre à gérer son entreprise

Dans le cadre de la formation, la maîtrise de la gestion d'une unité de production de spiruline, quelle ait 50 ou 5000 m<sup>2</sup>, est une étape tout aussi longue à acquérir pour l'exploitant. Par expérience, il nous semble qu'en Afrique, cet aspect est encore plus délicat à aborder, tant sont absentes des préoccupations locales les notions d'organisation, de discipline, d'anticipation, de procédures, de contrat, de comptabilité, pourtant piliers de toute entreprise.

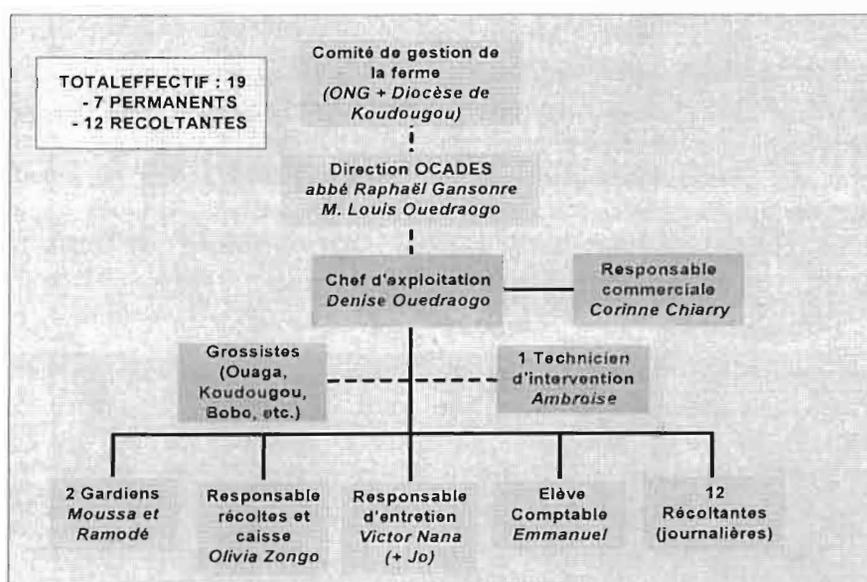
Combien de fois se trouve-t-on à cours de bicarbonate de soude, sans avoir pensé à renouveler le stock... ? Combien de fois le site est-il délaissé pour des funérailles importantes dans le village à côté... ? Pourtant, si le mil peut bien attendre une semaine ou deux avant d'être semé, la spiruline requiert des soins quotidiens si l'on ne veut pas retrouver des bassins jaunâtres après une journée d'absence.

Il faudra là encore quelques années de patience et de conseils pour que, peu à peu, chacun au niveau de l'exploitation se sente responsable, soit efficace, et que tout le monde soit présent à 7 heures le matin...

Finalement, la survie d'une exploitation, petite ou grande, passe par la professionnalisation progressive de l'équipe en place. Même si l'ONG démarre sur une base louable alter mondialiste, force lui sera de reconnaître qu'elle n'échappera pas aux principes universels de l'entreprise.

Ces notions n'empêchent en aucune façon le respect des principes humanitaires et le travail dans la bonne humeur, au contraire. Quelques conseils utiles :

Etablir un organigramme de l'exploitation



Préciser les tâches de chacun par des « fiches de fonction ». Ceci jettera les bases d'un fonctionnement efficace et évitera bien des confusions. A titre d'exemple, nous donnons ci-après l'organigramme de la ferme Koudougou (Burkina Faso).

Concentrer la responsabilité technique et financière de l'exploitation sur une seule et même personne. Les décisions doivent être prises en tenant compte de la rapidité de développement de la cyanobactérie : les commandes d'intrants, de sachets, les réparations, et... la remise des salaires, n'attendent pas la décision d'un superviseur éloigné. Elles doivent être prises à chaque instant par le responsable d'exploitation.

Etablir dès que possible une comptabilité de la ferme.

Quelle que soit la solution de financement de l'exploitation, la connaissance des coûts d'exploitation est nécessaire. Il faut s'opposer à cette tendance naturelle dans les PVD visant à travailler au jour le jour, et à chercher de nouvelles recettes lorsque les caisses sont vides. De telles vérités, aussi banales, ne sont pas forcément claires dans tous les esprits, tant au niveau du partenaire local que de l'ONG. En principe, aucun projet ne devrait voir le jour sans l'établissement d'un compte d'exploitation mensuel prévisionnel, préparé en parallèle avec le budget d'investissement. Ce compte d'exploitation sera par la suite ajusté en détaillant les postes clés tels que salaires, intrants, réparations, consommables, eau, électricité, sans oublier, victimes trop souvent de l'amnésie africaine, les provisions pour remplacements !

Savoir impliquer le personnel dans le fonctionnement de la ferme.

La notion de salaire est souvent assez abstraite pour un nouvel embauché, le plus souvent sans expérience d'un premier emploi. Le salaire peut apparaître comme un dû, quel que soit le travail effectué. Or il est essentiel que chaque employé comprenne que la ferme fonctionne uniquement grâce

à la volonté et au labeur de chacun, qu'il « est » la ferme : le salaire perçu doit refléter les résultats de la production. Des primes à la productivité seront d'excellents moyens de prise de conscience et de motivation. Néanmoins, l'argent n'est pas tout, et ce sera le rôle du responsable d'exploitation que d'insuffler au sein de son équipe un bon état d'esprit. La communication au sein de son équipe est essentielle, avec des contacts directs et précis. L'Afrique, mais aussi d'autres PVD où le non-dit est prédominant, ne l'entendent pas toujours de cette oreille et les problèmes humains, dans les premières années, s'ajouteront aux problèmes techniques. Cependant, quelles que soient les difficultés d'implantation de l'esprit d'entreprise, nous pensons que le fait de travailler chaque jour pour une cause humanitaire constitue un moteur essentiel de réussite et de progrès rapide au sein d'une équipe.

### **Obstacle 3 : pérenniser l'exploitation**

Le troisième obstacle peut se résumer ainsi :

- Construire une ferme de culture à un coût
- L'exploiter coûte, à la longue, beaucoup plus cher.
- L'ONG et le partenaire local ont tendance à oublier le point 2.

Comment financer une exploitation sur 1, 5, 10 ou 20 années?

#### Solution 1 : Micro-installations (quelques dizaines de m<sup>2</sup>)

Les coûts d'exploitation sont pris en charge par le partenaire local ou par l'ONG. Le plus souvent, l'ONG se concentre alors sur la construction et le démarrage de la ferme. Les aspects exploitations, notamment financiers, sont confiés au partenaire local : congrégation religieuse, associations. Ils sont parfois pris en charge sur les premières années par l'ONG elle-même. C'est le fonctionnement le plus courant des petites unités de spiruline qui ont été implantées en Afrique : Davougon (Bénin), Nanoro (Burkina Faso), Dapaong (Togo), Puits Bermeau (Niger), Agharous (Niger), Morandave 1<sup>ère</sup> tranche (Madagascar), Gabon etc.

Inconvénient : un lent traquenard financier

Au départ, l'ONG, pas plus que le partenaire local, n'a une réelle connaissance des coûts d'exploitation. Pour une petite installation de quelques dizaines de m<sup>2</sup>, produisant quelques kilogrammes de spiruline par mois, les coûts mensuels, prenant en compte salaires (ne pas oublier les gardiens !), intrants, ensachage, réparations et remplacements, eau, téléphone, électricité, seront de l'ordre de 80 à 150 euros (ordre de grandeur pour l'Afrique), soit entre 50 000 et 100 000 FCFA. Ces coûts, même modérés, sont une charge supplémentaire pour le financeur, dont il n'a pas souvent conscience à l'origine. Ainsi, les coûts d'exploitation d'unités de production dépassent en quelques années le coût de réalisation, ceci d'autant plus rapidement que l'unité sera petite. Finalement, produire de la spiruline sur de petites installations revient toujours plus cher que d'importer de la spiruline industrielle (environ 15 euros le kilo). La solution qui consiste à produire de la spiruline en milieu villageois ou par le biais d'une association locale humanitaire pour réduire le coût est souvent un leurre : personne ne travaille gratuitement sur de longues périodes, et les salaires, minimes au début, rattraperont rapidement les niveaux régionaux, même en brousse. Par contre, l'ONG aura à supporter en plus le manque de moyens logistiques et techniques locaux.

En conclusion, la prise en charge des frais d'exploitation par le partenaire local ou les ONG ne peut concerner que de petites cultures. La production restera limitée à quelques kilogrammes/mois, donc avec un impact humanitaire limité en regard des efforts fournis.

Avantage : faire connaître la spiruline et pouvoir la consommer fraîche.

Quoi qu'il en soit, il est souvent intéressant de commencer par ces petites installations, pour « se faire la main », et parce que les coûts d'investissements sont faibles : environ 10 000 euros, si l'on prend en compte les frais de missions, les bassins, un petit bâtiment, l'achat de matériel et des intrants pour un ou deux ans, etc. Il faudra bien entendu clarifier le problème du financement des coûts d'exploitation avant de commencer.

Ces installations ont l'avantage de faire connaître la technique de culture de la spiruline, et de permettre la distribution de spiruline fraîche, plus efficace et plus facilement tolérée. On crée ainsi des « noyaux d'intérêt » de la spiruline dans les PVD, propices au démarrage, dans un deuxième temps, de plus grands projets, à objectif d'autofinancement.

### Solution 2 : Autofinancement des coûts d'exploitation

On obtient l'autofinancement des coûts d'exploitations en commercialisant une partie de la production (%c). L'autre partie est destinée à la distribution sociale.

Ce principe concerne les installations artisanales de plus grande taille, à l'heure actuelle de quelques centaines de mètres carrés.

Remarques importantes :

La part sociale (%s) que peut fournir une exploitation n'est pas un objectif que l'on peut fixer « a priori » mais une conséquence :

- du prix de revient de la production Pr
- du prix de vente Pv, par la relation :

$\%s = \frac{Pv \times 100 - Pr(100 + ME)}{Pv - Ps}$	<p>Exemple :</p> <p>ME=Marge d'Exploitation</p> <p>Pr (prix de revient) = 15 Euros/kg</p> <p>Marge brute = 20%</p> <p>Pv (prix de vente gros) = 23 Euros/kg</p> <p>Ps (prix de vente social) = 6 Euros/kg</p> <p>Soit : %s = 29%</p>
------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

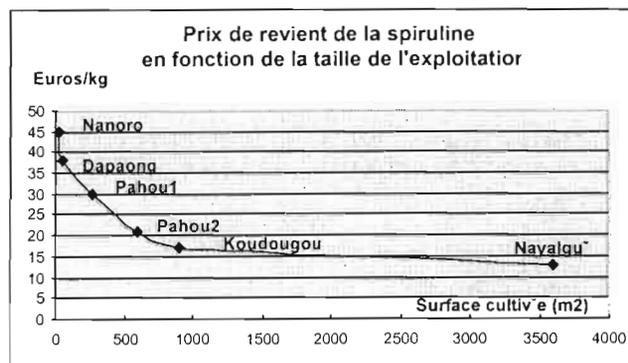
Comment augmenter le pourcentage social %s ?

Les degrés de liberté sont finalement limités :

- Le prix de vente commercial « Pv » ne peut augmenter au delà d'un certain seuil : il doit tenir compte de la concurrence nationale et internationale, qui, si elle n'existe pas au démarrage du projet dans le pays considéré, ne manquera pas de s'installer dès lors que son succès attirera l'attention.
- On ne peut réduire la marge d'exploitation inconsidérément au risque de mettre en danger la santé financière de la ferme
- Le prix social dépend du pouvoir d'achat des plus démunis. Dans certains cas, il peut-être nul! Pas question de l'augmenter...

>>> Reste la possibilité d'action sur le prix de revient Pr

Comment diminuer le prix de revient Pr ?



On cherchera bien sûr à rationaliser l'exploitation, en améliorant notamment les techniques de récolte, d'ensachage, en trouvant des intrants moins chers, en diminuant la consommation énergétique (eau, électricité, gaz). Cependant, le moyen de loin le plus efficace consiste à augmenter la surface de l'exploitation, afin de bénéficier de l'effet d'échelle. Ainsi, on pourra :

- diminuer la part relative du personnel non productif (charges fixes)
- améliorer la productivité des récoltantes grâce à des ateliers centralisés et l'utilisation de pompes de récolte
- diminuer les coûts spécifiques d'entretien (séchoirs et bassins plus grands, matériel labo, informatique, frais de téléphone)
- diminuer le coût des intrants (achats en gros)
- diminuer le coût relatif de l'ensachage (commandes en gros), de la publicité

- limiter les coûts énergétiques (eau : utilisation de forage - électricité : système solaire raccordé au réseau)

A titre d'exemple, le graphique suivant donne l'ordre de grandeur des prix de revient sur différentes exploitations africaines.

Type	Surface exploitation (m2)	Productivité* (g/j/m2)	Production annuelle (kg)	Personnel [ temps plein	kg/personne/ an	Prix de revient (Euro au kg)
Nanoro, Davougon	20	3	22	1	22	45
Dapaong	50	4	73	2	37	38
Pahou1	260	5	475	5	95	30
Pahou2	600	5,5	1 205	9	134	21
Koudougou	900	5,5	1 807	13	139	17
Nayalgu*	3600	6	7 884	40	197	13

#### Inconvénients de l'exploitation autofinancée

Cette solution n'est envisageable que pour des installations de taille moyenne : le point mort de rentabilité en Afrique (mais certainement aussi dans d'autres PVD) se situe à environ 400 m2. Réaliser plus petit conduit à un prix de revient de la spiruline le plus souvent incompatible avec le marché international. Le coût d'investissement sur ce continent étant de l'ordre de 15 000 Euros les 100m2 (bâtiments compris), on voit que l'on peut difficilement prétendre à l'autosuffisance de l'exploitation si l'on ne dispose pas d'un minimum de 60 000 à 100 000 Euros, ce qui n'est pas à la portée de toutes les ONG ! Il faut alors demander un financement extérieur à des bailleurs de fonds institutionnels, ce qui est long et demande une certaine expérience.

Par ailleurs, les projets « moyens » nécessitent une solide connaissance de la culture de spiruline, une certaine rigueur dans l'organisation et la gestion, etc. On imagine que « rater » un projet de grande taille aura un impact considérablement plus large que si l'on avait échoué dans la culture de petits bassins...

#### Avantages

- S'attaquer à la malnutrition à grande échelle.
- Créer une véritable richesse locale

La ferme de culture autofinancée, une fois son équilibre atteint, possède bien des avantages :

- Il est évident que réaliser des installations qui produisent plusieurs tonnes par an de spiruline permet d'attaquer le problème de malnutrition à une échelle nationale, et de traiter des dizaines de milliers d'enfants malnutris. Il ne s'agit plus alors d'une curiosité locale, la spiruline peut être connue et consommée sur tout un pays.

- Le principe de l'entreprise responsabilise le partenaire local, ce que la perfusion par l'envoi de fonds réguliers (solution 1) ne peut pas faire. Une gestion mal contrôlée conduit en effet très rapidement le projet à l'échec : il y a donc obligation de résultat, ce qui crée peu à peu au niveau du partenaire local l'attention (et la tension) propice à la réussite.

- L'entreprise crée ainsi une véritable richesse locale, qui, outre le combat contre la malnutrition, fait travailler toute une équipe d'exploitation, des ateliers locaux pour la maintenance, des agents commerciaux, etc..

#### Conclusion :

Que les conseils ci-dessus, qui font parfois apparaître une réalité douloureuse, ne découragent pas les ONG débutantes. Il y a, avec la spiruline, une demande énorme dans les pays en voie de développement, partout où sévit la malnutrition. Son succès est dû à ses qualités nutritives remarquables, qui en fait le complément inégalé d'une alimentation pauvre. Il faut avoir été soi-même en situation de malnutrition dans ces pays pour se rendre compte de l'importance que peut prendre un flacon de spiruline dans son bagage, que l'on oubliera pourtant dans un placard une fois rentré chez soi.. C'est la raison pour laquelle, quelles que soient les difficultés, la spiruline devrait peu à peu s'implanter dans les années à venir dans la plupart des pays africains.

# LA SPIRULINE À MADAGASCAR

RAVELO VOLOLONAVALONA

*Institut Halieutique et des Sciences Marines - B.P 141. , université de Toliara - MADAGASCAR [aqua-lab@malagasy.com](mailto:aqua-lab@malagasy.com)*

---

## Résumé

La malnutrition est un problème préoccupant pour la population du sud de Madagascar. La population infantile est la plus touchée avec 20 à 30% d'enfants présentant une carence alimentaire grave.

La Spiruline pourrait être une solution pour résoudre ce problème. Elle existe dans un certain nombre de lacs de la province de Toliara qui n'ont jamais été exploités. Nous avons réalisé des recherches sur ces lacs à partir 1998. Nous avons constaté que la production naturelle en spiruline était limitée, ce qui nous a incités à la cultiver en milieu contrôlé.

Nous avons ainsi créé une unité de production de Spiruline composée de 10 bassins de 10m<sup>2</sup> et 4 bassins de 20m<sup>2</sup>. Cette réalisation a été financée par ANTENNA TECHNOLOGIE et La Fondation pour l'alphabétisation du sud de Madagascar. Nous obtenons une production journalière de 6g m<sup>2</sup> et nous récoltons 10 mois par an. Une partie de notre production est offerte à des organismes humanitaires (Centre de Rééducation Nutritionnelle de Beleboka et Dispensaire catholique d'Ihosa) l'autre partie est commercialisé localement pour assurer le fonctionnement de la ferme. Notre but n'est pas de faire un remède miracle, mais de faire accepter la spiruline comme un complément alimentaire. Le terme le mieux adapté pour désigner la Spiruline est peut être **alicament**, condensé de deux termes : **aliment** et **médicament**.

## Abstract

Malnutrition is an alarming problem for the population of the south of Madagascar. The infantile population is mainly affected with 20 to 30% children presenting a serious food deficiency.

The *Spirulina* could be a solution to solve this problem. We can find it in several lakes of the province of Toliara which were never exploited. We carried out research on these lakes since 1998. We noted that the natural production in *Spirulina* was limited, which encouraged us to cultivate it.

We thus created a culture unit of *Spirulina* made up of 10 basins of 10m<sup>2</sup> and 4 basins of 20m<sup>2</sup>. This realization was financed by ANTENNA TECHNOLOGY and by the Foundation for the alphabetization of the south of Madagascar. Our daily production is 6g m<sup>2</sup> and we can yield 10 months per year. Part of our production is offered to humanitarian organizations ("Centre de Rééducation Nutritionnelle de Beleboka" and "Dispensaire catholique d'Ihosa"), the other part is locally commercialized to ensure the functioning of the farm. Our goal is not to make a miraculous product, but to help *Spirulina* to be accepted as a food complement. The best term to indicate the *Spirulina* product could be "**alicament**", digest of two french terms: **aliment** and **médicament**.

## Introduction

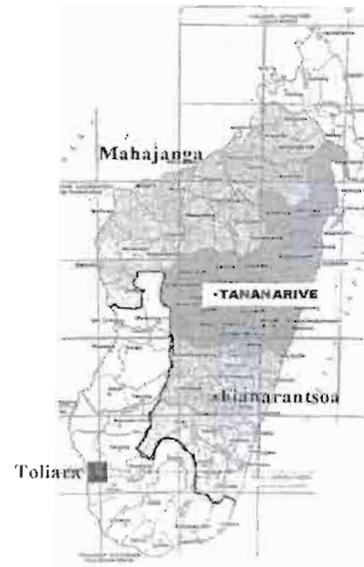
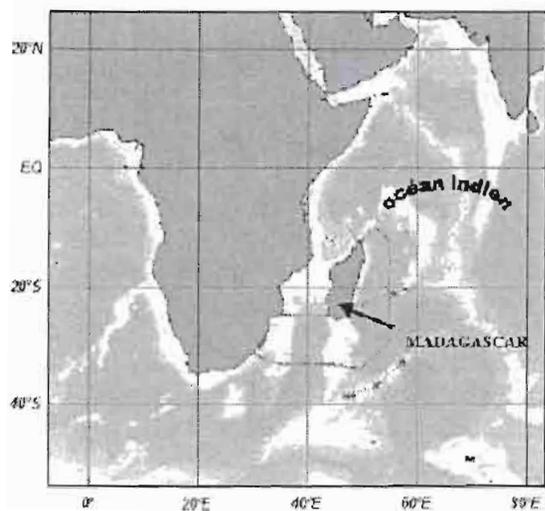
Madagascar est un état insulaire d'Afrique dans l'Océan Indien, aussi grand que la France. L'île a une superficie de 587.000km<sup>2</sup> contre 549.000km<sup>2</sup> à la France. La population représente 16 millions d'habitants, en majorité très jeune puisque 50% ont moins de 15 ans.

Bien que très apprécié par les « Vazaha » ou les Européens, qui s'y rendent de plus en plus nombreux pour diverses raisons, la population autochtone vit à 70%, dans un milieu rural, et la majorité de la population malgache vit en dessous du seuil de pauvreté.

Les cultures agricoles sont insuffisantes, surtout dans la zone sud de Madagascar, et doivent être importées, notamment le riz qui est la nourriture de base.

Si nous parlons de la situation alimentaire dans la zone sud de Madagascar, elle révèle que la majorité de la population souffre de la sous alimentation et de la malnutrition.

Pourtant, cette zone héberge des gisements naturels de spiruline, un complément alimentaire dont sa consommation est adaptée aussi bien pour les traitements préventifs de la malnutrition que curatifs.



### Pourquoi avoir choisi la spiruline comme thème de recherche ?

Lors du passage du spécialiste mondial de cette filière, le couple Ripley FOX en 1994, à Madagascar, notamment à Toliara, des prospections des sites à spiruline ont été effectuées avec l'équipe de l'IH.SM.

Parmi nous, une assistante technique vietnamienne appelée Mme KIM, a déjà identifié l'existence des mares temporaires à spiruline dans la région de Toliara.

En 1995, nous avons pu identifier des mares temporaires et des lacs où la spiruline s'y trouve en quasi-permanence.

Nous sommes très intéressés par les effets bénéfiques de la spiruline à partir des informations apportées par le couple FOX et par beaucoup de bibliographies parlant des avantages de l'utilisation de la spiruline dans l'alimentation humaine pour la santé et pour la lutte contre la malnutrition.

### Toliara est la seule région à Madagascar où l'on peut trouver des gisements naturels de spiruline

Dans la Grande île, après la province de Fianarantsoa, Toliara présente un taux de malnutrition plus élevé par rapport aux autres provinces.

C'est la raison pour laquelle, notre recherche s'est orientée sur la valorisation de cette ressource, qui n'a jamais été exploitée, avant 1998, date du début de nos recherches.

Cette recherche a été financée par le Ministère de l'Enseignement Supérieur, dans le cadre du Contrat Programme de Recherche ; recherche effectuée pour la préparation d'un DEA et d'une thèse de Doctorat.

Des recherches sur l'étude bio-écologique et de la production de cette algue a été entreprise dans les lacs à spiruline de Belalanda.

Le village de Belalanda se trouve à 8km environ, au Nord de la ville de Toliara, sur la route d'Ifaty. Le site à spiruline se situe à 1,5km au Nord du village.

C'est un site composé de différents lacs, dont deux grands lacs représentant chacun une dizaine d'hectare de surface. L'un d'eux a renfermé de la spiruline, mais malheureusement, après de fortes précipitations en 1999, provoquant un déséquilibre du milieu, la spiruline a disparu.

Actuellement, toutes les conditions de développement de la spiruline ne sont pas encore réunies dans le grand lac, alors que dans quelques petits lacs environnant, des spirulines se développent normalement

La disparition de la spiruline, dans le grand lac, nous a engagés à réaliser une étude de faisabilité de culture en milieu contrôlé visant à avoir une production continue.

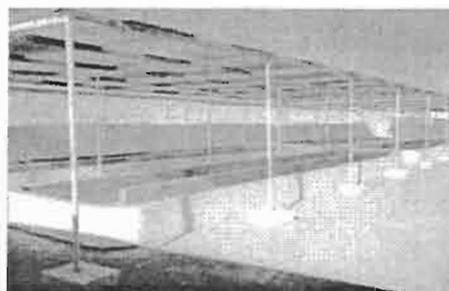
La maîtrise de la technique de culture en bassin a été acquise avec l'aide scientifique et technique de Dr Ripley FOX et de Mr Jean Paul JOURDAN, lors d'un stage à Saint- Bauzille de Putois et à Mialet. Une unité de production de spiruline, se trouve à Maninday distante de 5km de la ville de Toliara.

La construction de cette unité est effectuée avec l'aide financière des ONGs Suisses : il s'agit de l'ANTENNA TECHNOLOGIE et de la Fondation pour l'Alphabétisation dans le sud de Madagascar.

En 2002, 4 bassins en béton de 10m<sup>2</sup> chacun ont été construits, puis en 2003, s'y ajoute 6 autres bassins de 10m<sup>2</sup>. Le coût d'installation des ces bassins s'élève à 11.613 Euros. Actuellement, nous sommes en train d'étendre le site avec la construction de 4 bassins de 20m<sup>2</sup> chacun. Avec une subvention de 6.300 Euros. Nous projetons d'augmenter la capacité de production de spiruline en vue d'une installation ultérieure d'une grande ferme.



Bassins de culture



Extension en cours

### **Technique de production**

#### La culture

Elle est développée en milieu contrôlé et dépend de deux facteurs majeurs :

- le premier correspond à la préparation du milieu de culture lui-même : eau, intrants comme source de sels minéraux et une souche (inoculum) pour lancer la culture.
- le deuxième correspond plus aux conditions ambiantes de la culture de spiruline, ainsi on sait que :
  - la spiruline est une algue d'eau tiède, riche en sels minéraux.
  - la température de l'eau se situe entre 22° Celsius et 35° Celsius.
  - la salinité est d'environ 10 ‰ en début de culture et peut atteindre 30‰ en fin d'un cycle de production.
  - le milieu est basique avec des valeurs de pH qui se trouvent entre 8,5 au et 10.
  - la spiruline a besoin de lumière, élément essentiel pour la photosynthèse.
  - une bonne croissance est observée par une bonne agitation du milieu.

Une fois que le milieu a atteint une concentration maximale en spiruline, la biomasse microbienne est prête à être récoltée.

#### La récolte

Elle se fait par filtration de la moitié de la biomasse, l'autre moitié est utilisée pour la régénération du milieu. La pâte ainsi obtenue est passée à l'essorage et à l'extrusion pour faciliter le séchage. Une fois séchée, la spiruline est broyée afin d'obtenir une poudre granulée. La spiruline est ainsi conditionnée dans des emballages plastiques opaques afin d'éviter la dégradation par la lumière de certaines substances comme les vitamines.

Dans le cas de notre unité de production de la spiruline (100m<sup>2</sup> de surface de culture), la productivité moyenne annuelle est de 6g/m<sup>2</sup>/jour, avec des valeurs extrêmes de 2g/m<sup>2</sup>/j pendant la période fraîche et de 13g/m<sup>2</sup>/j durant la saison chaude et sèche. (Soit 10 kg de spiruline sèche par semaine).

### **Analyses des constituants de la spiruline**

Elles sont effectuées auprès d'organismes de contrôles officiels. Les analyses physique et chimique sont réalisées par le laboratoire du Centre National de Recherche sur l'Environnement et par le laboratoire des contrôles des eaux, aliments et solutés du Ministère de la Santé à Antananarivo. Les analyses microbiologiques sont effectuées au laboratoire de contrôle de qualité ou laboratoire de la microbiologie de l'IH.SM.

La spiruline est un aliment riche en protéines (63,37 % de la matière sèche) et en éléments minéraux. La spiruline ainsi produite est aussi exempte de toute impureté et répond à tous les critères sanitaires pour une consommation humaine.

Tableau 1 : Caractéristiques de la spiruline cultivée à Toliara.

Eléments	Valeurs minimales	Valeurs maximales(g /100g)
<b>Eléments majeurs (g / 100g)</b>		
Cendre	7,5	10,24
Protéine	57,83	63,37
Sucre	20,33	27,15
Matière grasse	1,34	2,24
Humidité	7,45	8,2
<b>Eléments mineurs (mg / 100g)</b>		
Na	1643,53	2101,4
K	1347,20	1413,52
Ca	70,40	90,50
Mg	154,64	186,80
Mn	1	1,51
Zn	2	2,13
Cu	0,44	0,72
Fe	31	35,21
P	619,24	782

Il est à noter que le maïs, le riz, le manioc et la viande de bœuf constituent les aliments de base de la zone Sud de Madagascar. En comparant ces aliments avec la spiruline, on conçoit mieux que la spiruline soit un excellent complément de haute valeur nutritive qui permet d'améliorer et de renforcer le régime alimentaire de la population malgache du sud.

Tableau 2 : Comparaison de rendements en produits et en protéines à l'hectare (tonnes/ha/an) des différents aliments dans le sud de Madagascar.

Aliments	Rendement en produit (T/ha/an)	Protéines (%)	Rendement en protéines (T/ha/an)
Maïs	2,25	9	0,2
Riz	2,5	8	0,2
Manioc (tubercule)	10	5	0,5
Bœuf	0,80	20	0,16
<b>Spiruline *</b>	<b>21,6</b>	<b>60</b>	<b>13</b>

\* avec de la productivité moyenne de 6g de spiruline sèche/m<sup>2</sup>/j

### Utilisation de la spiruline

La spiruline ou « Mâna maitso » est utilisée comme complément alimentaire. J'insiste ici sur le fait que la spiruline est un complément alimentaire et non un médicament.

La distribution de notre production se répartie sur deux axes : l'aide humanitaire et la commercialisation. Dans le contrat qui nous lie aux bailleurs, nous devons donner gratuitement une partie (38%) de notre production aux centres de récupération nutritionnelle de Belemboka à Toliara et au dispensaire catholique d'Ihosy (la ville d'Ihosy se trouve dans la province de Fianarantsoa à environ 300km de la ville de Toliara sur la route vers la capitale). L'autre partie (62%) est destinée à la commercialisation pour le fonctionnement de la ferme.

L'évaluation du coût de revient d'un kilo de spiruline s'élève à 275.000 fmg, soit 27,5 Euros le kilo. Le prix de la spiruline dans le sachet de 50g (pour traitement d'un enfant pendant 1mois environ) varie selon la possibilité des gens :

- à bas prix pour des gens aux faibles revenus : 5.000fmg/sachet (0,5 Euros/sachet de 50g)
- pour des gens aux revenus moyens : 12.500fmg (1,25 Euros)
- pour des gens aisés : 25.000fmg (2,5 Euros)

Le prix d'un kilo de spiruline varie donc de 100.000fmg à 500.000fmg, soit 10 à 50 Euros.

Concernant les zones de distribution de la spiruline,

A Toliara, nous distribuons la spiruline auprès :

- du centre de rééducation nutritionnelle de Belemboka (19,5% de la production )

- du dispensaire indien (15%)
- des étudiants universitaires, surtout en période de préparation aux examens (10%)
- aux particuliers ayant des problèmes de santé (12%)
- aux personnes du 3<sup>ème</sup> âge (4%)
- aux familles (8,2%)
- aux visiteurs d'états et étrangers (2,91%)

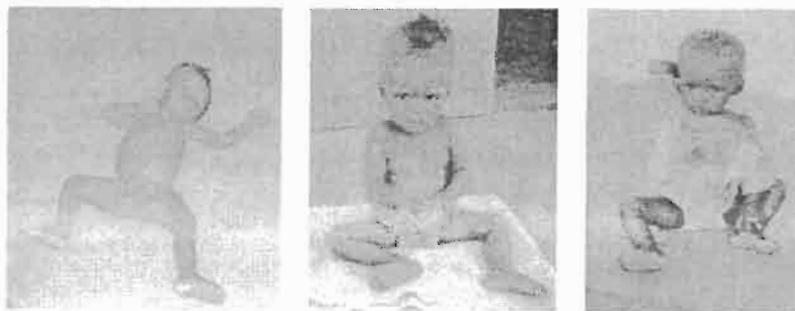
A Ihosy : au dispensaire catholique (3,5%)

Dans d'autres régions : Fianarantsoa (6,39%), Tananarive (15.5%) et à Majunga (3%)

Le nombre moyen de consommateurs de notre produit est de l'ordre de 620 personnes par an et jusqu'à ce jour, environ 1.500 enfants malnutris ont pu consommer de la spiruline depuis la fabrication de notre produit.

Les différentes sortes de maladies rencontrées chez les enfants malnutris sont : la déshydratation avec diarrhée, le paludisme, la tuberculose, marasme, kwashiorkor... Ces maladies sont dues à la sous alimentation et à la malnutrition protéino-énergétique.

Prenons le cas d'une petite fille malnutris traité au Centre de Récupération Nutritionnelle de Beleboka à Toliara,



10 mois

11 mois

14 mois

- AVANT le traitement, l'enfant âgé de 10 mois pesait 5,2 kg et ne pouvait pas tenir sa tête.
- APRES un mois de traitement, on a enregistré un poids de 7,2 kg, d'où un gain pondéral de 2 kg avec une tonicité musculaire redevenue normale.
- AU DERNIER contrôle, à 14 mois, elle présente un poids de 11,750kg et tout va bien.

En effet, la spiruline peut améliorer efficacement la santé des enfants malnutris et malades. Elle peut aussi améliorer la santé des adultes atteints par diverses maladies.: asthmatique, tuberculeux, accident vasculaire cérébral, pancréatite,...

### **La formation pour la culture de la spiruline**

La ferme est une unité de production de spiruline mais aussi un centre de stage qui accueille les étudiants désireux d'acquérir la technologie de la culture de la spiruline.

Actuellement, un technicien supérieur en aquaculture, après son stage réalisé chez nous, va prendre en charge une autre unité de production. Cette année, deux autres étudiants de l'IH.SM, un technicien supérieur et un étudiant en maîtrise option aquaculture, souhaitent effectuer leur stage dans notre structure de production.

Egalement, deux autres étudiants de l'Université d'Antananarivo vont préparer leur diplôme en biotechnologie sur la spiruline, dont l'objectif est d'aboutir à l'élaboration d'une farine infantile à partir des sources nutritives disponibles dans le sud du pays avec ajout de spiruline.

### **Autres exploitants de spiruline a toliara**

- En 1998 et 1999, l'entreprise SPIRUH Sarl était le premier producteur de spiruline à Toliara. Leur production, était destinée à l'exportation. A partir de l'année 2000, cette entreprise a été dissoute, suite au décès de son responsable.
- Le propriétaire du terrain, Mr Daniel RAMAMPIHERIKA, prend actuellement la relève et il vend le produit localement et vers La Réunion.

- Plus récemment, l'entreprise, SPIRNAM, exploite de la spiruline et elle vend sa production à la pharmacie sous forme de gellules. Il est à noter que ces producteurs exploitent les sites naturels de spiruline qui se trouvent dans la région de TOLIARA.

- En 2002, une ferme de production de spiruline est montée à Morondava en collaboration entre CODEGAZ et le Diocèse de Morondava.

La production est destinée entièrement aux enfants malnutris et aux malades du Dispensaire catholique Fanantenana.

### **Conclusions et perspectives**

Compte tenu des intérêts de la culture de la spiruline et de la situation alimentaire de la plupart des familles malagasy, surtout dans le sud de la Grande Ile, l'utilisation de la spiruline pourrait aider à résoudre la carence alimentaire, en matières nutritives (protéines et vitamines) et pourrait améliorer la santé des malades.

Cependant, si nous parlons de la culture de la spiruline, elle est possible dans un environnement aride : sec et chaud, elle n'a pas besoin de beaucoup d'eau. Elle utilise le soleil comme source d'énergie. En effet, la région de Toliara répond à ses critères de développement. Enfin, la culture de la spiruline entre dans la sauvegarde de l'environnement car elle évite l'érosion des sols par l'utilisation des bassins protégés.

Vu les connaissances, actuellement, acquises sur la spiruline, à propos d'une part, sur sa culture en milieu contrôlé, et d'autre part, sur sa composition, sur sa valeur nutritive et sur ses vertus pour la santé humaine, l'utilisation de cette algue devrait être encouragée.

Notre projet consiste à l'installation d'une ferme de production semi-industrielle de « Spiruline » ou « Mâna maitso » afin de contribuer au développement de la région Sud Ouest de Madagascar, handicapée par son aridité.

D'ailleurs, le but de ce projet est à la fois humanitaire et commercial, dès le début, une part de la production est réservée gratuitement aux Centres de Récupération nutritionnelle, pour les enfants souffrant de malnutrition protéino-énergétique.

Aujourd'hui, notre projet consiste en la recherche de financement pour la réalisation d'une plus grande ferme d'exploitation de la spiruline avec 1.500m<sup>2</sup> de surface exploitable dans le secteur de TOLIARA.

### **Remerciements**

Je tiens à remercier vivement toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce projet et en particulier :

- Le Ministère de l'Enseignement Supérieur qui a financé cette recherche, dans le cadre du Contrat Programme de Recherche

- Monsieur BADEAKE Claude, propriétaire du terrain qui a servi au site d'étude

- Les Bailleurs de fond, qui grâce à leurs aides nous ont permis de créer cette unité de production de spiruline sise à Maninday. Je cite ici l'Antenna Technologie et La Fondation pour l'Alphabétisation dans le sud de Madagascar dont Mr BRENTINI est le Président

- Messieurs Ripley FOX et Jean Paul JOURDAN, spécialistes mondiaux de la spiruline

- La Direction et l'équipe de l'IH.SM

- Les organismes de contrôles, je cite ici le laboratoire du Centre National de Recherche sur l'Environnement, le laboratoire de contrôle des eaux, aliments et solutés du ministère de la santé

- Le Centre de Rééducation Nutritionnelle de Belemboka

- Mon mari qui m'a apporté son soutien tout au long de ces années

Mes remerciements vont aussi aux organisateurs de ce colloque, l'Institut pour la Recherche et le Développement et l'institut océanographique Paul Ricard, qui contribuent à promouvoir la recherche et la vulgarisation de ce produit « miraculeux ».

## PRODUCTION SEMI-INDUSTRIELLE ET HUMANITAIRE

PHILIPPE CALAMAND

*Spiruline La Capitelle, 34700 Villecun, France, calos@laposte.net, cythere@club-internet.fr*

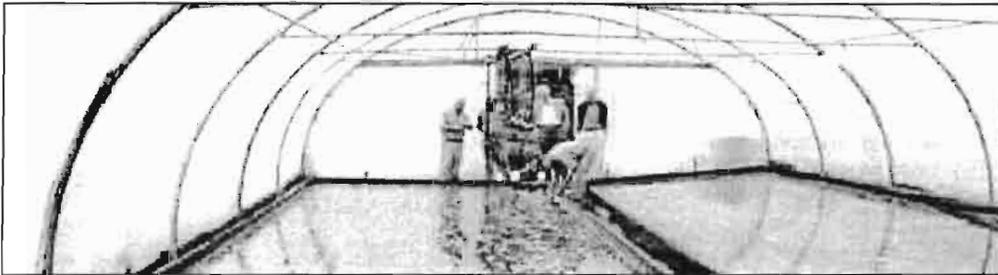
### Résumé

La communication porte sur : \* L'entreprise la Capitelle située dans le sud de la France. \*\* Erreurs à ne pas faire pour devenir cultivateur de Spiruline. \*\*\* Ecole de culture de Spiruline créée avec Estelle dans un camp de réfugiés tibétains dans le sud de l'Inde.

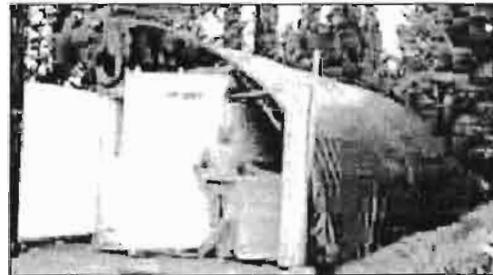
### Abstract

This communication will describe: \* The Capitelle facility located in the south of France. \*\* Errors to avoid to begin a *Spirulina* production. \*\*\* School of *Spirulina* production created with Estelle Calaman in a Tibetan refugee's camp in the south of India.

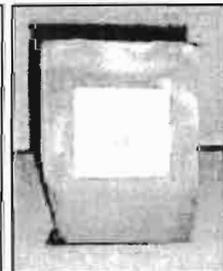
Philippe and Estelle have built two greenhouses with a total spirulina pond area of about 135 square meters. In the summer this yields about 3 kg per day dry weight, making thirty 100 gram packages.



Philippe has experimented with several greenhouse styles.  
He uses a small pump to circulate the ponds.



A view of the greenhouse in the surrounding countryside.  
A used shipping container is the office, lab, harvest and packaging building.  
Black plastic over the top and side is the solar dryer.



Philippe makes spirulina noodles and sells 100 gram bags in his local community.  
Demand exceeds his current supply.

## UPS : UNITE DE PRODUCTION DE SPIRULINE DU CREDESA A PAHOU (BENIN)

ROGER ADOUNKE

CREDECA, BP 1822, Cotonou, Bénin, [credesa@mail.leland.bj](mailto:credesa@mail.leland.bj)

On trouve deux sites de production de spiruline au Bénin :

- Le premier, historiquement, a été mis en route par Etienne Boileau en 1993 avec l'aide des Pères Camiliens dans leur Dispensaire (Léproserie) de Davougon, à côté d'Abomey. Aujourd'hui : 24 m<sup>2</sup> permettent de donner tous les jours de la spiruline fraîche aux malades.
- Le deuxième est celui de Pahou, à 26 km de Cotonou. En 1995, à l'initiative de TECHNAP, ONG du Nord, (Claude Darcas), un partenariat a été instauré avec le CREDESA, établissement béninois semi-public placé sous la tutelle du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.

Pour le CREDESA (Centre Régional pour le Développement et la Santé), la culture de la spiruline représentait un atout supplémentaire dans sa lutte contre la malnutrition, un de ses objectifs prioritaires. Grâce à des financements obtenus de l'Union Européenne et du Ministère Français des Affaires Étrangères, le projet a démarré en 1998 et en 2001 260 m<sup>2</sup> de bassins étaient en service.



TECHNAP en partenariat avec le GERES, autre ONG du Nord, a apporté son savoir-faire en matière de culture de la spiruline tandis que le GERES faisait bénéficier le projet de ses connaissances dans le domaine du séchage.

Le CREDESA a mis en œuvre le projet à travers ses deux principales composantes, la production de la spiruline et la promotion et l'utilisation de cette micro-algue dans les interventions nutritionnelles

### Objectifs du projet

objectifs du projet	
<b>Malnutrition au Bénin</b>	<b>Interventions</b>
Constat :	◆ Produire de la spiruline au Bénin
Enfants de 0 à 3 ans :	❖ Distribuer de la spiruline à la moitié des 7.000 enfants de 0 à 3 ans de la zone de Ouidah, soit 3.500 enfants
➢ Sévèrement malnutris 2 à 5 %	
➢ Modérément malnutris 20 à 25 %	

Les apports du CREDESA ont été les suivants : un terrain de 1200 m<sup>2</sup>, des infrastructures en matière d'informatique et de logistique ou de services, et affectation de certains membres du CREDESA au développement de la spiruline, à commencer par le responsable désigné de l'unité de production (Roger Adouknpé).

Composition de l'équipe sous la direction du Responsable :

- un technicien à la production,
- un ouvrier chargé de l'entretien du site,
- 3 récolteuses ou récolteurs
- six assistantes sociales faisant fonction de nutritionnistes
- les relais communautaires.

Des campagnes de sensibilisation ont été organisées dans les départements de l'Ouémé et de l'Atlantique

## Techniques de production



Les réalisations suivantes ont été faites :

- Un bâtiment de 12m60 sur 4m 40 précédé d'un auvent. Le bâtiment comprend trois salles :
  - Le laboratoire garni de paillasses carrelées
  - Le magasin équipé avec des étagères pour le stockage des intrants et du petit matériel
  - La salle de séchage où sont installées deux cabines de séchage
- Les bassins : les cofinancements de l'UE et du MAE ont permis de construire 260 m<sup>2</sup> de bassins, en bois plastique, (vue ci-contre). Une 2<sup>ème</sup> phase a été initiée en 2002 grâce à des crédits japonais et a permis de faire passer le nombre des bassins de 8 à 15. Les nouveaux bassins sont en béton (vue ci-dessous) ou en parpaings revêtus intérieurement de bâches plastiques



Au total 15 bassins de production d'une superficie d'environ 700m<sup>2</sup> vont être disponibles à terme.

Actuellement 414 m<sup>2</sup> sont effectivement en exploitation.

Chaque bassin a un agitateur qui est un ensemble composé d'un moteur électrique, de système de poulies et d'une roue à aube.

	1999	2000	2001	2002	2003
Nbre de Bassins	4	6	8	8	15
Surf. Tot. disp (m <sup>2</sup> )	120	180	260	260	700
Surf. en prod. (m <sup>2</sup> )	120	180	260	260	414
Prod. totale (kg)		258	424	427	460

Les facteurs climatiques (pluies torrentielles à certaines périodes) entravent souvent la production.

### Acquis du projet

#### Un savoir faire local

Une équipe de production (techniciens, récolteuses, superviseurs) est disponible et maîtrise toute la chaîne de production de la spiruline. Par ailleurs, des documents de capitalisation ont été produits :

un guide de production de la spiruline au Bénin (conditions de culture, construction de l'unité, organisation de la production...) et un guide d'utilisation de la spiruline (composition et avantages de la spiruline, utilisation dans le cas de traitement curatif, fiches de recette de cuisine...).

#### Un marché solvable

Actuellement, la spiruline est vendue dans toutes les pharmacies sur toute l'étendue du territoire National à partir de trois des quatre groupes pharmaceutiques au Bénin.

Une étude de marché a précisé les caractéristiques du marché et ses opportunités au Bénin

#### Reconnaissance locale de la spiruline

157 relais communautaires ont été formés à l'utilisation de la spiruline. Ils sont opérationnels dans 64 villages et quartiers de ville de la sous-préfecture de Ouidah, de Kpomassé, de Tori-Bossito et de Calavi.

#### Acceptation de la spiruline par le corps médical

Comme complément alimentaire pour le renforcement de l'état nutritionnel et sanitaire

### Les autorisations

- Signature de la convention internationale pour l'utilisation des micro algues dans la lutte contre la faim et la malnutrition dans le monde,
- Autorisation du Conseil des Ministres,
- Attestation de la Direction des Pharmacies et des Explorations Diagnostiques.

# La spiruline, c'est bon !



Age	Poids	%	Total
Moins d'un an tous les enfants pesés ayant consommés de la spiruline	Plus de 80 % des normes de Harvard	9	733
	de 60 à 80 %	30	732
	moins de 60 %	4	154
(Ref: P/A) Nombre de rejet		7	21
<b>Total</b>			
De 1 à 3 ans tous les enfants pesés ayant consommés la spiruline	plus de 80 %	43	796
	de 60 à 80 %	50	1096
	≤ 60 %	4	135
Nombre de rejet		7	35
<b>Total 2</b>		<b>100</b>	<b>2662</b>
Total des enfants ayant consommés de la spiruline			2782

## Résultats obtenus par les équipes du CREDESA entre 1999 et 2001

(administration de 5 à 10 g de spiruline/jour pendant 2 à 6 semaines)

critères de récupération : poids

variables	Année			
	1	2	3	total
a nombre d'enfants ayant consommé de la spiruline	243	1445	2014	3702
b enfants sévèrement malnutris	65	143	81	289
c enfants modérément malnutris	96	845	887	1828
d enfants ayant consommé à titre préventif	51	442	1036	1529
e enfants récupérés entièrement	155	983	964	2102
f enfants ayant abandonné	6	5	4	15
g enfants ayant rejeté le produit	31	15	10	56
h total : b + c + d + g	243	1445	2014	3702
i taux de récupération : (e/b+c) (%)	96,3	99,5	99,6	
j taux d'abandon : f/(b + c) (%)	3,7	0,5	0,4	

## LA FERME DE SPIRULINE DE KOUDOUGOU

DENISE OUDRAOUGO

*Ferme de spiruline – BP 34 Koudougou - Burkina Fasso [okdskdg@fasonet.bf](mailto:okdskdg@fasonet.bf)*

---

### **Présentation de la ferme**

La ferme de spiruline de Koudougou est un projet humanitaire qui a pris corps en 2000 sous la direction de l'OCADES (organisation catholique pour le développement et la solidarité). Elle a été financée et réalisée par une association française CODEGAZ d'un montant de 480000 FF. De 225 m<sup>2</sup> en l'an 2000, sa superficie est passée à 895 m<sup>2</sup> en 2002.

### **Buts du projet**

- Lutter contre la malnutrition en fournissant de la spiruline pas chère aux centres de renutrition du diocèse, puis aux autres organismes de santé et aux associations à but caritatif.
- Proposer la spiruline comme un excellent complément alimentaire aux habitants de Koudougou puis à ceux des autres villes et villages environnants.
- Créer quelques emplois et faire en sorte que la ferme soit une entreprise autonome en moins de deux ans ; ce qui garantirait sa pérennité.

### **Production**

Depuis sa création la ferme a produit 4,9 t de spiruline sèche. La production a rapidement augmenté grâce à l'agrandissement de la surface et à l'amélioration des productivités. Au début, les productivités étaient faibles parce que les techniques de cultures n'étaient pas bien maîtrisées. (2.5g / j / m<sup>2</sup> en 2000 au lieu de 6g / j / m<sup>2</sup> à partir de 2003).

### **Distribution humanitaire et commerciale**

Nous produisons en moyenne 150 kg de spiruline sèche par mois et la distribution est faite sous deux volets :

- La part humanitaire, c'est à dire que la spiruline est vendue à perte ou sans bénéfice aux centres de renutrition du diocèse, aux dispensaires et aux associations à but humanitaire. Le prix varie entre 4000 et 12500 FCFA le kilo (40 à 125 FF le kilo).
- La part commerciale, c'est à dire que la spiruline est vendue avec un certain bénéfice pour permettre l'autofinancement de la ferme. Le prix varie entre 15000 et 20000 FCFA le kilo (150 à 200 FF le kilo). La spiruline est vendue surtout à la ferme et dans les différentes pharmacies.

### **Perspectives**

L'état Burkinabé a signé une convention avec le diocèse de Koudougou pour la création d'une unité de production de spiruline à l'échelle nationale. L'ouverture de cette ferme permettra de faire davantage d'humanitaire et de créer une quarantaine d'emplois.

Vous pouvez visiter le site [www.spirulineburkina.org](http://www.spirulineburkina.org)

## SPIRULINE AU MALI (TACHARANE) 2004

LIBER'TERRE

*1, Boulevard du Tour de Ville 46160 - CAJARC Tél. :05.65.40.72.01 [liberterre@free.fr](mailto:liberterre@free.fr)*

---

### **Contexte**

En 2002, l'association Liber'Terre lançait un projet de culture de spiruline à Tacharane (Mali). Elle finançait la mise en route de 3 bassins ronds de 3 m<sup>2</sup> en terre et pierre, formait des techniciens locaux à l'entretien des cultures et à la récolte.

Deux ans plus tard, observant le bon état des structures mises en place, une spiruline d'un magnifique bleu-vert, des bassins et un local bien entretenus, devant l'évolution des villageois et leur volonté de sauvegarder et cultiver la spiruline pour faire face à leurs problèmes, Liber'Terre donnait suite à son projet initial.

Au terme de nombreuses réunions organisées avec les populations locales, à l'appui de l'enthousiasme d'une quinzaine de personnes de Tintchinomé (quartier de Tacharane) prêtes à s'investir dans la culture de la spiruline, il a été décidé de fonder une association pour structurer le fonctionnement de cette culture.

### **L'association « Azayra Nafanta »**

C'est une association malienne apolitique et non confessionnelle qui a pour fonction d'organiser la participation des paysans pour la récolte de spiruline.

### Objectifs

Comme son nom l'indique, Azayra Nafanta, « utilisation du vivant pour se nourrir », a pour objectifs :

- de cultiver et vendre la spiruline
- de donner un accès gratuit à la spiruline aux plus démunis
- de vulgariser et produire cette dernière en tant que complément nutritionnel dans un souci de lutter contre la malnutrition
- d'impliquer la population villageoise dans la production
- d'aider à l'installation d'autres cultures.

### **Fonctionnement de l'association**

#### Contrat entre Liber'Terre et Azayra Nafanta

Il existe un contrat entre les associations Liber'Terre et Azayra Nafanta. Il engage Azayra Nafanta à former au moins trois bénévoles à la gestion technique et pratique d'une culture, moyennant le financement par Liber'Terre de 2 salaires de techniciens déjà formés (env 105€ / mois). Le contrat prendra fin sur décision de Liber'Terre et des 2 techniciens, lorsque ces trois personnes seront jugées aptes et que la surface de culture sera suffisante pour une autonomie complète de la ferme. L'objectif du projet sera atteint lorsque l'autonomie financière sera réalisée.

#### Ressources

- 2 techniciens salariés viennent quotidiennement à tour de rôle pour récolter et entretenir la culture.
- Le bureau exécutif de Azayra Nafanta a pour mission de vérifier les jours travaillés des algoculteurs, les recettes, les dépenses et le matériel.

#### Fonctionnement

Elle organise la présence quotidienne d'au moins trois paysans volontaires pour la récolte (environ 1 h 30 de travail) ainsi qu'un roulement pour assurer l'agitation des bassins (tous les jours de 12 à 16 h).

Le poids total de la récolte journalière est divisé en deux parties égales. Une moitié est partagée entre les paysans venus récolter, l'autre moitié est vendue à la population ou à des organismes divers. Le produit de la vente permet l'entretien de la ferme.

### **Distribution de la spiruline**

- Possibilité pour les paysans membres de consommer de la spiruline fraîche ou de la faire sécher sur des séchoirs solaires mis à disposition par l'association.
- Le prix de vente de la spiruline sèche pour les villageois est fixé à 250 F CFA (soit 0,38 €) les 25 grammes
- Le prix de vente de la spiruline sèche pour les organismes tels les ONG, associations, hôpitaux, Centres de Santé est fixé à 500 F CFA (soit 0,76 €) les 25 grammes.
- Il existe un dépôt vente de spiruline à Gao et l'hôpital de brousse pour nomades, situé sur la commune de Gossi à 120 km de Gao s'est proposé comme client

Une nouvelle intervention sur une radio locale nous a permis d'étendre notre campagne de sensibilisation sur les vertus de l'algue

### **Prospectives**

En mars de cette année, Liber'Terre a financé un nouveau bassin de 20 m<sup>2</sup>. C'est un bassin en ciment construit par un maçon du village. La couverture est composée d'une armature métallique comprenant des cadres mobiles permettant une bonne protection de la culture contre les intempéries. Un nouveau séchoir solaire métallique, plus important que l'ancien en bois, sera également construit. Il sera directement encastré dans le local, l'ouverture étant à l'intérieur, ce qui permettra de ne pas sortir la spiruline fraîchement récoltée lors des grands vents de sable. La spiruline sera séchée désormais sous forme de spaghettis, pour une mise en oeuvre plus rapide.

Tout le matériel nécessaire pour la réalisation de la grande ferme a été réuni durant ce séjour. Ainsi, Azayra Nafanta a toutes les clés pour réussir l'agrandissement.

A la fin de cette seconde étape, la ferme comprendra donc 29 m<sup>2</sup> de culture. Ce qui laisse espérer une récolte d'environ 150 gr de spiruline sèche par jour (soit environ 4,5 kg par mois). Si le résultat est à la hauteur de ses espérances, Liber'Terre s'engage à financer un cinquième bassin de 20 m<sup>2</sup> qui assurera à la ferme une autonomie complète.

Face à la désertification, aux aléas climatiques et économiques, les villageois montrent un intérêt réel à vouloir sauvegarder cette culture. Ce petit projet commence à faire parler de lui dans le cercle de Gao jusque dans les bureaux des autorités locales. Un projet solide qui avance à petits pas grâce à toutes les bonnes volontés.

## SPIRULINE HUMANITAIRE AU TOGO

ASSOCIATION SVP

*3 esplanade de la pinède, pavillon 4 – 38 090 Villefontaine 06 82 36 84 28*

---

### **Présentation de l'association Spirale Verte et Partage (SVP)**

Le Wwoof Togo (réseau international de travailleurs bénévoles sur des fermes d'agriculture biologique) et le CERDE (Centre Ecologique de recherche et de démonstration) représenté respectivement par Laurence Villaz et Cédric Coquet, Claude Agbeko, Tona Agbeko, s'unissent en décembre 2003 pour la mise en place de la culture de spiruline dans le village d'Agou Nyogbo (8000 habitants), Togo.

### **Composition de la ferme de spiruline en avril 2004**

- 3 bassins (2m<sup>2</sup>, 4m<sup>2</sup>, 6m<sup>2</sup>) d'une superficie totale de 12m<sup>2</sup>, en parpaings crépis (ciment, sable, sikalite), surmontés d'un toit en structure bois et bâche plastique
- un séchoir solaire pour la spiruline, fruits et légumes.
- un hangar pour le stockage du matériel et les manipulations
- deux balais en fibre végétale pour l'agitation manuelle
- Tona, algoculteur motivé et convaincu, consommateur quotidien

### **De quoi la spiruline a-t-elle besoin ?**

- Pour reconstituer le milieu de vie de la spiruline : sel de mer, eau de cendres
- Pour nourrir la spiruline : jus de clous, urine

#### Le sel

Il se trouve très facilement au marché à un prix accessible aux populations locales (2 kg :500 FCFA).

#### L'eau de cendres

Préparation :

Les femmes utilisent traditionnellement la cendre de cabosse de cacao pour faire du savon. La cendre se trouve donc facilement au village (4 kg = 200 FCFA). On place 4 kg de cendres de cacao dans un panier tressé que l'on dispose au dessus d'une bassine. On passe 25 litres d'eau une première fois sur la cendre, et une deuxième fois (2 à 3 heures). Le jus qui s'écoule est très basique et dangereux. Attention aux projections. Pour le carbonater, soit on le laisse à l'air en faible profondeur avec bullage et/ou agitation pendant plusieurs semaines, soit on ajoute du bicarbonate de soude, 150 g (=400 FCFA) pour les 25 litres d'eau de cendres qui dilués permettront de préparer 125 litres de: milieu de culture.

#### Jus de clous

Préparation :

Une poignée de clous rouillés dans 1 litre de vinaigre (acheté dans la boutique voisine 800 FCFA/l) avec le jus de citron (récolté sur l'arbre de la concession). 10 jours de macération avant de filtrer à l'aide d'une passoire

#### L'urine

La clef de voûte de la culture autonome. L'urine est connue depuis plus de 7 siècles comme un puissant remède. Celle utilisée pour la culture est la première urine du matin des cultivateurs et des enfants de la concession

## Dosages

En phase de croissance	En phase de récolte
Préparation de 30 litres de milieu :	Pour 100 g spiruline fraîche récoltée
Eau de cendre : 6 l	Urine : 300 ml
Sel : 150 g	Sirop de fer : 10 ml
Sirop de fer : 60 ml	
Urine : 450 ml	
Eau : 23,5 l	

Au total, pour remplir les 12 m<sup>2</sup> de bassin à partir de 2l de souche Paracas venue de France, nous avons eu besoin de 2 400 l de milieu de culture

### Coût de la spiruline

#### En phase de dosage

Coût des intrants pour 12 m<sup>2</sup> de bassin (milieu de culture et nourriture)

480 l eau de cendre soit 80 l cendre	: 4 000 FCFA
12kg sel	: 3 000 FCFA
4,8 l vinaigre	: 3 800 FCFA
36 l urine	: gratuit
soit	: 10 800 FCFA soit 16 €

#### En phase de récolte

Coût de revient pour produire 1 kg spiruline sèche (soit 5 kg spiruline fraîche)

- Bassins, investissements et intrants de départ : amortis par le don de SVP (180 000 FCFA soit 270 € pour les 12 m<sup>2</sup>) et le travail de Tona offert
- Pour 5 kg de spiruline fraîche il faut 400 FCFA soit 0,60€, coût pour 500 ml de vinaigre. Les clous rouillés, le citron, urine et le temps de travail sont offerts.

Donc, l'investissement pour 1 kg spiruline sèche égale 0,60€ + courage + tisane du soir

### Objectif

Maintenir une population démunie (vivant avec moins de 1 dollar / jour) en bonne santé avec de faibles moyens.

Pour cela nous proposons :

- une dose de spiruline (5 g) à 50 FCFA (soit 15€ le kg)
- une culture autonome et naturelle à très bas coût d'intrants
- l'exemple de Tona, qui fait tourner la ferme sans fonds extérieurs, et se rémunère grâce aux bénéfices de la vente de la spiruline



Vue de la ferme de spiruline (mars 2004). Les bassins, le séchoir solaire et le hangar avec Laurence et Tona.

LA SPIRULINE POUR TOUS

GILLES PLANCHON

Association les Idées Bleues



At last, here is the Manual on Spirulina for which all of us have been waiting. There have been more than 20 books, more than 100 theses, and thousands of scientific articles written about Spirulina - most of them so scientifically "heavy" that the non-specialized reader is quickly discouraged from reading and finds himself increasingly confused about what Spirulina is, what it can do for us, and how to grow it.

La Spiruline pour Tous - Culture Familiale, by Gilles Planchon and Charito Fuentes presents a wealth of information on Spirulina production in a manner that makes you feel as though you have gone through all the motions yourself. The text is simple and clear, and it is illustrated profusely with such charming and frankly very clever drawings that you won't be able to put the book down until you've finished it. By then you'll be confident that you, too, can grow Spirulina.

Rupley D. Fox

15-5-3



# FORMATION ET SYNTHESE



# LA FORMATION A LA PRODUCTION ARTISANALE DE SPIRULINE DANS UN CENTRE DE FORMATION DEPARTEMENTAL DU MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE –FRANCE

GILLES GRILLET ET CLAUDE VILLARD

*Ministère de l'Agriculture et de la Pêche CFPPA 32, chemin St Lazare, 83400 Hyères France  
[cfppa.hyeres@educagri.fr](mailto:cfppa.hyeres@educagri.fr), Web : [cfppa.hyeres.free.fr](http://cfppa.hyeres.free.fr)*

---

## **Etapes fondamentales de la création d'une nouvelle filière**

### Fin 2001:

- "Rencontre" avec Monsieur VILLARD Claude qui nous présente une étude qu'il a menée au Lycée Agricole de Mayotte concernant le bio gaz.
- "La spiruline" Puis il nous fait découvrir une micro algue, appelée spiruline qui est aussi nourrissante que facile à produire.
- "Expérimentation ?" Afin de démontrer ses propos, il nous propose de réaliser une expérimentation sous serre dans l'enceinte de l'établissement. Mais pour y parvenir le CFPPA à besoin d'une convention de coopération !

### Début 2002:

- "Une convention" est signée entre TECHNAP et le CFPPA Agricampus.
- "Le premier objectif expérimental": mise en place d'un bassin de production de spiruline sous serre en zone littorale.

### Juin 2002:

- "Colloque International" à Mialet (Gard) sur la production de spiruline artisanale.
- "Constat du CFPPA": cette activité apparaît comme très empirique ce qui implique un besoin d'organisation notamment au niveau de la formation.
- "Proposition" De ce fait, nous avons proposé à l'ensemble de la profession d'écrire un référentiel métier qui formalisera leurs besoins en terme de formation et accrédi tera leur actions.

### Mai 2003:

Naissance du Certificat Professionnel, spécialité d'initiative locale "Production artisanale de spiruline à vocation humanitaire" écrit et validé par un établissement du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, après un consensus de la majorité des représentants professionnels.

### Début 2004:

- Création d'une nouvelle filière internationale qui a pour but de former en plusieurs langues des stagiaires provenant du monde entier.
- la première formation » est mise en place au CFPPA de Hyères France.

## **Maintenant le centre dispose**

- d'un outil de production opérationnel,
- d'un laboratoire spécialisé en algoculture dans la recherche appliquée aux techniques artisanales associées aux énergies renouvelables,
- d'un certificat public opérationnel,
- d'une bibliothèque appropriée "*en cours d'élaboration*" (Donation du Docteur Ripley FOX)



Liberté • Égalité • Fraternité  
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE



MINISTÈRE  
DE L'AGRICULTURE  
ET DE LA PÊCHE

**Certificat Professionnel : "Production artisanale de spiruline à vocation humanitaire"**

OTI 1: À partir des consignes du chef de projet être capable d'assurer la responsabilité complète de son poste de travail, en toute sécurité, les tâches et les travaux liés à la production artisanale de spiruline en s'adaptant au contexte local des pays rencontrés.

OI 1.1 : Etre capable de maîtriser les techniques et les gestes professionnels nécessaire à la réalisation des travaux de mise en culture de la spiruline et au suivi de la production tout en ayant une démarche raisonnée

OI 1.2 : Etre capable de suivre des règles d'hygiène, de sécurité et de respect de l'environnement

OI 13 : Etre capable d'analyser les résultats de production de transmettre des informations et d'orienter la production

OI 1.4 : Etre capable de maîtriser les techniques adaptées de gestion (humaine, comptable, analyse de résultat...) et de commercialisation (commerce équitable...) adaptées à ce type de production

OTI 2 : Etre capable de mobiliser les connaissances scientifiques et techniques nécessaires à la production de spiruline

OI 2.1: Etre capable d'identifier les répercussions du milieu aquatique et du climat sur la production de spiruline

OI 2.2 : Etre capable de mobiliser les connaissances concernant les pratiques culturelles de la spiruline

OTI 3 : Etre capable d'assimiler une éthique dans la démarche humanitaire tout en respectant la législation internationale en vigueur

OI 31 : Etre capable de respecter une démarche éthique

OI 32: Etre capable de maîtriser dans ses grandes lignes la législation internationale se référant à ce type de production

Quelques photos effectuées au CFPPA de Hyères



Construction du bassin



Mise en culture du grand bassin



Nos premiers stagiaires



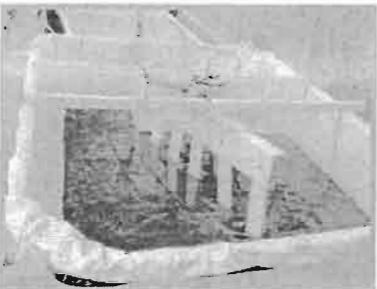
La récolte



une future polytechnicienne



Récolte sur le grand bassin



Système de brassage rotatif



Préparation du milieu de culture



Une partie du labo



La spiruline est extrudée



Le labo



Le séchoir solaire artisanal

## SYNTHESE DU COLLOQUE SUR LES CYANOBACTERIES

LOÏC CHARPY<sup>1</sup>, MARIE JOSE LANGLADE<sup>1</sup>, NARDO VICENTE<sup>2</sup>

<sup>1</sup> IRD, UR099 COM, rue de la Batterie des Lions, 13007 Marseille [lcharpy@com.univ-mrs.fr](mailto:lcharpy@com.univ-mrs.fr)

<sup>2</sup> Aix-Marseille 3, Institut Océanographique Paul Ricard (IOPR) [Nardo.Vicente@univ-u-3mrs.fr](mailto:Nardo.Vicente@univ-u-3mrs.fr)

---

### Contexte

Le groupe des cyanobactéries anciennement appelées algues bleues puis cyanophycées forme l'essentiel des bactéries capables de photosynthèse avec production d'oxygène. Une des caractéristiques des cyanobactéries est qu'elles possèdent des thylakoides, sièges de la photosynthèse, recouverts de granules protéiques associées à une partie pigmentaire, ce qui constitue les phycobiliprotéines. Outre la photosynthèse, ils assurent deux autres fonctions: la respiration et, chez certaines espèces, la fixation de l'azote atmosphérique, propriété qui a fait utiliser certaines Cyanophycées (*Anabaena*, *Nostoc*) comme engrais verts au même titre que les Légumineuses.

Les Spirulines sont des cyanobactéries filamenteuses qui appartiennent au genre *Arthrospira* ou *Spirulina* selon les auteurs. Elles poussent naturellement dans les eaux alcalines de certains lacs de la zone inter-tropicale et sont consommées depuis des siècles par certaines populations.

Dans les années soixante-dix, l'ORSTOM (actuellement IRD) s'est intéressé à la Spiruline à l'occasion d'un programme portant sur les lacs de la région du Kanem (Tchad). Les travaux de A. Iltis sont parmi les premiers à décrire son habitat et sa biologie. Un nutritionniste, F. Delpeuch, a analysé les qualités nutritionnelles de cet organisme.

L'ORSTOM ainsi que d'autres instituts français a abandonné ces recherches dans les années 80. La communauté scientifique internationale et des industriels a pourtant continué à étudier la Spiruline, intéressée par son impressionnante teneur en protéines, ainsi que sa vitesse de croissance, dans des milieux totalement minéraux. Mais les Spirulines sont aussi riches en micronutriments, en bêta-carotène (à partir duquel est formée la vitamine A), en fer, en vitamine B12, en acides gras.

Compte tenu de ses caractéristiques, la culture de la Spiruline pourrait être une solution pour améliorer la santé humaine, la nutrition, notamment celle des pays du Sud et également pour développer des cultures industrielles.

Des ONG utilisent depuis de nombreuses années la Spiruline pour lutter contre la malnutrition sur tous les continents. Par contre, la Spiruline apparaît absente de la stratégie de lutte contre la malnutrition des nutritionnistes français et internationaux (notamment de tous les organismes internationaux des Nations Unies comme l'OMS et l'UNICEF).

De grandes entreprises chinoises, indiennes, chiliennes et américaines se sont déjà lancées dans la culture industrielle de cet organisme.

C'était le moment opportun pour l'IRD et le l'institut Océanographique Paul Ricard (IOPR) de faire un point sur la question : La culture des cyanobactéries (en l'occurrence la Spiruline puisqu'elle est la seule reconnue comme aliment non traditionnel) pour la production de micronutriments est-elle une solution valable pour la santé humaine et le développement des pays du Sud ?

### Déroulement du colloque

#### Date, lieu et financements

Ce colloque était organisé par Loïc Charpy directeur de l'UR099 (Cyano) de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) et Nardo Vicente professeur à l'Université Aix Marseille 3 et directeur scientifique de l'Institut Océanographique Paul Ricard (IOPR). Il s'est déroulé du 3 mai 2004 à 9h au 6 mai à 12h dans la salle Marcel Pagnol sur l'île des Embiez (Var).

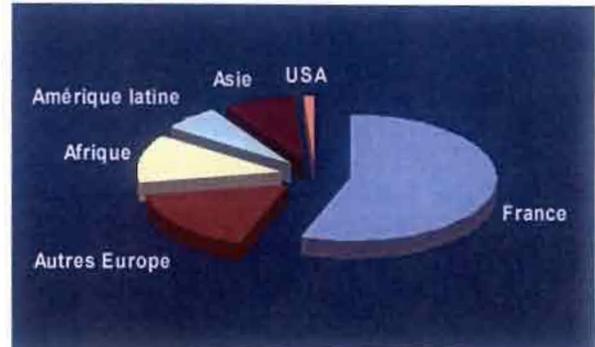
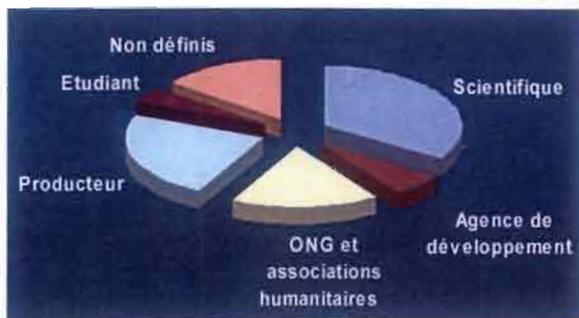
Les financements provenaient de l'IRD, de l'IOPR, de la communauté d'agglomération Toulon Provence Méditerranée, du Conseil Régional Provence Côte d'Azur (PACA) et des droits d'inscription.

#### Les participants

Environ 120 personnes dont près de la moitié d'étrangers ont assisté au colloque. Dix-neuf pays étaient représentés.

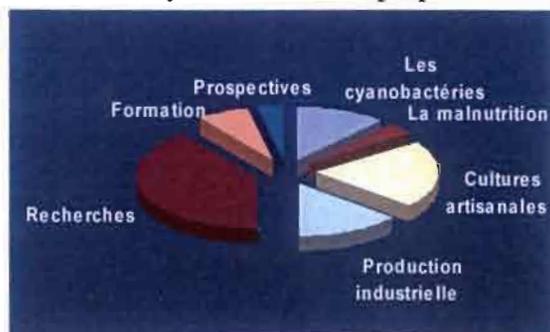
Les participants se répartissaient en :

- Une quarantaine de scientifiques appartenant à 16 laboratoires dont 2 UR de l'IRD (99 et 106) et 4 scientifiques de l'IOPR
- Une dizaine de professionnels de la santé,
- Une vingtaine de membres d'ONG appartenant à 9 ONG,
- Une vingtaine de producteurs déclarés appartenant à une dizaine d'entreprises ou de personnes intéressées par la production commerciale,
- Une dizaine d'étudiants,
- Une vingtaine de personnes sans étiquette déclarée.



### Les thèmes abordés

La très grande majorité des résumés envoyés avant le colloque portaient sur la Spiruline.



Sept thèmes ont été abordés sous forme de 24 communications orales, de 27 affiches, de 4 tables rondes, de présentations de 3 ouvrages et d'un logiciel :

- Les cyanobactéries : systématique, génétique, métabolisme, toxicité
- La malnutrition
- Cultures artisanales
- Production industrielle et semi industrielle
- Exemples de recherches scientifiques sur la Spiruline
- Formation
- Prospectives



Les tables rondes ont porté sur :

- La Spiruline comme outil pour lutter contre la malnutrition des pays du Sud
- La Spiruline comme complément alimentaire pour la santé
- Echange d'expériences sur les procédés de cultures artisanales de Spiruline
- Implications potentielles de l'IRD et de l'IOPR dans le développement

### Synthèse

Quels sont les apports de ce colloque pour la Santé, la Science et le Développement ?

#### Science et santé

##### Le génome de la Spiruline

A. Wilmotte (Belgique) a étudié la diversité génétique de 51 souches d'*Arthrospira* provenant de 4 continents. En utilisant des outils moléculaires, elle arrive à la conclusion que les génotypes sont très conservés et correspondent peut-être à une ou deux espèces génétiques. Cela laisse supposer que le nombre d'espèces du genre est réduit.

Cheng Cai Zhang rapporte les avancées du Beijing Genomics Institute sur le séquençage partiel du génome d'une souche de Spiruline. Les informations génomiques obtenues (95% de l'information) fournissent des données utiles pour une meilleure compréhension du potentiel biotechnologique de cette cyanobactérie.

##### Composition de la Spiruline

La présentation orale d'E. Gaydou (France) et les affiches présentées confirment la richesse de la Spiruline en protéines, micronutriments et autres molécules particulièrement intéressantes pour la santé. E. Gaydou constate que la composition de la Spiruline varie selon la souche et le milieu de croissance.

##### Non toxicité de la Spiruline

La Spiruline n'est pas toxique. En effet, elle ne possède pas les gènes qui assurent la synthèse des toxines de cyanobactéries. Par contre, de nombreuses autres cyanobactéries sont toxiques mais le milieu très alcalin dans lequel pousse la Spiruline, ne leur permet pas de se développer. Aucun cas avéré d'intoxication par la Spiruline n'a été rapporté.

##### Amélioration des systèmes de culture

Des recherches visant à optimiser les systèmes de culture et à les adapter aux pays du Sud en simplifiant la technologie et diminuant les coûts ont été présentés dans différentes communications. Ainsi, l'utilisation de l'eau de mer comme base du milieu de culture a été étudiée dans le sud de Madagascar par T. Jarisoa. Ses résultats montrent que ce type de culture est parfaitement viable et pourrait être utilisé dans des régions côtières à faible ressource en eau douce. H. Ben Ouada (Tunisie) analyse la physiologie de la Spiruline cultivée expérimentalement en eau de mer. Malgré une baisse de la productivité il constate une augmentation de la teneur en  $\beta$ -carotène et phycobiliprotéines. T. Sotiroudīs (Grèce) lance un projet industriel basé sur l'utilisation de l'eau de mer mélangée à des eaux géothermiques pour obtention de phycocyanine.



Au Chili, F. et A. Ayala proposent des systèmes modulaires qui permettent à de petites exploitations de se développer progressivement.

Au Brésil, l'équipe de J. Costa présente un système performant constitué d'un photobioréacteur fermé à récoltes partielles. Cette équipe propose aussi l'utilisation du glucose comme source de carbone pour la Spiruline ainsi qu'une production en bassin ouvert avec ajout de 20 % de milieu de culture Zarrouk. Elle observe aussi que l'éclairage en milieu naturel est préférable à l'éclairage aux UV quelque soit leur longueur d'onde.

En France, J.B. Gros analyse les besoins en minéraux pour la croissance de la Spiruline et suggère un milieu minimum en simplifiant le milieu de Zarrouk.

#### Effet de l'ingestion de Spiruline

De nombreuses expériences présentées concluent à l'effet positif de la Spiruline sur :

- La lutte contre la malnutrition des enfants (Dr Degbey, Niger ; R. Adoukpe, Bénin ; Antenna, Inde), Madagascar (Mme Ravelo) ; Burkina Faso (D. Oudraogo)
- La diminution du cholestérol (J. Costa, Brésil ; Jian-Hong LI, Chine)
- Le renforcement du système immunitaire (A. Belay, USA ; Jian-Hong LI, Chine)
- La réduction du diabète (Jian-Hong LI, Chine)
- La réduction de l'obésité (S. Thomas, Inde)
- L'amélioration des capacités sportives (Dr J.L. Vidalo)

Cependant, beaucoup d'expériences, notamment sur la malnutrition, n'ont pas donné lieu à des publications dans des revues spécialisées. Ceci, en raison des difficultés pour les ONG à publier dans de telles revues et par manque de moyens humains et financiers pour appliquer des protocoles expérimentaux adaptés. La conséquence est le scepticisme des chercheurs nutritionnistes sur l'intérêt de la Spiruline comme moyen de lutte contre la malnutrition et les carences en micronutriments dans les pays en développement.

#### La Spiruline dans la pharmacopée

La Spiruline fait déjà partie de la pharmacopée de plusieurs pays. Plusieurs présentations orales et affiches développent les résultats de la recherche portant sur l'activité bénéfique de certains composants de la Spiruline.

Ainsi, la présentation de A. Belay (USA) rapporte que la Spiruline semble réguler favorablement le système immunitaire en augmentant l'activation macrophage, l'activité des cellules T et l'activité des cellules naturellement destructrices. Il a aussi été démontré que la Spiruline augmente la production de gamma interféron, ce qui peut éventuellement rendre les virus inactifs, que l'eau extraite de la Spiruline avait une activité antivirale contre notamment le virus humain immunodéficient (HIV-1) et le virus simplex de l'herpes (HSV-1). Les polysaccharides sulfatés polyanioniques de la Spiruline sont aussi des candidats potentiels aux microbicides anti-HIV

E. Gaydou (France) fait ressortir l'intérêt biologique relatif aux phycocyanines et alloctanines en raison de leurs propriétés anti-oxydantes. Pour ce qui est de la teneur en vitamines, une douzaine d'entre elles ont été quantifiées. Cet ensemble de résultats est en faveur d'une utilisation de *S. platensis* comme supplément aux aliments en protéines, acides gras essentiels et en vitamines. De nombreux brevets ont été déposés dans ce domaine.

Pour Jian-Hong LI (Chine), les polysaccharides provenant de la Spiruline sont des composants très efficaces. Parmi ses nombreuses fonctions il cite l'amélioration de l'immunité, l'affection directe les cellules non spécialisées hématopoïétiques, l'inhibition du développement des tumeurs et des cellules de Hela.

S. Thomas (Inde) nous a présenté des études sur les animaux qui ont porté sur l'action de la Spiruline sur l'hyperlipidémie, l'hépatotoxicité induite par l'ingestion d'alcool ou les médicaments anti-tuberculose et ses effets anti-stress. Sur le marché local (Inde), plus de 50 compagnies pharmaceutiques assurent la promotion de la Spiruline comme complément de régime.

J. Costa (Brésil) a étudié l'ajout de Spiruline dans l'alimentation des lapins. Il observe une diminution du taux de sérum cholestérol. En outre, il suppose que *S. platensis* a un rôle régulateur au regard de la surexpression de la P-glycoprotéine de cellules tumorales humaines.

#### Autres utilisations de la Spiruline

La Spiruline est utilisée en Asie dans la cosmétique (rouge à lèvres, crayons pour souligner les yeux) et comme colorants alimentaires (chewing-gums, produits laitiers, sorbets et gelées). Les

phycobiliprotéines qui sont impliqués dans cet usage et des expériences d'extraction de ces protéines à partir de la Spiruline ont été réalisées au Brésil par J. Costa.

La Spiruline peut être utilisée pour épurer des eaux usées au Brésil (J. Costa).

Certaines protéines de l'excrétât de Spiruline possèdent une activité bactéricide (L. Trabelsi, Tunisie).

Le médecin J.L. Vidalo (Institut Hippocrate) explique que la structure moléculaire de la phycocyanine présente une structure quasi similaire à l'érythropoïétine, le cœur de l'hémoglobine sanguine humaine. Elle permet à l'organisme de conserver des réserves d'oxygène suffisantes au sein du globule rouge et lui assure un fonctionnement plus "confortable" même dans des situations d'effort intense.

### La Spiruline et le développement

Le développement d'un pays passe par la santé, la formation, et l'amélioration de son économie. Nous avons vu précédemment les recherches portant sur la Spiruline et ses effets bénéfiques sur la santé. Nous posons la question : La culture de la Spiruline peut-elle être un outil pour le développement ?

#### Lutte contre la malnutrition

La lutte contre la malnutrition est logiquement réalisée par les Etats qui s'appuient sur les recommandations d'experts internationaux. Ces experts développent des recherches sur les stratégies d'intervention permettant d'améliorer le statut en micronutriments des populations. Si l'enrichissement d'aliments en micronutriments est une des approches évaluée c'est loin d'être la seule et l'approche alimentaire notamment la diversification visant à la bonne utilisation des disponibilités alimentaires fait aussi partie de leurs préoccupations.

Cependant, les difficultés financières et humaines des états font que des urgences apparaissent et suscitent l'action des ONG. Celles présentes à ce colloque préconisent l'ajout de quelques grammes de Spiruline dans les aliments traditionnels. Cette Spiruline est généralement cultivée au voisinage de dispensaires.

Quelle stratégie choisir ? Assurément la plus efficace. La Spiruline peut-elle être une solution ?

La Spiruline peut être légalement commercialisée comme aliment ou complément alimentaire tant qu'elle est étiquetée correctement et qu'elle ne contient pas de substances contaminées ou altérées (Food Drug Administration, Etats Unis).

Ses avantages sont :

- une production naturelle, locale, à échelle variable, possédant l'essentiel des micronutriments,
- une très bonne conservation du produit une fois séché, sans chaîne de froid.
- Les inconvénients sont :
  - la relative difficulté de la technique de culture d'où nécessité d'une assistance au moins au départ,
  - la difficulté à s'approvisionner en intrants (urée, phosphate, fer) dans certains pays,
  - le coût de la culture.

Des exemples de réussite de culture pérennes ont été rapportés par des ONG dans des camps de réfugiés tibétains (P. Calamand) et dans différents pays d'Afrique (C. Darcas, R. Adoukpé, D. Oudraogo, V. Ravelo). Le prix de revient du Kg de Spiruline varie entre 2 € aux Indes (Madras) et 15 € à Madagascar (Toliara).

L'acceptation de la Spiruline par les humains peut être augmentée en l'utilisant mélangée avec de la nourriture (soupes instantanées, pâtes, dessert chocolatés, gelée, boissons et gâteaux). Ajoutée à une dose de 1g par portion, elle n'altère pas le goût (J. Costa). Cependant, la quantité de micronutriments présents dans 1 g de Spiruline est insuffisante pour le Fer.

Il appartient aux nutritionnistes de répondre à la question posée. En effet, ils ont les moyens d'évaluer les coûts et les effets des programmes de nutrition en prenant en compte les spécificités locales. Notre objectif est d'attirer leur attention sur cet organisme comme candidat potentiel à une stratégie d'amélioration de la nutrition.

#### Formation

La culture de la Spiruline n'est pas traditionnelle et requiert des connaissances donc de la formation. Les différentes échelles de cultures possibles de la Spiruline ont porté la formation à différents

niveaux : par des chimistes et biologistes (JP Jourdan et R Fox), par des ONG à l'intention des personnes sans aucune formation (Idées Bleues, Antenna, Technap, Targuinca), par un paysan producteur (P. Calamand), par un lycée agricole (CFPPA, G. Grillet). Un projet expérimental en Camargue (N. Vicente, IOPR).

Des grands producteurs de pays émergents comme la famille Ayala (Chili) propose une aide technique aux pays du Sud pour développer leur production de Spiruline, dans l'esprit d'une « coopération Sud-Sud ». Toutes ces formations vont élever le niveau des ressortissants du Sud qui pourront transmettre leur savoir faire dans leurs communautés.

#### Développement économique

La culture de Spiruline est particulièrement adaptée aux pays du Sud en raison de son optimum de température de 35°C.

Les systèmes de cultures peuvent être simples (bâches de camion sur des remblais en terre) ou sophistiqués (photobioréacteurs). Les recherches entreprises pour optimiser les cultures devraient permettre de diminuer fortement les coûts.

L'action multipliée des ONG sur le terrain a fait connaître et accepter la culture de la Spiruline à un certain nombre de paysans du Sud, sur tous les continents.

On peut envisager que les productions de Spiruline dans les pays du Sud puissent être exportées vers les pays riches dont les besoins semblent ne pas être satisfaits par la production mondiale actuelle (estimée entre 2000 et 3000 tonnes par an).

#### Conclusions

La Spiruline, de par sa composition (en micronutriments, pigments, vitamines, fer, acides gras essentiels), la biodisponibilité de ces composants, son acceptabilité et sa non toxicité, est utilisable pour l'alimentation humaine et, de fait, depuis longtemps utilisée en tant que telle à petite échelle.

Sa culture, particulièrement adaptée aux conditions climatiques des pays du Sud, est réalisable à plusieurs échelles. Les systèmes de culture peuvent être adaptés aux ressources locales (eau de mer, type d'engrais, degré de technicité, facteur humain). Ces avantages ont incité plusieurs ONG à créer avec succès de nombreuses unités de cultures dans différents continents et à promouvoir la Spiruline.

Son utilisation dans une stratégie de lutte contre la malnutrition est de la responsabilité des gouvernements et des nutritionnistes.

Les exemples de réussite des cultures industrielles réalisées dans des pays émergents (Inde, Chili, Chine) démontrent la faisabilité et la rentabilité de telles entreprises. Les niveaux de technicité requis sont à la portée d'autres pays du Sud. La demande mondiale en Spiruline apparaît en pleine expansion. Toutes les conditions semblent réunies pour que les pays du Sud se lancent dans ce type de production.

Les recommandations qui ont émergé des tables rondes et de la discussion finale sont :

- Continuer les recherches sur :
  - Les composants de la Spiruline, leur extraction et leur biodisponibilité.
  - L'amélioration des systèmes de culture
- Développer la formation
- Promouvoir la coopération Sud-Sud
- Convaincre les nutritionnistes de l'intérêt de la Spiruline, notamment en rédigeant une synthèse bibliographique critique des effets de la spiruline sur la santé et l'état nutritionnel des populations ainsi que sur la faisabilité de sa culture.
- Encourager la culture industrielle dans les pays du Sud



# ADRESSES DES PARTICIPANTS



## LES PARTICIPANTS

NOMS ET COORDONNEES	BRANCHES	PAYS
ADOUNKPÉ ROGER CREDESA BP 1822 COTONOU CREDESA@MAIL.LELAND.BJ ☎ 00 229 34 70 19 📠 00 229 34 70 20 CEL. 00 229 95 70 44	AGENCE DE DEVELOPPEMENT	BÉNIN
AG MAHA ISSOUF ADDS BP 278 AGADEZ TARGUINCA@FREE.FR ☎/ 📠 00 227 44 03 09	ONG ADDS	NIGER
ANCEL PIERRE TECHNAP 80 ALLEE DE LA CHAPELLE 95120 ERMONT P.ANCEL@WANADOO.FR	ONG FERME DE KOUDOUGOU	FRANCE
AYALA ANIBAL SOLARIUM BIOTECHNOLOGY S.A / INYDE S.A. ZEGERS 881-A CP 1200-9 IQUIQUE AAYALAR@TERRA.CL ☎ 5657-414638 / 470866 📠 5657-414351	PRODUCTEUR INDUSTRIELLE	CHILI
AYALA FRANCISCO SOLARIUM BIOTECHNOLOGY S.A ZEGERS 881-A CP 1200-9 IQUIQUE FAYALA@ENTELCHILE.NET	PRODUCTEUR CONSULTANT	CHILI
BELAY AMHA EARTHRISE NUTRITIONALS P.O BOX 270 CALIPATRIA CA 92233ABELAY@EARTHRISE.COM ☎ 760-348-5027 📠 760-348-7258	PRODUCTEUR INDUSTRIELLE	USA
BEN OUADA HATEM INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LA MER CENTRE DE MONASTIR LABORATOIRE DE BIOTECHNOLOGIE BP 59 ROUTE DE KHNISS 5000 MONASTIR HBENOUADA@YAHOO.FR	SCIENTIFIQUE	TUNISIE
BERGER JACQUES IRD UR106 SERVICE CULTUREL AMBASSADE DE FRANCE 57 TRAN HUNG DAO HANOI J.BERGER@FPT.VN	SCIENTIFIQUE	VIETNAM
BILLARD JEAN MICHEL SOCIETE PHYTOSOURCE 16240 COURCÔME	PRODUCTEUR	FRANCE
BOILEAU ETIENNE 7 ALLEE AUX TOURTERELLES 91940 LES ULIS BOILEAUETI@WANADOO.FR ☎ 33 (0)1 69 28 17 26	SCIENTIFIQUE ONG	FRANCE
BONNEFONT JEAN-LUC INSTITUT OcéANOGRAPHIQUE PAUL RICARD ILE DES EMBIEZ 83140 SIX-FOURS-LES-PLAGES JBONNEFONT@FREE.FR ☎ 33 (0)4 94 34 02 49	SCIENTIFIQUE	FRANCE
BROUERS MICHEL CUBIA UNIVERSITY OF LIEGE B22 SART TILMAN 4000 LIEGE M.BROUERS@ULG.AC.BE ☎ 32-4-366 38 07 📠 32-4-366 29 26	SCIENTIFIQUE	BELGIQUE
BRUNE JEAN PIERRE		FRANCE
CALAMAND PHILIPPE CALOS@LAPOSTE.NET CEL : 06 80 84 26 56	PRODUCTEUR	FRANCE
CAZAUBON ARLETTE UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE III FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE SAINT JEROME AVENUE ESCADRILLE NORMANDIE NIEMEN 13397 MARSEILLE CEDEX 20	SCIENTIFIQUE	FRANCE
CHARPY LOÏC IRD UR167 CENTRE OcéANOLOGIQUE MARSEILLE RUE DE LA BATTERIE DES LIONS 13007 MARSEILLE LCHARPY@COM.UNIV- MRS.FR ☎/ 📠 33 (0)4 91 04 16 50	SCIENTIFIQUE	FRANCE
CHOMÉRAT NICOLAS IMEP CNRS UMR6116 - EQUIPE E2CM CASE 31, UNIVERSITE AIX MARSEILLE 3, 13397 MARSEILLE N.CHOMERAT@ORANGE.FR	ETUDIANT	FRANCE
COQUET CEDRIC 3 ESPLANADE DE LA PINEDE PAR.4 38090 VILLEFONTAINE SPIRULINEETPARTAGE@YAHOO.FR	ONG SPIRALE VERTE ET PARTAGE	FRANCE
CORDELIER CHANTAL CHANTAL@CORDELIER.COM ☎ 33 (0)6 88 44 45		FRANCE
COSTA JORGE ALBERTO VIERRA LABORATORY OF BIOCHEMICAL ENGINEERING FEDERAL UNIVERSITY FOUNDATION OF RIO GRANDE PO BOX 474 CEP 96201-900 RIO GRANDE JORGEALBERTOV@AOL.COM DOMJORGE@FURG.BR	SCIENTIFIQUE	BRESIL
COUSNET SÉBASTIEN ASSOCIATION EDUCATION SANTÉ, DAKAR- BUILDING BP 36003 SEBASTIEN.COUSNET@WANADOO.FR	AGENCE DE DEVELOPPEMENT	SENEGAL
CULIOLI GERALD LABORATOIRE MFS UNIVERSITE DU SUD TOULON-VAR AVENUE DE L'UNIVERSITE BP 20132 83957 LA GARDE CEDEX CULIOLI@UNIV-TLN.FR	SCIENTIFIQUE	FRANCE
DARCAS CLAUDE 4 RUE LR BOUVIER 92340 BOURG LA REINE CLAUDE.DARCAS@WANADOO.FR ☎ 33 (0)1 30 56 58 86	ONG TECHNAP	FRANCE
DE KERROS TANNEGUY TANNEGUYDEKERROS.MINITEL.NET		GRECE

DEGBEY HERBERT BP 10895 NIAMEY DEGBEY@INTNET.NE ; TARGUINCA@FREE.FR	AGENCE DE DEVELOPPEMENT CONSULTANT OMS	NIGER
DEGROOTE JACQUES DEGROOTE TECHNOLOGIES 69 RUE DE L'ASSOMPTION 75016 PARIS JDEGROOTE@NETCOURRIER.COM ☎ 33 (0)6 60 40 71	PRODUCTEUR	FRANCE
DEJEANS DELPHINE CRESAL-CNRS 6 RUE BASSE DES RIVES 42000 SAINT- ETIENNE DELPHINE.DEJEANS@ETU.UNIV-LYON3.FR	ETUDIANTE	FRANCE
DELOBEL DOMINIQUE DOMINIQUEDELOBEL@YAHOO.FR	PRODUCTEUR	TUNISIE
DESTINE ANNICK 15 RUE DE L'EGLISE 27950 SAINTE COLOMBE PAR VERNON TARGUINCA@FREE.FR	ONG TARGUINCA	FRANCE
DETIENNE XAVIER CUBIA UNIVERSITY CENTER FOR ALGAL BIOTECHNOLOGY UNIVERSITE DE LIEGE B-4000 LIEGE DETIENNEX@BELGACOM.NET ☎ 32 4-366 38 26 ☎ 32 4-366 29 26	SCIENTIFIQUE	BELGIQUE
DURAND-CHASTEL HUBERT PALAIS DU LUXEMBOURG 15 RUE DE VAUGIRARD 75006 PARIS H.DURAND-CHASTEL@SENAT.FR ☎ 33 (0)1 42 34 34 05 ☎ 33 (0)1 43 54 45 09	SCIENTIFIQUE SENATEUR	FRANCE
FALQUET JACQUES 31 AVENUE AF DUBOIS CH-1217 ANTENNA.GENEVE@WORLDCOM.CH ☎ (41) 22 731 10 34 ☎ (41) 22 731 97 86	SCIENTIFIQUE ONG ANTENNA	SUISSE
FERRON JEAN JACQUES FRANCE LA BIARGERIE 16240 LONGRE JJ.FERRON@WANADOO.FR	PRODUCTEUR	FRANCE
FOX DENISE RIPLEYDFOX@WANADOO.FR ☎ 33 (0)4 67 73 70 60	ONG	FRANCE
FOX RIPLEY 215 ROUTE DE JALAGUIERE 34190 LAROQUE ☎ 33 (0)4 67 73 70 60 RIPLEYFOX@CLUB-INTERNET.FR	ONG	FRANCE
FRANKE HORST IGV LTD D- 14558 BERGHOLT- PESBRIDE H_FRANKE@IGV-GMBH		ALLEMAGNE
FUENTES TORRE MARIA 3 CITE DE LA TOUR 34120 TOURBES LIBGILMCHARITO@YAHOO.COM CEL. 06 11 65 83 70	ONG LES IDEES BLEUES	FRANCE
GALARET ADRIEN	ONG ASSOCIATION LIBER' TERRE	MALI
GASNIER DENIS COFREPECHE BP 7029280 PLOUZANE	SCIENTIFIQUE	FRANCE
GAYDOU EMILE CNRS UMR 6171FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE SAINT JEROME AVENUE ESCADRILLE NORMANDIE NIEMEN 13397 MARSEILLE CEDEX 20 EMILE.GAYDOU@UNIV.U-3MRS.FR	SCIENTIFIQUE	FRANCE
GENOUD ISABELLE 31 AVENUE AF DUBOIS CH- 1217ANTENNA.GENEVE@WORLDCOM.CH ☎ (41) 22 731 10 34 ☎ (41) 22 731 97 86	ONG ANTENNA	SUISSE
GOUEDARD DOMINIQUE SEAFARM L'OUSTALLET RD 213 30170 FRESSAC SEAFARM@WANADOO.FR ☎ ☎ 33 (0)4 66 77 40 69	PRODUCTEUR	FRANCE
GRILLET GILLES MINISTERE AGRICULTURE ET PÊCHE - CFPPA 32 CHEMIN ST LAZARRE 83400 HYERES CFPPA.HYERES@EDUCAGRI.FR ☎ 33 (0)4 94 00 55 55 ☎ 33 (0)4 94 00 55 56	ENSEIGNANT	FRANCE
GROS JEAN BERNARD UNIVERSITE LGCB - UBP BLAISE PASCAL CUST 24 AVENUE DES LANDAIS BP 206 63174 AUBIERE CEDEX GROS@GECBIO.UNIV-BPCLERMONT.FR ☎ 33 (0)4 73 40 74 30 ☎ 33 (0)4 73 40 78 29	SCIENTIFIQUE	FRANCE
GUIGON VINCENT 36 RUE OBERKAMPF 75011 PARIS VINCENT.GUIGON@LIBERTYSURF.FR	ONG	FRANCE
GUILLERET DIANE ANTENNA TECHNOLOGIE 29 RUE DE NEUCHATEL CH - 1201 GENEVE ANTENNA.GENEVE@WORLDCOM.CH	ONG	SUISSE
HALDEMANN FRANÇOIS BIORIGIN SA Z.I, MAISOMEX 1217 MEYRIN FRANCOIS.HALDEMANN@BIORIGIN.CH ☎ (41) 2 27 85 08 07	PRODUCTEUR	SUISSE EQUATEUR
HOURS MICHEL UNIVERSITE PARIS SUD IFR-FR46-SERVICE DE CYTOMETRIE IBAIC BAT 440, 91405 ORSAY MICHEL.HOURS@IBAIC.U- PSUD.FR ☎ 33 (0)1 69 15 64 91	SCIENTIFIQUE	FRANCE
HUANG WAN CHUN XIN-SUN BIO-SCIENCE & TECHNOLOGY CO., LTD HUANG WAN CHUN MIAOZ@NC.IX.CN	PRODUCTEUR SCIENTIFIQUE	CHINE
ISSAHKIAN ELODIE KOILON PRODUCTION EISSAHKIAN@CAMEL.COM	PRODUCTEUR	FRANCE

ITEMAN ISABELLE URA – CNRS 2172 DEPARTEMENT MICROBIOLOGIE FONDAMENTALE ET MEDICALE INSTITUT PASTEUR 28 RUE DU DR ROUX 75724 PARIS CEDEX 15 ISABELLE ITEMAN@PASTEUR.FR	SCIENTIFIQUE	FRANCE
JARISOA TSARAHEVITRA IHSM TULEAR IH-SM B.P 141 TOLIARA 601-MADAGASCAR ☎ (26120)9443552 JERS JARISOA@HOTMAIL.COM	SCIENTIFIQUE	MADAGASCAR
JOURDAN JEAN PAUL 5TER RUE MOQUIN-TANDON 34090 MONTPELLIER JPJOURDAN@ALUM.MIT.EDU ☎ 33 (0)4 67 45 05 57 ☎ 33 (0)4 66 85 02 39	INGENIEUR ONG	FRANCE
KIET PHAM QUOC PARIS QUOC PHAMQUOCKIET@AOL.COM ☎ 33 (0)1 58 34 02 33	SCIENTIFIQUE	FRANCE
LANGLADE MARIE JOSE IRD UR167, COM, RUE DE LA BATTERIE DES LIONS 13007 MARSEILLE LANGLADE@COM.UNIV-MRS.FR ☎ / 33 (0)4 91 04 16 56 ☎ 33 (0)4 91 04 16 35	SCIENTIFIQUE	FRANCE
LAVAL GERALDINE CIDEX 6540 30330 ST ANDRE D'OLERARGUES FRANCE LAVALGERALDINE@AOL.COM	PRODUCTEUR	FRANCE
LEDOUJET BERNARD		FRANCE
LEGRAIN BENOÎT CIDEX 6540 30330 ST ANDRE D'OLERARGUES BLEGRAIN@HOTMAIL.COM		FRANCE
LELIEVRE CEDRIC		FRANCE
LI JIANG-HONG LIFE SCIENCE COLLEGE NANJING NORMAL UNIVERSITY 210097 NANJING LJIANHONG@PINE.NJNU.EDU.CN , JILI6308@PUBLIC1.PTT.JS.CN	SCIENTIFIQUE	CHINE
LIGNON OLIVIER SOCIETE MICROALGUES PROVENCE ROUTE DU CHEVALET 05700 ORPIERRE PROVENCE.SPIRULINE@FREE.FR ☎ 33 (0)4 92 66 31 40 ☎ 33 (0)4 92 66 30 39	PRODUCTEUR	FRANCE
MANINI ALESSANDRO AMANINI@ROME.COM ☎ / ☎ 39 02 334 975 32	AGENCE DE DEVELOPPEMENT	ITALIE
MARNIER PIERRE ANDRE MARNIER.PIERRE@WANADOO.FR		FRANCE
MARTIN YVAN INSTITUT OCEANOGRAPHIQUE PAUL RICARD ÎLE DES EMBIEZ 83140 SIX-FOURS-LES-PLAGES YMARTIN@INSTITUT-PAUL-RICARD.ORG ☎ 33 (0)4 94 88 05 31 ☎ 33 (0)4 94 74 56 55	SCIENTIFIQUE	FRANCE
MATHIEU ALAIN ☎ / ☎ 33 (0)1 30 52 17 30		FRANCE
MAURICE JEAN-LOUIS 39 RUE PIERRE CURIE 47520 LEPASSAGE MAURICEJL@MAC.COM ☎ 33 (0)5 53 47 45 52 CEL.06 08 94 79 44	PRODUCTEUR	FRANCE
MIAO JIAN REN JIANG XI PROVINCIAL SCIENCES & TECHNOLOGIES COMMISSION 44 SHI-DA RD SOUTH NANCHANG CITY 330046 JIAN XI PROVINCE MJR_ALGAE@HOTMAIL.COM ☎ / ☎ 0086-791-8508009	SCIENTIFIQUE	CHINE
MIN THEIN	PRODUCTEUR	CHINE
MINET PIERRE CIP INSTITUTE OF CHEMISTRY B6 UNIVERSITY OF LIEGE B-4000 LIEGE P.MINET@STUDENT.ULG.AC.BE	ETUDIANT	BELGIQUE
NERANTZIS ELIAS TECHNOLOGICAL INSTITUTE OF ATHENS LABORATORY OF BIOTECHNOLOGY AG, SPYRIDONONA STREET AEGALEO ATHENS 12210 ENERAT@TEIATH.GR	SCIENTIFIQUE	GRECE
OREAL HENRI		FRANCE
OUDRAOGO DENISE FERME DE SPIRULINE BP 34 KOUDOUGOU SITE : HTTP:// WWW.SPIRULINEBURKINA.ORG OKDSKDG@FASONET.BF	PRODUCTEUR	BURKINA FASSO
PALANGIE NICOLAS SOLVAY, SBU SODA ASH AND DERIVATIVES VIA VARESINA 2/4 21021 ANGERA (VA) NICOLAS.PALANGIE@SOLVAY.COM ☎ (39) 0331 939 612 ☎ (39) 0331 960 168 CEL. (39) 348 0433 703	PRODUCTEUR	ITALIE
PASCAL JEAN PHILIPPE SOLVAY, CENTRE D'ETUDES ET DE RECHERCHES 2, RUE GABRIEL PERI 54110 DOMBASLE S/ MEURTHE PHILIPPE.PASCAL@SOLVAY.COM ☎ 33 (0)3 83 18 56 71	SCIENTIFIQUE	FRANCE
PASCAUD MARC MARCPASCAUD@WANADOO.FR ☎ 33 (0)1 45 47 72 61	SCIENTIFIQUE	FRANCE
PLANCHON GILLES 3 CITE DE LA TOUR 34120 TOURBES LIBGILMCHARITO@YAHOO.COM ☎ 06 11 65 83 70	ONG LES IDEES BLEUES	FRANCE
QIU DEYI MAOYUAN BUILDING 14 BAOAN RD. SHENZHEN 518008 DEYI QIUDEYI@SOHU.COM ☎ (86) 755 25583710 ☎ (86) 755 25573277	PRODUCTEUR	CHINA

RAKOTOARISOA RIJA CENTRE D'ETUDES DES RESSOURCES ANIMALES MARINES (CERAM) FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE SAINT JEROME 13397-MARSEILLE CEDEX 20	ETUDIANT	FRANCE
RAKOTOMANANA JEAN-LÉON JLRAKOTO@YAHOO.FR	COMMERCE	FRANCE
RIVA ALAIN INSTITUT OCEANOGRAPHIQUE PAUL RICARD ÎLE DES EMBIEZ 83140 SIX-FOURS-LES-PLAGES ARIVA@INSTITUT-PAUL-RICARD.ORG ☎ 33 (0)4 94 34 02 49 ☎ 33 (0)4 94 74 56 55	SCIENTIFIQUE	FRANCE
SEBASTIAN THOMAS PARRY NUTRACEUTICALS LTD PARRY HOUSE 5 <sup>TH</sup> FLOOR 43 MOORE STREET CHENNA I 600 001 SEBASTIANT@PALMURUGAPPA.COM	PRODUCTEUR	INDE
SOTIROUDIS THEODORE INSTITUTE OF BIOLOGICAL RESEARCH AND BIOTECHNOLOGY 48 VASSILEOS CONSTANTINOU AVENUE ATHENS 116 35 TSOTIR@EIE.GR	SCIENTIFIQUE	GRECE
STORNI MONICA LABORATORIO DE FISILOGIA VEGETAL Y BIOLOGIA DE CYANOBACTERIA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES INT. GUIRALDES 2620, PAB II LAB N°2 C1428EAH BUENO AIRES CYANOB@BG.FCEN.UBA.AR	SCIENTIFIQUE	ARGENTINE
TRABELSI LAMIA INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LA MER CENTRE DE MONASTIR LABORATOIRE DE BIOTECHNOLOGIE BP 59 ROUTE DE KHNISS 5000 MONASTIR TRABELSILAMIA@YAHOO.FR	SCIENTIFIQUE	TUNISIE
VEULLET REMI 09600 DUN REMIJOINTCOM@TISCALI.FR		FRANCE
VICENTE NARDO INSTITUT OCEANOGRAPHIQUE PAUL RICARD ÎLE DES EMBIEZ 83140 SIX-FOURS-LES-PLAGES NARDO.VICENTE@UNIV.U-3MRS.FR	SCIENTIFIQUE	FRANCE
VIDALO JEAN LOUIS INSTITUT HIPPOCAMPE S.A 37 A, RUE JACQUES DALPHIN CH - 1227 GENEVE ☎ (41) 022 343 83 40 ☎ (41) 022 343 83 48	SCIENTIFIQUE	SUISSE
VILLARD CLAUDE CFPPA 32 CHEMIN ST LAZARRE 83400 HYERES VILLARDCL@AOL.COM ☎ (33) 04.94.00.55.55 ☎ (33) 04.94.00.55.56	ONG CESRI ISP TECHNAP CFPPA-HYERES	FRANCE
VILLAZ LAURENCE3 ESPLANADE DE LA PINEDE PAVILLON 4 38090 VILLEFONTAINE ☎ (33) 06.82.36.84.28	ONG SPIRALE VERTE ET PARTAGE (TOGO)	FRANCE
VOLOLONAVALONA RAVELO INSTITUT HALIEUTIQUE ET DES SCIENCES MARINES B.P 141 UNIVERSITE DE TOLIARA AQUA-LAB@MALAGASY.COM	SCIENTIFIQUE	MADAGASCAR
VON DER WEID DENIS ANTENNA TECHNOLOGIES, 29 RUE DE NEUCHATEL, CH 1201 GENÈVE ANTENNA.GENEVE@WORLDCOM.CH ☎ (41) 22 731 10 34 ☎ (41) 22 731 97 86	ONG ANTENNA TECHNOLOGIES	SUISSE
WALLON JEAN CLAUDE 23 RUE PHILIBERT DELORME 75017 PARIS JCWALLON@CLUB-INTERNET.FR	ONG CODEGAZ BURKINA FASSO NIGER	FRANCE
WEN YONG HUANG DONGGUANG DONG HU BIOTECHNOLOGY CO., LTD 6/F MAOYUAN BUILDING 14 BAOAN ROAD SHENZHEN 518008 YHWEN@PUBLIC.SZONLINE.NET	PRODUCTEUR	CHINE
WILMOTTE ANNICK CIP INSTITUTE OF CHEMISTRY B6 UNIVERSITE DE LIEGE B-4000 LIEGE AWILMOTTE@ULG.AC.BE ☎ (32) 4 366 38 56 ☎ (32) 4 366 33 64	SCIENTIFIQUE	BELGIQUE
ZACCARÒ MARÍA CRISTINA LABORATORIO DE FISILOGIA VEGETAL Y BIOLOGIA DE CYANOBACTERIA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES INT. GUIRALDES 2620, PAB II LAB N C1428 EAH BUENO AIRES CYANOB@BG.FCEN.UBA.AR	SCIENTIFIQUE	ARGENTINE
ZAFFERANI NERINA AMANINI@ROME.COM ☎/☎ (39) 02 334 975 32		ITALIE
ZHANG CHENG-CAI LABORATOIRE DE CHIMIE BACTERIENNE CNRS 31 CHEMIN JOSEPH AIGUIER 13402 MRSEILLE CEDEX 20 CCZHANG@IBSM.CNRS-MRS.FR	SCIENTIFIQUE	FRANCE
ZULPA GLORIA LABORATORIO DE FISILOGIA VEGETAL Y BIOLOGIA DE CYANOBACTERIA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES INT. GUIRALDES 2620, PAB II LAB N C1428 EAH BUENO AIRES		ARGENTINE

# Marine Life

This journal was published under the name "Vie Marine" from 1979 to 1991 (N° 1 to 11)

## Management, Exploitation and Protection of the sea and marine living resources

*Marine Life* publishes fundamental and applied research articles in the following fields:

- marine biology and ecology, marine chemistry and biochemistry, relating to the life of organisms, population dynamics or biogeochemical cycles;
- multidisciplinary studies, systems analysis and metabolisms or process modelling;
- living resources management, ecotoxicology and marine pollution studies.

The publication focuses mainly on the Mediterranean Sea, but also deals with marine environments that are ecologically related: lagoons, coastal areas and also the effects of anthropogenic impacts on these ecosystems.

*Marine Life* publishes original papers, reviews, short reports and technical notes. Personal comments, book reviews, announcements and conference or meeting proceedings are also considered by the publishers. All papers published are reviewed by an international board.

La revue *Marine Life* publie des travaux relatifs à la recherche fondamentale et appliquée concernant :

- la biologie et l'écologie marines, la biochimie et la chimie marines, en relation avec la vie des organismes, des populations ou les cycles biogéochimiques ;
- les études pluridisciplinaires, les analyses de systèmes et la modélisation des métabolismes ou des processus ;
- la gestion et la valorisation des ressources vivantes, ainsi que l'écotoxicologie et la pollution du milieu marin.

La revue s'intéresse principalement à la Méditerranée, mais également aux autres mers écologiquement apparentées, aux lagunes, aux secteurs littoraux de même qu'aux agressions qui s'y manifestent. Elle accepte des articles originaux, des revues de synthèse, des notes brèves, des notes techniques ; on y trouve aussi des commentaires, des points de vue, des analyses d'ouvrages, des annonces, ainsi que des comptes rendus de colloques ou de congrès. Les manuscrits sont soumis à un comité de lecture international.

## Editorial advisory board

Lucien LAUBIER, Directeur du Centre d'Océanologie de Marseille,  
membre correspondant de l'Académie des Sciences. *Chairman*.

Jeanne CASTRITSI-CATHARIOS, University of Athens (Greece).

Marta ESTRADA, Instituto de ciencias del mar, Barcelona (Spain).

Patrice FRANCOUR, Université de Nice-Sophia Antipolis (France)

Bella GALIL, Israel oceanographic and limnological research Ltd., Haïfa (Israël).

Yvan MARTIN, Institut océanographique Paul Ricard, Six-Fours-les-Plages (France).

Giulio RELINI, Università di Genova (Italy).

Nardo VICENTE, Université d'Aix-Marseille 3 (France).

Jeanne ZAOUALI, Institut national agronomique, Tunis (Tunisia).

---

Publishing editor: Patricia RICARD Editors: Christian FRASSON, Patrick LELONG

En couverture : Gorgones rouges (*Paramuricea clavata*) et serran petite chèvre (*Serranus cabrilla*). Ph. Marc Fermon.

On the front page: Purple gorgonian (*Paramuricea clavata*) and comber (*Serranus cabrilla*). Ph. Marc Fermon.

Papers published in *Marine Life* are listed or analyzed in: A.S.F.A. (*Cambridge scientific abstracts*),  
*Institute of scientific information. Base Pascal de l'INIST/CNRS.*

## SUBSCRIPTIONS

Abonnement annuel (deux fascicules), frais d'expédition compris. / *Annual subscription rate (two issues); this rate includes postal charges: 68,60 €.*

*Payment to the / Règlement à :* Institut océanographique Paul Ricard.

*By cheque or postal transfer, account / Par chèque ou chèque postal n° C.C.P. Marseille 4981-99.*

Publisher : Institut océanographique Paul Ricard - BP 308 - F 13309 Marseille cedex 14

Phone : + 33 4 94 34 02 49 - Fax : + 33 4 94 74 46 45

mél : embiez@institut-paul-ricard.org - Internet : www.institut-paul-ricard.org

ISSN : 1168-3430

# COLLOQUE INTERNATIONAL SUR LES CYANOBACTÉRIES POUR LA SANTÉ, LA SCIENCE ET LE DÉVELOPPEMENT

Île des Embiez – 3-6 mai 2004

Le groupe des cyanobactéries anciennement appelées algues bleues puis cyanophycées forme l'essentiel des bactéries capables de photosynthèse avec production d'oxygène. Les Spirulines sont des cyanobactéries filamenteuses qui appartiennent au genre *Arthrospira* ou *Spirulina* selon les auteurs. Elles poussent naturellement dans les eaux alcalines de certains lacs de la zone inter-tropicale et sont consommées depuis des siècles par certaines populations. Des ONG utilisent depuis de nombreuses années la Spiruline pour lutter contre la malnutrition sur tous les continents. Par contre, la Spiruline apparaît absente de la stratégie de lutte contre la malnutrition des nutritionnistes français et internationaux (notamment de tous les organismes internationaux des Nations Unies comme l'OMS et l'UNICEF). C'était le moment opportun pour l'IRD et l'Institut océanographique Paul Ricard de faire un point sur la question : La culture des cyanobactéries (en l'occurrence la Spiruline puisqu'elle est la seule reconnue comme aliment non traditionnel) pour la production de micronutriments est-elle une solution valable pour la santé humaine et le développement des pays du Sud ?

Scientifiques, Producteurs et ONG, originaires de vingt pays, ont débattu sur ce sujet.

**IRD**  
**[UR Cyanobactéries]**

Centre d'Océanologie de Marseille  
Chemin de la Batterie des lions  
F - 13007 MARSEILLE  
Tél. : +33 (0)4 91 04 16 00  
[www.com.univ-mrs.fr/IRD](http://www.com.univ-mrs.fr/IRD)

**IRD**  
**[siège social]**

209, rue Lafayette  
F - 75480 PARIS Cedex 10  
Tél. : +33 (0)1 48 03 77 77  
Fax : +33 (0)1 48 03 08 29  
[www.ird.fr](http://www.ird.fr)

**Institut océanographique  
Paul Ricard**

Île des Embiez  
F - 83140 Six-Fours-les-Plages  
Tél. : +33 (0)4 94 34 02 49  
Fax : +33 (0)4 94 74 46 45  
Mél : [embiez@institut-paul-ricard.org](mailto:embiez@institut-paul-ricard.org)  
[www.institut-paul-ricard.org](http://www.institut-paul-ricard.org)