

Microbiologie des préparations de protéines alimentaires d'origine unicellulaire

I. Spirulines

par J. JACQUET et M^{lle} SAUVAGEOT

I. — INTRODUCTION.

La démographie galopante qui caractérise notre époque et qui, au taux de croissance actuel, aboutira à doubler la population mondiale d'ici 25 à 30 ans au plus, pose de nombreux problèmes en matière de nutrition, d'autant plus que l'on estime que déjà 2 hommes, au moins, sinon 3, sur 5, souffrent de dénutrition ou plutôt de malnutrition. Aux aspects quantitatifs, se superposent, des préoccupations qualitatives, et les besoins les plus évidents sont ceux en protéines. Aussi, les ressources classiques (agriculture, élevage, chasse, pêche) qu'il faut, à tout prix, développer quand même, ne suffiront plus. Il est indispensable de faire appel, parallèlement, à d'autres sources, parmi lesquelles, les proliférations d'organismes unicellulaires. L'utilisation des spirulines est une de ces possibilités, car la teneur en protides y oscille entre 58 et 75 p. 100 de l'extrait sec, avec une moyenne à 63 p. 100.

Il s'agit d'une cyanoschizophyte (d'aucuns disent une cyanobactérie, pour rappeler les parentés avec les bactéries, notamment en ce qui concerne la nature de la paroi, le chromosome, l'absence de membrane périmembranaire, de mitochondries et de plastides), de l'ordre des nostocales, famille des oscillariacées. Elle est sûrement très ancienne sur notre planète, puisque découverte dans le précambrien du Transvaal, et les cyanophycées auraient été les seuls êtres vivants existant sur terre entre 3 et 1 milliard d'années. Très résistante puisqu'on en trouve des éléments encore vivants dans des prélèvements vieux de plusieurs mois, associée en trichomes spiralés de 250 μ , qui peuvent se fragmenter facilement, elle constitue comme beaucoup d'algues microscopiques, des « fleurs d'eau », formant

d'immenses masses faciles à récolter. C'est ce qui se passe dans le lac Tchad où les populations riveraines, la ramassent et la mettent simplement à sécher au soleil. Les galettes obtenues sont utilisées, ensuite, comme engrais et comme aliment. Elles sont bien connues et même vendues sur les marchés sous le nom de « dihé ». Il en était, de même, autrefois dans le lac Texcoco près de Mexico, où l'emploi nutritionnel, sous le nom de « Tecuitlatl », était largement pratiqué au xvi^e siècle encore par les Aztèques. Il s'agit, en fait, d'espèces très voisines mais différentes, *Spirulina platensis* en Afrique, *S. maxima*, en Amérique.

II. — NATURE DES ÉCHANTILLONS.

Nous avons pu disposer de plusieurs types de préparations :

a) Un échantillon de « dihé » déversé sur de la paille, au-dessus du sol et desséché simplement, au soleil d'Afrique, renfermant encore des traces de terre et de débris végétaux.

b) Des échantillons liquides de la partie A₁ de l'évaporateur solaire disposé en spirale (Caracol), de la Société Sosa Texcoco qui mesure 100 ha et de pH très alcalin (au-dessus de 8), d'où l'on extrait des carbonates. Certains échantillons des différentes parties de l'évaporateur et surtout de A₃ ont été desséchés sur rouleaux Hatmaker ou par atomisation.

c) Un échantillon séché d'une culture en bassin d'Algérie, fourni par l'Institut National des Pétroles de ce pays.

d) Des échantillons des bassins de cultures artificielles de l'Institut Français des Pétroles à Rueil-Malmaison, lyophilisé sous vide, et des échantillons des bassins de culture du Mexique.

e) Des échantillons décolorés en France et au Mexique à partir du même produit de départ.

III. — BUT POURSUIVI

En raison du prix de revient supposé (4 F environ le kg), l'emploi des spirulines paraît limité à priori à la nutrition de l'homme ; mais c'est une question qui peut être discutée, le marché des protéines disponibles, comme on le voit pour de nombreuses matières premières, étant susceptible d'énormes variations. C'est, de toute façon, cette utilisation alimentaire qui constitue la raison même

pour laquelle il est indispensable de vérifier que les produits obtenus sont sains, exempts d'espèces pathogènes, et aussi peu pourvus que possible en germes microbiens associés. Il importe, en outre, de vérifier ce qui a réellement proliféré, certains essais antérieurs de culture de chlorelles s'étant soldés par la production, avant tout, de protozoaires.

IV. — MÉTHODES EMPLOYÉES

Après avoir établi que le meilleur diluant était la solution de Ringer au 1/4, nous avons procédé aux :

1. Examen direct.
2. Numération de la flore mésophile aérobie revivifiable, sur milieu Plate count agar Difco, additionné de chlorure de triphényltétrazolium après incubation à 30 °C pendant 72 h.
3. Numération de la flore anaérobie revivifiable sur milieu VF gélosé, en jarre pour anaérobies, après 73 h d'incubation.
4. Numération des levures et moisissures sur milieu Czapek Dox et milieu au malt.
5. Numération des coliformes sur milieu desoxycholate agar Difco.
6. Numération des streptocoques fécaux sur milieu Bile esculin agar Difco.
7. Numération des staphylocoques sur milieu de Baird Parker.
8. Numération des anaérobies sulfito-réducteurs sur milieu TSN de Mossell.
9. Numération des amibes par culture sur milieu spécial Difco.

Les déterminations ultérieures des espèces ont été conduites selon les méthodes classiques de la microbiologie.

V. — RÉSULTATS OBTENUS

Les résultats quantitatifs principaux figurent dans le tableau joint. On y constate, avec satisfaction, que la microbiologie répond avec exactitude à la qualité de la technologie employée ; c'est ainsi que se rangent, par ordre de valeur et de propreté microbienne croissante :

- les spirulines (dihé) du lac Tchad,
- les spirulines obtenues en bassin en Algérie,

Nombre de germes au g

Code	●origine	Flore mésophile revivifiable		Coliformes	Indologènes	Producteurs d'hydrogène sulfuré	Streptocoques fécaux	Anaérobies sulfite réducteurs
		aérobie	anaérobie					
Dihé	Lac Tchad	405.000	20.000	100 à 1.000	1.000	plus de 1.000	1.000	20
ALB ₈	Préparation en bassin originaire d'Algérie	170.000	7.000	10 à 100	10 à 100	100 à 1.000	1.000	5
MR ₈	Algues du Mexique, lavées, séchées, atomisées ; à partir de plaques flottantes, à la surface de la partie A ₃ ..	43.000	1.800	100	—	10 à 100	1.000	0
MR ₁₃	Même origine que MR8, séchées sur rouleaux	58.000	17.000	1.000	—	—	750	0
MA ₃	Mexique — Algues récoltées dans l'évaporateur solaire ; lavées et atomisées. Non stabilisées	41.000	500	< 10	—	—	10 à 100	< 4
MA ₄	Culture synthétique dans bassins de 100 à 700 m ²	700	510	< 10	< 10	< 10	10 à 100	< 4
MA ₅	Id. en bassins de 500 m ²	9.700	650	< 10	< 10	< 10	10 à 100	< 4
MA ₆	Bassin A ₃ de l'évaporateur solaire de Sosa Texcoco. Spirulines atomisées.	21.000	—	1.000	—	—	100	0
MA ₇	Pompage des saumures du bassin A ₃ .	25.700	700	< 10	< 10	1.000	1.000	2
MA _{7 bis}	— Id.	17.300	1.300	< 10	< 10	10	1.000	0
MA ₉	Même origine et même préparation que MA7 bis, mais lot de 1 tonne...	20.000	3.000	10 à 100	10	10 à 100	1.000	8
MA ₁₀	Spirulines atomisées du bassin A ₃ de l'évaporateur solaire	27.500	10.200	100 à 1.000	—	—	750	10
MA _{10D}	Même origine, mais algues décolorées par IFP - Solaize	380.000	85.000	1.000 à 10.000	—	—	1.800	0
MD ₁	Algues de même origine, décolorées au Mexique	720.000	117.000	10.000	—	—	450	0
MA ₁₂	Algues de l'évaporateur solaire et séchées par atomisation	63.000	5.200	100	—	—	1.000	0
RL ₁	Bac de culture de Rueil, 5 m ² Gaz comprimé, lyophilisés, non stabilisés	800	320	< 10	< 10	< 10	< 10	< 1
RLG ₂	Bac de culture de Rueil — Gaz de combustion	500	40	— id. —	— id. —	— id. —	— id. —	— id. —

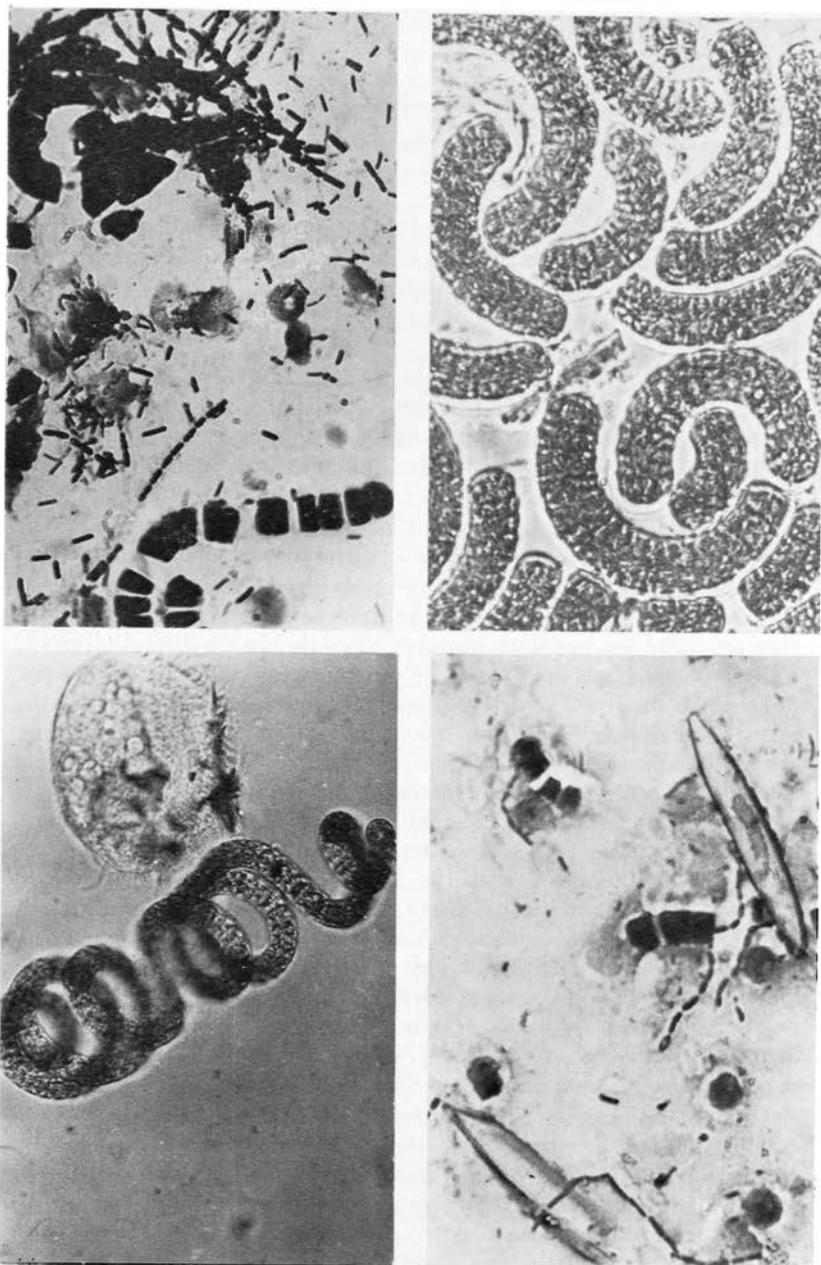


FIG. 1. — Aspect microbiologique de diverses préparations de spirulines.

En haut à gauche, dihé du lac Tchad, très riche en bactéries accompagnatrices, et trichomes très fragmentés.

En haut à droite, spirulines cultivées à l'Institut Français du Pétrole, très propre, à trichomes peu spiralés.

En bas à gauche, aspect d'un trichome de spiruline du lac Texcoco près de Mexico. Présence d'un protozoaire, *Stylonychia mytilus*.

En bas à droite, même origine, diatomées du genre *Navicula* et trichomes brisés.

A noter que les figures sont prises à des grossissements différents.

- les spirulines du lac Sosa Texcoco du Mexique,
- les spirulines des bassins de Rueil-Malmaison.

La numération totale, bien que fidèle dans l'ensemble, paraît un peu moins exacte que la prise en considération de la flore de contamination (colibacilles, entérocoques, sulfito-réducteurs etc...). Il est vrai que le mieux est toujours la réalisation d'une opinion de synthèse.

Nous avons vérifié, par ailleurs, qu'il y avait une bonne homogénéité de la répartition microbienne, et que le même échantillon (14 au total) analysé en même temps 5 fois donnait des chiffres très semblables, aux écarts habituels inhérents aux méthodes microbiologiques près.

L'examen direct, trop souvent négligé par les microbiologistes peut classer les échantillons entre eux et, il est ici absolument indispensable : il donne une indication sur la présence des protozoaires, diatomées, nématodes, insectes, qui pourraient se trouver présents, surtout dans les produits liquides. C'est le cas du dihé du Tchad, à l'état frais. Dans les bassins de Mexico, surtout, mais également dans ceux de Rueil, existent quelques rares chlorelles, des diatomées spécialement du type *Navicula* et *Asterionella* ; à certains moments, on note une invasion de protozoaires, notamment des *Stylonychia mytilus* et *Spiromonas angusta* qui se nourrissent aux dépens des spirulines. On a réalisé là une culture à ciel ouvert, soumise à toutes sortes de contaminations possibles et qui ne saurait évidemment être stérile ni être à l'abri des prédateurs. La seule défense est son pH élevé. Des amibes dysentériques n'ont jamais été mises en évidence, mais il y aurait lieu d'exercer une surveillance constante à cet égard. NOTTEGHEM et coll. ont noté de leur côté, quelques rares larves de nématodes, un rhizopode autre que *Entamoeba coli* et non déterminé, des Hélozoaires du genre *Vampyrella*, des ciliés (*Paramecium*, *Colpidium*, *Stentor*) des flagellés des genres *Bodo* et *Cercobodo*.

La flore dominante bactérienne obtenue par culture est formée essentiellement par des bacillacées, comme *B. subtilis*, *B. brevis*, *B. circulans*, *B. cereus*, *B. coagulans* ; *B. firmus*, *B. megaterium* très rares. Viennent ensuite, les entérocoques, microcoques et sarcines. Les entérobactéries, sont représentées surtout par *Enterobacter cloacae*, des *Citrobacter*, des *Proteus*. Les *Pseudomonas* sont assez peu fréquents. Il y a de très rares levures, du groupe des *Rhodotorula*, et des spores de moisissures en petit nombre (*Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *Penicillium* sp., *Scopulariopsis* sp., *Mucor plumbeus*).

Il n'a pas été relevé de bactérie franchement pathogène ; à noter cependant, l'existence seulement, de *Shigella sonnei* et dans un seul échantillon, celui du Tchad ; cette espèce, capable de produire des intoxications alimentaires, ne peut le faire que si elle existe en grande quantité, ce qui n'est pas le cas ici.

Nous avons suivi dans les bacs de Rueil, l'évolution de la microflore au cours du temps : il y a eu, des poussées importantes, vers la fin du premier mois et au 7^e mois, dont la cause est absolument

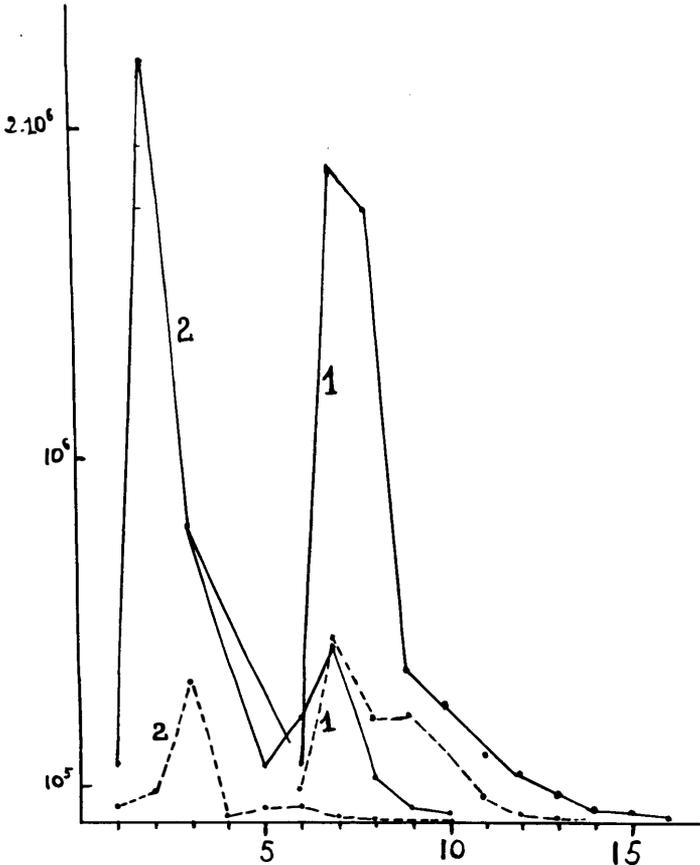


FIG. 2. — Evolution de la microflore dans les bacs de l'Institut des Pétroles.

1. 1^{er} prélèvement.

2. 2^e prélèvement.

En trait plein, les aérobies mésophiles revivifiables.

En trait pointillé, les anaérobies mésophiles revivifiables.

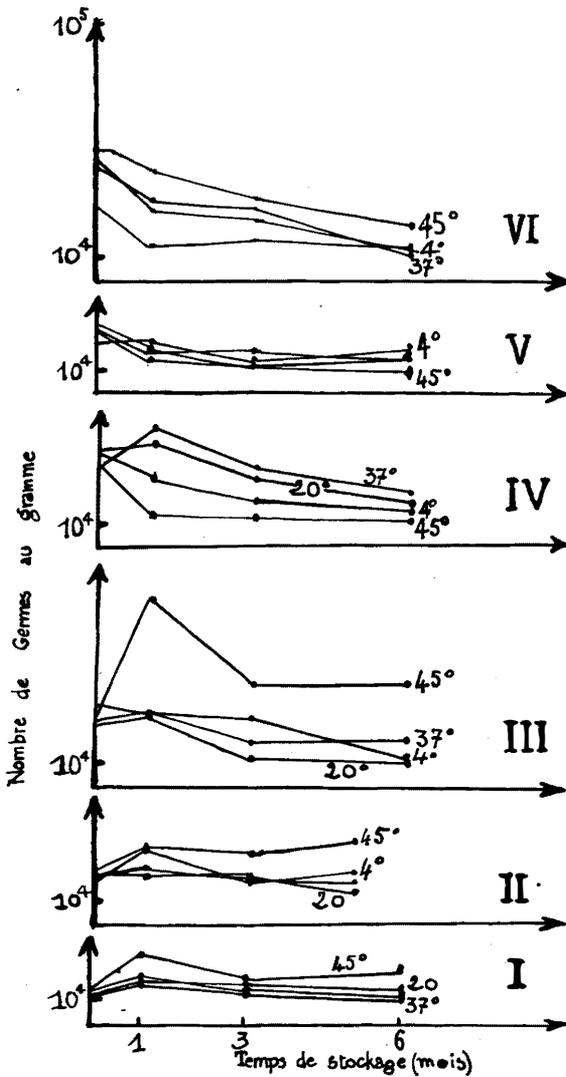


FIG. 3. — Evolution au cours de 6 mois, de la flore aérobie dans les échantillons secs.

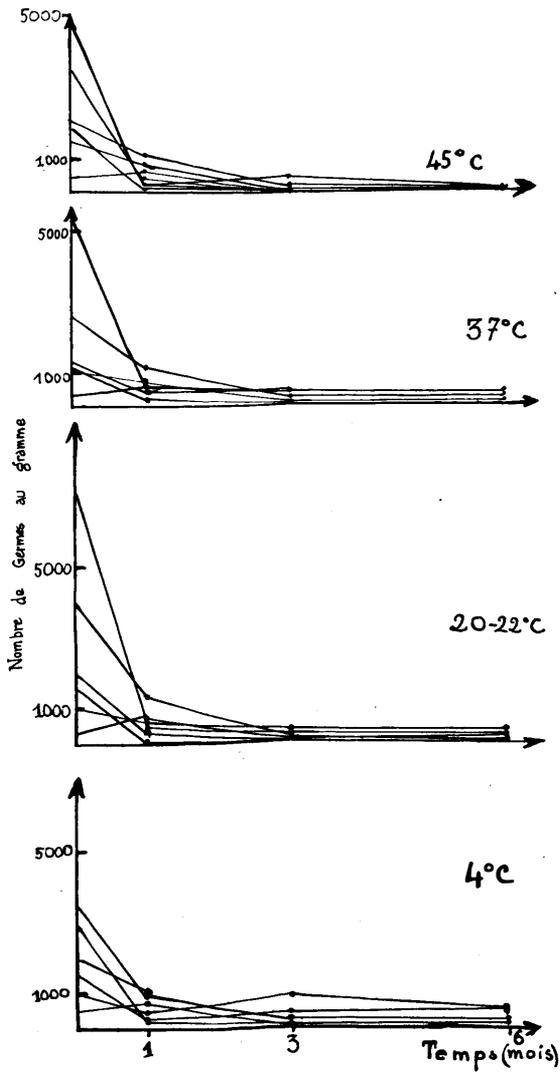


FIG. 4. — Evolution du nombre de *Streptococcus fecalis* dans les échantillons secs au cours du temps.

inconnue, mais qui portent autant sur les aérobies banals allant jusqu'à 2.000.000 au ml que les anaérobies totaux revivifiables (fig. 2). Les coliformes, ne dépassent pas 100 au ml, à cette période, et sont inhibés le reste du temps ; les streptocoques fécaux, à ces moments de poussée, arrivent à 1.000, pour être, eux aussi, bloqués avant et après. Les staphylocoques et anaérobies sulfito-réducteurs sont pratiquement absents.

Une fois les spirulines desséchées, la microflore associée diminue régulièrement dans ce produit dont la teneur en eau oscille entre 7 et 9 p. 100 ; (fig. 3 et 4) et ceci pour toutes les flores et quelle que soit la température de stockage (4, 20, 37 et 45 °C). Déjà très important pour les aérobies totaux, il s'agit d'un véritable effondrement avec les coliformes, et surtout les streptocoques fécaux, qui, dans la plupart des cas, ont disparu au bout d'un mois. Seuls, les anaérobies, malgré une nette descente, se maintiennent un peu mieux au cours du temps, limité dans nos essais à 6 mois.

Les manipulations diverses, même la décoloration, qui paraît pourtant tout à fait favorable pour l'acceptabilité du produit par les occidentaux, ont l'inconvénient d'augmenter le nombre de germes (cf. échantillons MA₁₀, MA₁₀ D et MD₁ du tableau).

VI. — CONCLUSIONS

En conclusion, le contrôle microbiologique, qui doit comprendre obligatoirement l'examen direct et la mise en place des diverses méthodes de culture appropriées, est essentiel à la surveillance constante des lots de spirulines récoltées, ou cultivées spécialement, pour fournir des protéines ou divers nutriments à l'homme et aux animaux. Il répond exactement à la qualité de la technologie utilisée et l'amélioration de celle-ci ne peut être séparée du guide de la microbiologie. Il semble que l'avenir appartiendra, en raison des garanties hygiéniques supérieures apportées, aux cultures sur milieux synthétiques réalisées d'une façon aussi proche que possible des techniques microbiologiques.

*(Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Caen)
Travail faisant partie d'un contrat DGRST. n° 71 7 3227*

BIBLIOGRAPHIE

- CLEMENT (G.), REBELLER (M.) et TRAMBOUZE (P.). — Communication sur les spirulines au 7^e Congrès Mondial du Pétrole. Mexico, 1967.
- NOTTEGHEM (M.), LEGER (N.), DIOT (G.) et MEYER (C.). — Etude des moyens chimiques de lutte contre la faune d'accompagnement de cultures d'algues. *Ind. Alim. Agr.*, 1971, n° 37 1569-1574.
-