



CULTURE ET PRODUCTION DE *SPIRULINA PLATENSIS* DANS LES EAUX USEES DOMESTIQUES

**OULD BELLAHCEN T.¹, BOUCHABCHOUB A.¹, MASSOUI M.,
EL YACHIOUI M.²**

¹Laboratoire de biochimie générale et de biologie moléculaire, Institut Agronomique et vétérinaire Hassan II, B.P.6202, Rabat, Maroc.

²U.F.R d'Agro -ressources et chimie fine, Laboratoire de biotechnologie microbienne, faculté des sciences, B.P.133, Kenitra, Maroc.

bellahcentouria@hotmail.com

RESUME

La production de *Spirulina Platensis* sur un milieu de culture synthétique (milieu zarrouk) est très coûteuse vu les exigences trop élevées en éléments minéraux de cette algue. Ainsi, il est nécessaire de rechercher d'autres substrats de culture permettant de produire cette cyanobactérie massivement et à bas prix. Les eaux usées domestiques peuvent constituer un bon substrat qui permettrait d'éviter l'apport coûteux en engrais artificiels grâce à leur richesse en éléments fertilisants. Après des essais au laboratoire, nous avons démontré que la culture de *Spirulina* sur des eaux usées domestiques est possible à condition que ces eaux soient clarifiées par traitement aérobique et supplémentées en bicarbonate de sodium, comme source de carbone pour maintenir une alcalinité élevée et en nitrate de sodium comme source d'azote.

Par ailleurs, les études au laboratoire ont montré que l'addition du chlorure de sodium, pour corriger la salinité, et de sulfate de fer entraîne une amélioration significative de la croissance.

Mots clés : *Spirulina*, eaux usées domestiques, croissance, production, protéines.

ABSTRACT

The production of *Spirulina platensis* in synthetic culture solutions is costly because of the very high requirements in mineral elements of this alga. Thus there is a necessity to research for others substrates giving way to a massive production at low price of this cyanobacteria. Domestic raw sewage could constitute a good substrate, the nutrient inputs can be minimized, thereby effectively lowering the overall production cost. After extensive laboratory and field trials beach and field experiments, it has been possible to adapt *Spirulina* to sewage clarified by aerobic treatment using sodium bicarbonate as a carbon source and also to maintain the high alkalinity required for the satisfactory growth of alga. Addition to the sewage of sodium nitrate as nitrogen source has also been found. Beside studies in laboratories have demonstrated that the addition of sodium chloride to correct the salinity and of iron sulfate result in a significant improvement of the growth.

Keywords : *Spirulina*, domestic sewage, growth, production.

INTRODUCTION

Depuis une trentaine d'années, le domaine de l'aquaculture des algues a été largement développé. Plusieurs essais de cultures de chlorelles et de scénédemus ont été réalisés dans des installations pilotes (Clement, 1970).

Depuis 1963, l'Institut Français de Pétrole a pu réussir la culture d'une algue bleue connue sous le nom de spiruline qui proliférait naturellement dans les eaux alcalines et riches en sels.

La spiruline est considérée comme une source alimentaire de haute qualité nutritive, en raison notamment de sa haute digestibilité et de sa teneur élevée en protéines (70%) et particulièrement en phycocyanine. Elle présente une composition chimique riche en vitamines (provitamines A, Carotène, vitamine B1) et en acides gras insaturés : acide linoléique et linoléique (Sironval, 1993). De même, de nombreux travaux ont montré que la culture est douée d'une activité thérapeutique importante notamment dans le traitement du cancer, de certaines infections d'origine microbienne, de la malnutrition protéino-énergétique et pour le renforcement du système immunitaire (Fox, 1994).

A côté de ses nombreux intérêts, cette microalgue a été le sujet de nombreuses études dans plusieurs pays (Saxena, 1981; 1982). Le coût élevé des éléments minéraux utilisés dans les cultures en masse de cette algue reste un problème sérieux et la nécessité d'avoir recours à une source minérale s'impose : les eaux usées domestiques peuvent être une solution adéquate vu leur richesse en éléments minéraux.

Dans le présent travail, nous avons développé une technique pour la production de la *spiruline* dans des eaux usées domestiques.

Cette approche permet de combiner le recyclage des nutriments des eaux usées domestiques avec la production d'une biomasse algale à moyenne valeur ajoutée et de récupérer de l'eau qui peut être recyclé dans la pisciculture ou l'irrigation.

MATERIEL ET METHODES

Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans ce travail est l'algue bleue-verte : *Spirulina Platensis* appartenant à la classe des cyanobactéries (Ripka, 1979), l'ordre des nostocales, famille des oscillatoriacées (Fox, 1986). Cette algue se présente sous forme d'un filament pluricellulaire à forme hélicoïdale (Richmond, 1985). La longueur moyenne du filament comprenant 5 à 7 spires est de 250 µm et le filament spiralé à un diamètre voisin de 10 µm (Clement, 1975).

La souche nous a été aimablement fournie en culture dans des flacons de 250 ml, par le laboratoire de phytobiologie de l'Université de Liège (Belgique).

Conditions de culture

Les cultures de *Spirulina* sont réalisées au laboratoire dans des Erlenmeyer –Mayers d'un litre, maintenues dans des conditions d'éclairage, de température et de débit d'air identiques. Un éclairage permanent est assuré à l'aide d'une lumière blanche par 4 tubes fluorescents de marque Sylvania et d'une intensité lumineuse de 6000 lux. La température est maintenue à une valeur optimale de 32°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) à l'aide de thermostats réglables. L'agitation des cultures est assurée par barbotage d'air à l'aide de pompes à air et par agitateurs magnétiques.

Les cultures témoins sont réalisées sur milieu synthétique décrit par Zarrouk en 1966. Ce milieu contient tous les éléments nutritifs nécessaires à la croissance de *Spirulina Platensis* à des concentrations bien supérieures aux besoins de l'algue (Zarrouk, 1966)

Milieus de culture à base d'eaux usées domestiques

Au cours de nos essais, l'eau usée domestique utilisée est prélevée de la conduite qui se déverse dans l'oued Bouregreg à hauteur de la localité de Takadoum (Rabat, Maroc). Cette eau usée domestique subit un traitement aérobie par barbotage d'air à l'aide d'une pompe à air, ce qui permet

l'abattement de la charge organique. Cet abattement est évalué par des mesures de la demande chimique en oxygène (D.C.O).

On distingue les milieux expérimentaux suivants :

Un milieu (M_1) constitué d'eau usée domestique brute non traitée ayant une D.C.O. de 727,2 mg d' O_2/l et complétée par les six éléments minéraux suivants : ($NaHCO_3$) = 16,8 g/l, (K_2HPO_4)=0,4 g/l, ($NaNO_3$)= 2,5g/l, (K_2SO_4)=1,08 g/l, ($NaCl$)= 0,7g/l,($FeSO_4$)= 0,006 g/l. Le bicarbonate de sodium constitue la source de carbone, et le nitrate de sodium celle de l'azote.

Des milieux M_2 , M_4 , M_6 et M_8 , constitués d'eaux usées domestiques brutes ramenées à différents niveaux de DCO (250 mg d' O_2/l , 200 mg d' O_2/l , 168,4 mg d' O_2/l , et 100 mg d' O_2/l) respectivement qui correspondent à différentes périodes de traitement aérobique (2, 4, 6 et 8 jours).

Un milieu (M_{10}) formé par l'eau usée traitée pendant une période de 6 jours (DCO de 168,4 mg d' O_2/l) et complétée par les six éléments minéraux du milieu M_1 aux mêmes concentrations.

Ensemencement

Ces milieux expérimentaux ainsi que le milieu synthétique témoin (milieu Zarrouk) sont ajustés à pH = 9 par addition de NaOH (4N), et ensemencés par un culot de spirulines récoltées par filtration à partir d'une culture jeune cultivée sur le milieu de Zarrouk.

Mesure de la croissance

La croissance des Spirulines est suivie par :

La densité optique : mesurée à une longueur d'onde de 560 nm (ZARROUK, 1966), à l'aide d'un spectrophotomètre de type Jenway 6105 U.V.

Le pH : Le pH mesuré quotidiennement par un pH-mètre de type Metrom Hersion E603.

La chlorophylle a : Elle a été déterminée selon la méthode décrite par Pearson (1987) par mesure de densité optique à 663 nm et 750 nm à l'aide d'un spectrophotomètre de type Jenway U.V.

La concentration de la chlorophylle a est déterminée selon la formule suivante :

$$Chl a(\mu / l) = \frac{(DO\ 663nm - DO\ 750nm) \times 106 \times Volume\ du\ solvant\ (ml)}{89 \times Volume\ de\ l'\ echantillon\ (ml)}$$

La DCO a été déterminée selon la méthode décrite par le comité technique de normalisation des eaux (Rodier, 1986).

La détermination des concentrations de l'eau usée domestique en NO_3^- , PO_4^{2-} , Cl^- et HCO_3^- a été effectuée selon les méthodes décrites par Rodier en 1984. Les ions Ca^{++} , Mg^{++} , Na^+ , K^+ et les métaux lourds ont été dosés par spectrophotométrie d'absorption atomique (Varian Techtron 1200).

RESULTATS ET DISCUSSION

Etude de la croissance de *Spirulina platensis* cultivée dans l'eau usée domestique brute

Les cultures de *Spirulina* réalisées sur des eaux usées domestiques brutes (Figure 1) montrent une diminution rapide de la croissance et de la teneur en chlorophylle a qui s'annulent vers le 4^{ème} jour de culture avec une légère augmentation du pH qui se stabilise à 9. Ceci montre sans équivoque que le milieu de culture constitué par l'eau usée domestique brute seul ne constitue pas un bon substrat pour la croissance de l'algue *Spirulina*, on constate que les filaments se décolorent et finissent par être lysés. Deux explications sont possibles, soit que ce milieu présente une déficience en certains éléments minéraux, soit que la forte charge en matières organiques (727,2 mg d'O₂/l) présente une toxicité.

Etude de la croissance de *Spirulina platensis* cultivée dans l'eau usée domestique brute et fortifiée par six éléments minéraux (M₁)

La composition des eaux usées domestiques brutes comparée à celle du milieu de référence, est représenté dans la Tableau 1, qui m'est en évidence sa déficience en six éléments minéraux à savoir CO_3^- , NO_3^- , PO_4^{2-} , Cl^- , Fe^{2+} , et K^+ . Ainsi, nous avons supplémentés à l'eau usée domestique brute en six éléments minéraux (M₁). L'évolution dans le temps de biomasse algale, la teneur en chlorophylle a et du pH montre une faible croissance durant les 6 premiers jours de la culture, puis une augmentation progressive. Mais, cette croissance reste toujours faible par rapport à celle du milieu de référence (Mz) (Figure2).

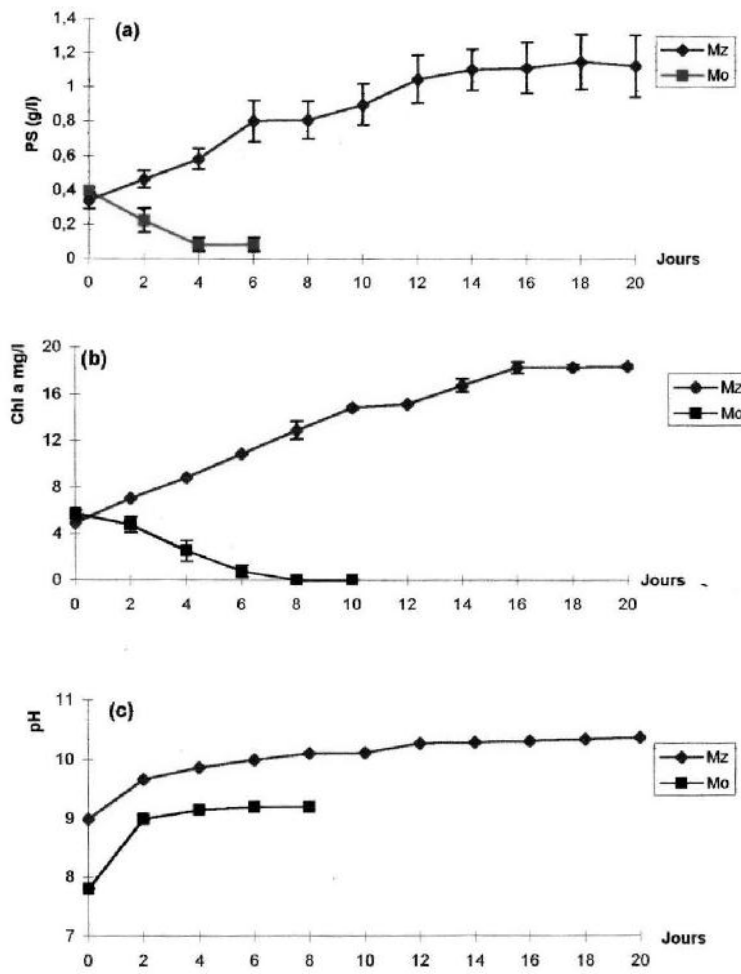


Figure 1 : Evolution de la croissance de la teneur en chlorophylle a et du pH dans les milieux M_0 et M_z . M_z : milieu synthétique zarrouk (témoin). M_0 : Eau usée domestique brute

Tableau 1 : Comparaison de la qualité physico-chimique de l'eau usée domestique brute, avec celle du milieu témoin (Milieu Zarrouk).

Eléments	Eau usée brute Milieu M ₀	Milieu ZARROUK (Témoin, M ₂)	Les marges selon le milieu Zarrouk
pH	7,7	8,3	
DCO (mg d'O ₂ /L)	727.5		
Alcalinité CO ₃ ²⁻ HCO ₃ ⁻ NaHCO ₃	0 549 755,42	12 000 12 203 16 800	
Salinité Cl ⁻ NaCl	246,73 406.58	632,648 1 000	(32 +)
Cations (mg/L) Na ⁺ K ⁺ Ca ²⁺ Mg ²⁺	154,33 30,11 23,91 82,65	5 675,28 763,10 14,40 19,70	0,1 <K/Na 5 [10,4 – 5200] [3,6 – 21,6] [2 – 20]
Anions(mg/l) NO ₃ ⁻ N-NP ³⁻ PO ₄ ³⁻ P-PO ¹³⁻	1.79 0,40 64,57 21,06	1 893,5 365,57 226,78 84,23	[132 – 1237] [10- 93]
Métaux lourds (mg/L) Pb Cd Cr Ni Co Mn Cu Zn Fe	0,18 0,08 0,05 0,17 0,081 0,15 0,09 0,46 0,83	0 0 0,012 0,01 0,00087 0,61 0,021 0,01 2,01	[1-8]

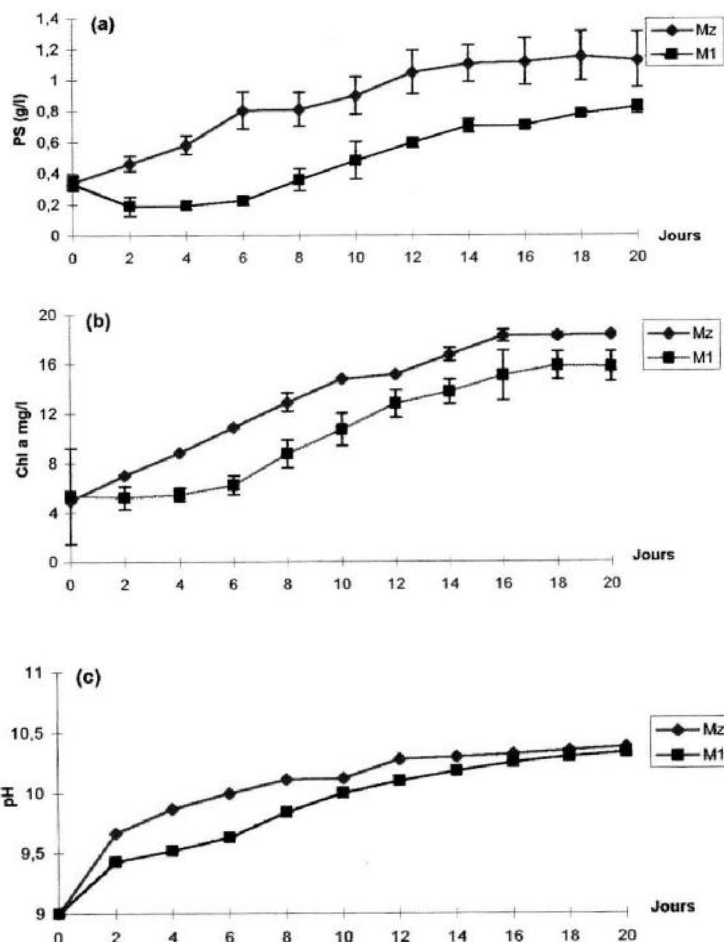


Figure 2 : Evolution de la croissance de la teneur en chlorophylle a et du pH dans les milieux M₁ et M_z. M_z : milieu synthétique zarrouk (témoin). M₁ : Eau usée domestique brute fortifiée par six éléments minéraux

L'analyse de la figure 2a montre que la croissance de la spiruline dans le milieu M₁ suit la même évolution que le milieu de référence (Mz), mais avec une phase de latence de six jours. La teneur en chlorophylle a reste presque stable jusqu'au 6^{ème} jour à partir duquel elle augmente progressivement tout en restant sensiblement plus faible que la culture de référence (Figure 2b). Le pH subit une augmentation mais reste inférieur à celui de la culture de référence, et se stabilise à pH 10 (figure 2c).

L'analyse de ces résultats montre que dans nos conditions de travail, la Spiruline est incapable d'adopter un mode de nutrition mixotrophe. Quoique cette algue soit mentionnée dans la littérature comme étant capable de pousser hétérotrophiquement sur des substrats organiques, elle est considérée

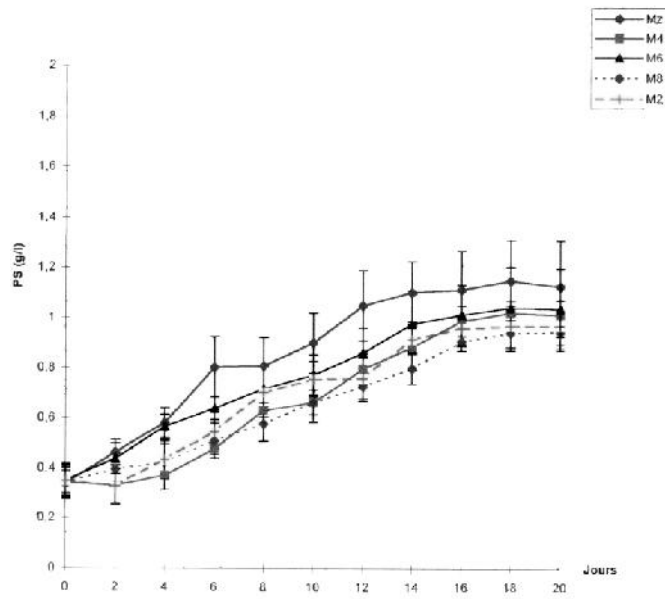
essentiellement comme un organisme photolithotrophe (Fox, 1986, Richmond, 1985). Tout cela laisse penser que l'adaptation de l'eau usée domestique brute à la culture en masse de la spiruline ne se limite pas seulement à une mise à niveau de la partie minérale, comme nous l'avons supposé précédemment, mais probablement aussi à une élimination de la charge organique de l'eau usée domestique. En effet, elle pourrait être à l'origine de la faible croissance de la spiruline dans les eaux usées domestiques brutes supplémentées en six éléments minéraux (figure 2).

Etude de la croissance de *Spirulina platensis* cultivée dans l'eau usée domestique brute traitée et supplémentée par deux éléments minéraux

Durant cette étude, nous avons tenté de déterminer le seuil de tolérance de cette algue à la concentration en matière organique. Ainsi après différents traitements aérobiques des ces eaux usées domestiques, nous avons ajouté uniquement deux éléments minéraux qui sont majeurs et essentiels pour la croissance de *Spirulina* à savoir le bicarbonate de sodium comme source de carbone et le nitrate comme source d'azote.

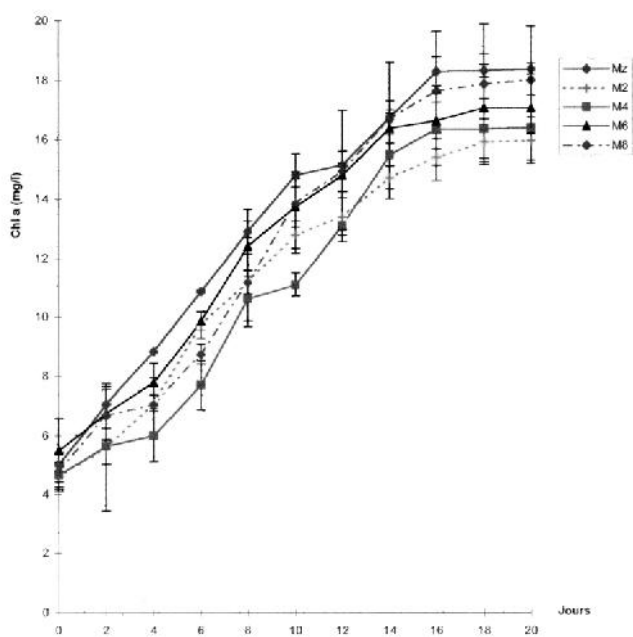
L'examen des courbes (Figure 3-4-5) suggère les remarques suivantes :

- Les différents traitements se traduisent par une augmentation sensible de la qualité du milieu pour la production de *spirulines* sans que l'on puisse déterminer une valeur optimale de la durée, ni atteindre les niveaux de production de milieu de référence. En effet, la culture de spiruline dans le milieu M₆ (DCO 168,4mg d'O₂/L) a montré une croissance et une teneur en chlorophylle a voisine de celle obtenue avec le milieu de référence M_z, par contre dans les milieux M₂ et M₄, la vitesse de croissance est faible par rapport à celle obtenue dans le milieu de référence, ce qui montre que le traitement aérobique de 2 et de 4 jours n'est pas suffisant pour ramener le niveau de la charge organique au niveau supporté par la *Spiruline* (figure 3).
- Le traitement aérobique de l'eau usée à un niveau de DCO très bas (cas du milieu M₈, DCO=100 mg d'O₂/l), favorise le développement de contaminants algaux comme les chlorelles, qui entrent en compétition avec les Spirulines lors de la culture, et altèrent sa croissance. Il est donc à noter que la croissance obtenue dans le milieu M₈ ne reflète pas la croissance de la spiruline seule mais également d'autres algues vertes notamment les chlorelles.
- L'évolution du pH aux cours de la croissance dans les divers milieux testés (figure 5), se manifeste par une augmentation progressive au cours de la période de croissance, à l'exception du milieu M₈, où la variation du pH reste faible. Cette augmentation du pH est due à une diminution du CO₂ du milieu en relation avec l'activité photosynthétique au cours de la croissance de l'algue.



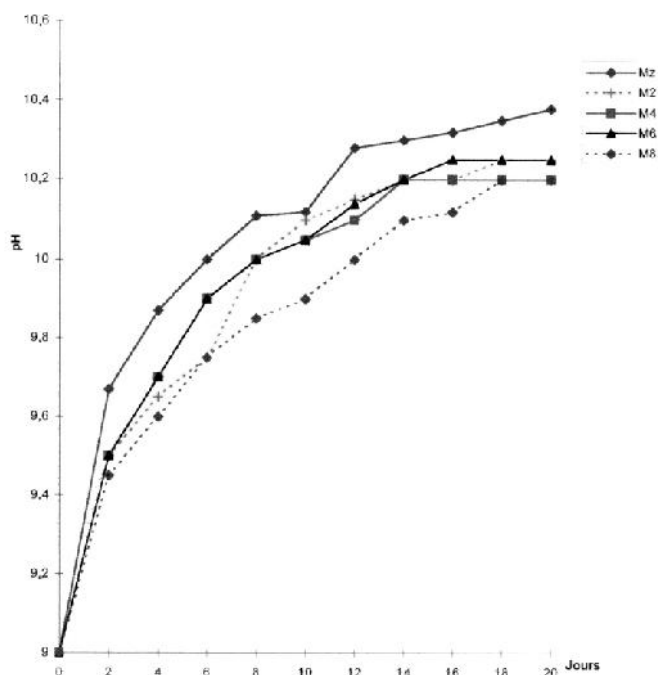
M_z : Milieu synthétique zarrouk (témoin)
M₂ : Eau usée domestique traitée à une DCO de 250 mg O₂/l
M₄ : Eau usée domestique traitée à une DCO de 200 mg O₂/l
M₆ : Eau usée domestique traitée à une DCO de 168,4 mg O₂/l
M₈ : Eau usée domestique traitée à une DCO de 100 mg O₂/l

Figure 3 : Evolution de la croissance dans les milieux M_z, M₂, M₄, M₆ et M₈.



M_z : Milieu synthétique zarrouk (témoin)
M₂ : Eau usée domestique traitée à une DCO de 250 mg O₂/l
M₄ : Eau usée domestique traitée à une DCO de 200 mg O₂/l
M₆ : Eau usée domestique traitée à une DCO de 168,4 mg O₂/l
M₈ : Eau usée domestique traitée à une DCO de 100 mg O₂/l

Figure 4 : Evolution de la teneur en chlorophylle a dans les milieux M_z, M₂, M₄, M₆ et M₈.



M_z : Milieu synthétique zarrouk (témoin)
 M₂ : Eau usée domestique traitée à une DCO de 250 mg O₂/l
 M₄ : Eau usée domestique traitée à une DCO de 200 mg O₂/l
 M₆ : Eau usée domestique traitée à une DCO de 168,4 mg O₂/l
 M₈ : Eau usée domestique traitée à une DCO de 100 mg O₂/l

Figure 5 : Evolution du pH dans les milieux M_z, M₂, M₄, M₆ et M₈.

L'analyse des résultats précités montre nettement que la croissance de *Spirulina* cultivée dans les eaux usées domestiques est sans doute fonction de la concentration en matières organiques. Ainsi, la comparaison des courbes de croissances de l'algue *Spirulina* cultivée sur des eaux usées domestiques ayant différentes concentrations en matières organiques (250 ; 200 ; 168,4 et 100 mg d'O₂/l), montre clairement que l'eau usée domestique ramenée à une D.C.O de 168,4 mg d'O₂/l et enrichie par les deux éléments minéraux majeurs (le bicarbonate de sodium et le nitrate de sodium), constitue un milieu très favorable à la croissance de l'algue *Spirulina*.

Dans le but d'améliorer la croissance de la spiruline cultivée dans le milieu M₆, nous avons analysé et comparé la composition physico-chimique de ce milieu à celle du milieu témoin de référence (Tableau 2). Il s'est avéré que les teneurs du milieu M₆ en potassium, phosphore, chlore et en fer sont également plus faibles. Toutefois, ces teneurs restent comprises dans la marge tolérée par la croissance de *Spirulina*.

Tableau 2 : Comparaison de la qualité physico-chimique de l'eau usée domestique brute traitée à une DCO de 168.4 mg d'O₂/l, avec celle du milieu témoin (milieu Zarrouk).

Eléments	Eau usée traitée aérobiquement (6jours)	Milieu ZARROUK	Les marges selon le milieu Zarrouk
pH	8,10	8,3	
DCO (mg O ₂ /L)	168,40		
Alcalinité CO ₃ ²⁻	84	12 000	
HCO ₃ ⁻	195,20	12 203	
NaHCO ₃	268,74	16 800	
Salinité(mg/l) Cl ⁻	266,25	632,648	
NaCL	438,75	1 000	(32 +)
Cations (mg/L) Na ⁺	174,57	5 675,28	0,1<K/Na 5
K ⁺	14,05	763,1	[10,4 – 5 200]
Ca ²⁺	22,63	14,4	[3,6 – 21,6]
Mg ²⁺	91,16	19,7	[2 – 20]
Anions(mg/l) NO ₃ ⁻	1,79	1 893,5	[132 – 1 237]
N-NP ³⁻	0,40	365,57	
PO ₄ ³⁻	64,57	226,78	[10- 93]
P-PO ¹³⁻	21,06	84,23	
Métaux lourds (mg/L)	0,18	0	
Pb	0,08	0	
Cd	0,05	0,01	
Cr	0,17	0,01	
Ni	0,08	0,00087	
Co	0,15	0,61	
Mn	0,09	0,02	
Cu	0,46	0,00498	
Zn	0,827	2,01	[1-8]
Fe			

Etude de la croissance de *Spirulina* cultivée sur des eaux usées domestiques traitées et supplémentées par six éléments minéraux (M₁₀)

L'analyse des courbes de croissance de la figure 6 montre que la culture de la spiruline sur des eaux usées domestiques traitées par barbotage d'air à une DCO de 168,4 mg d'O₂/l et supplémentées par les six éléments minéraux présente une croissance et une évolution de la teneur en chlorophylle a similaire à celle du milieu de référence (M_Z).

Le milieu M₁₀ constitue donc un milieu très favorable à la croissance des Spirulines.

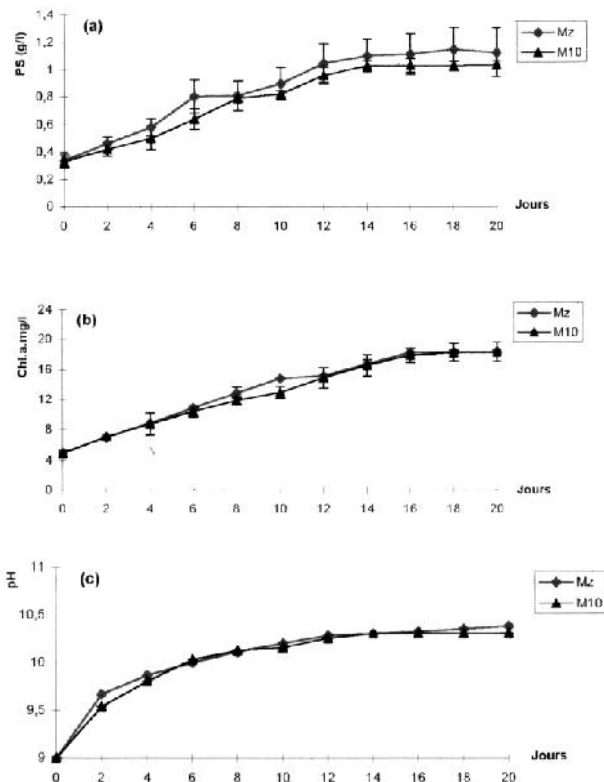


Figure 6 : Evolution de la croissance, de la teneur en chlorophylle a et du pH dans les milieux M_Z et M₁₀. M_Z : milieu synthétique zarrouk (témoin). M₁₀ : Eau usée domestique traitée à une DCO. de 168,4 mg d'O₂/l et fortifiées par six éléments minéraux

CONCLUSION

Le milieu le plus favorable à la croissance de *Spirulina* est l'eau usée brute traitée en aérobie à une DCO de 168,4 mg d'O₂/l et supplémenté en six éléments minéraux (NaHCO₃, K₂HPO₄, NaNO₃, K₂SO₄, NaCl et FeSO₄). La culture en masse de *Spirulina* dans ce milieu permet d'obtenir une production de biomasse importante et similaire à celle obtenue dans le milieu synthétique de référence (milieu Zarrouk) caractérisée par une teneur en protéines élevée (57 à 70%) et des quantités modérées d'hydrates de carbones et de lipides.

La technologie de culture en masse des Spirulines sur les eaux usées domestiques présente deux avantages :

- 1- La production d'une biomasse algale à haute valeur ajoutée (source de protéines, de vitamines, de pigments), pouvant être utilisées dans divers domaines d'applications, pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires.
- 2- La réutilisation et la valorisation des eaux usées domestiques qui représentent une source de nuisance pour l'environnement.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II (Rabat, Maroc), pour le soutien qu'il accorde au domaine de la recherche scientifique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- CLEMENT G. (1970). Une algue à haute teneur en protéines. Sciences, progrès, Découvertes, 39-46.
- CLEMENT G. (1975). Production et constituants caractéristiques des algues *Spirulina platensis* et *Maxima*. Annale de la nutrition alimentaire, 29.477 - 488.
- FOX D. (1994). Les bénéfices de la *Spirulina* sur le plan de la santé et le test nutritionnel sur les enfants mal nourris : KWASHIORKOR & MARASME. ACMA, pp.1-9.
- FOX D. (1986). Algoculture : la spiruline, un esprit pour le monde de la faim. Ed. Edisud Paris, 127 -215.
- PEARSON H.W, MARA D.D., BARTONE C.R. (1987). Guidelines for the minimum evaluation of the performance of full scale Waste stabilization pond and the influence of algae on pond performance .Water Sci.Tech.,19 (12),131-140.
- RICHMOND A. (1985). *Spirulina* in microalgae Biotechnology. Ed, C.R.C, Press, Florida.
- RODIER J. (1984). L'analyse de l'eau, eau naturelles, eau de mer, Ed. Dunod, Paris.

- SORONVAL C. (1993). La spiruline, une arme contre la malnutrition, histoire et perspectives. Bulletin de l'institut océanographique, Monaco, 12 :203-222.
- SAXENA PN, AHMAD M.R., SHYAM R., AMLA D.V. (1981).Biotechnology of Spirulina cultivation in sewage. Extension literature n°4, Economic Botany information service. India.1-6.
- SAXENA P.N. (1982).Cultivation of Spirulina in sewage for poultry feed. Experientia, 39:1077-1083.
- ZARROUK C. (1966). Contribution à l'étude d'une cyanophycée sur la croissance de la photosynthèse de Spirulina maxima. Thèse Universitaire, Paris.