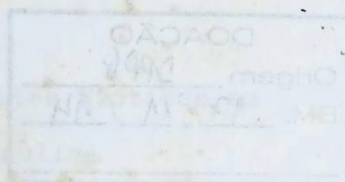
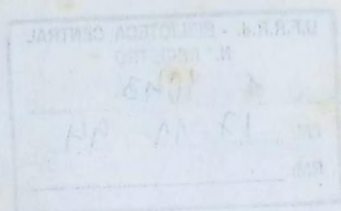


UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE POS-GRADUAÇÃO EM CIENCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS



Aspectos sobre Contaminantes Bióticos em
Cultivo de *Spirulina*

ARLENE REGINA MORONE

Itaguaí, Rio de Janeiro
março - 1994

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE POS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Aspectos sobre Contaminantes Bióticos em
Cultivo de *Spirulina*

ARLENE REGINA MORONE

Sob orientação do Professor:

Dr. Paschoal Guimarães Robbs

Tese submetida como requisito
parcial para a obtenção do Grau
de *Magister Scientiae* em Ciên
cia e Tecnologia de Alimentos.

APROVADA EM: 30 / 03 / 1994

Paschoal Guimarães Robbs

Antonio Tavares da Silva

Allen Norton Bagley

Itaguaí, Rio de Janeiro
março - 1994

T
660.62
M 868 a

TESE

Aspectos sobre Contaminantes Bióticos em
Cultivo de *Spirulina*

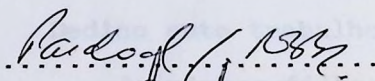
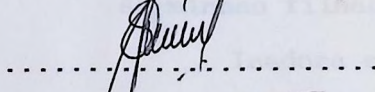
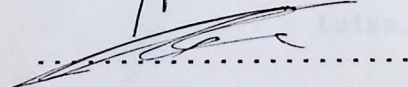
ARLENE REGINA MORONE

APROVADA EM: 30 / 05 / 1994

Paschoal Guimarães Robbs

Antonio Tavares da Silva

Allen Norton Hagler


.....

.....

.....

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial ao orientador, Prof. Paschoal Guimarães Sobrinho, e ao meu amigo Prof. Roney Mianhi.

Aos CNPq, pelo suporte financeiro, que tornou possível o desenvolvimento desta pesquisa.

Dedico este trabalho
às minhas filhas
Isadora e
Luiza.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial meu orientador, Prof. Paschoal Guimarães Robbs, e ao meu querido Prof. Romeu Vianni.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro, que tornou possível o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro, que tornou possível o desenvolvimento desta pesquisa.

Em março de 1991, iniciou o curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRRJ, tendo como Área de Concentração, Microbiologia de Alimentos.

BIOGRAFIA DO AUTOR

ARLENE REGINA MORONE, nasceu em 06 de novembro de 1962 no município de Nova Iguaçu, Estado do Rio de Janeiro.

No período de março de 1982 a julho de 1986, realizou o curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Bolsista de Aperfeiçoamento do CNPq e da Sociedade Cultural e Beneficente Guilherme Guinle na Área de Microbiologia de Alimentos no Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFRRJ nos períodos de julho de 1988 a junho de 1990 e julho de 1990 a dezembro de 1990, respectivamente.

Em março de 1991, iniciou o curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRRJ, tendo como Área de Concentração, Microbiologia de Alimentos.

2.2.1. Características.....	10
2.2.2. Composição química da Spirulina.....	11
2.2.3. Utilizações da Spirulina na indústria.....	12
2.2.4. Sistemas de cultivo de Spirulina.....	13

2.2.5. Princípios do cultivo de biomassa de <i>Spirulina</i>	18
2.2.6. Colheita e secagem de <i>Spirulina</i>	19
2.3. Contaminantes bióticos em cultivo de microalgas.....	21
2.3.1. Contaminação por outras microalgas.....	21
2.3.2. Contaminação por bactérias.....	24
2.3.3. Contaminação por fungos.....	25
2.4. Outras contaminantes bióticas.....	27
RESUMO	xiv
SUMMARY	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Microalgas.....	4
2.1.1. Importância.....	4
2.1.1.1. Importância das microalgas na alimentação humana e animal.....	5
2.1.1.2. Importância das microalgas no tratamento de resíduos.....	6
2.1.1.3. Produtos químicos de microalgas.....	7
2.1.2. Microalgas de maior importância.....	9
2.2. <i>Spirulina</i>	10
2.2.1. Características.....	10
2.2.2. Composição química da <i>Spirulina</i>	11
2.2.3. Utilizações da <i>Spirulina</i> na medicina.....	13
2.2.4. Sistemas de cultivo de <i>Spirulina</i>	15

2.2.5. Princípios do cultivo de biomassa de <i>Spirulina</i>	16
2.2.6. Colheita e secagem da <i>Spirulina</i>	19
2.3. Contaminantes bióticos em cultivo de microalgas	21
2.3.1. Contaminação por outras microalgas.....	21
2.3.2. Contaminação por bactérias.....	24
2.3.3. Contaminação por fungos.....	25
2.4. Outros contaminantes bióticos.....	27
2.5. Objetivos.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1. Amostragem para avaliação de contaminações nos tanques na "geléia" e na <i>Spirulina</i> em pó.....	30
3.2. Amostragem para experimentos específicos.....	31
3.2.1. Para verificar o desenvolvimento da microbiota na geléia.....	31
3.2.2. Para verificar o comportamento da microbiota durante o processo de secagem.....	32
3.2.3. Para verificar a relação entre as contagens nos tanques e nas geléias.....	32
3.3. Análises microbiológicas.....	33
3.3.1. Preparo das amostras e das diluições.....	33
3.3.2. Exames realizados.....	34
3.3.2.1. Contagem total de bactérias mesófilas (CPP e CPP/sp).....	34
3.3.2.2. Contagem de microrganismos gram negativos (Agar EMB).....	34

3.3.2.3. Contagem de microrganismos proteolíticos - (Agar leite).....	35
3.3.2.4. Contagem presuntiva de estreptococos (Agar-Azida).....	35
3.3.2.5. Contagem de Bolores e Leveduras (ABD).....	35
3.3.2.6. Contagem de microrganismos sulfito redutores (Agar SF).....	36
3.3.2.7. Contagem de microrganismos que utilizam nitrato (Agar nitrato ^A ; Agar nitrato ^B).....	36
3.3.2.8. Contagem presuntiva de estafilococos (Agar BP).....	37
3.3.2.9. Contagem de coliformes totais e fecais.....	37
a) Teste presuntivo.....	38
b) Teste confirmativo.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5. CONCLUSÕES.....	60
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

INDICE DE TABELA

- Tabela 01. Distribuição das contagens totais de mesófilos (CPP; CPP/sp), de bolores e leveduras (ABD); de bactérias que utilizam nitratos (Agar nitrato^A, Agar nitrato^B); bactérias proteolíticas (Agar leite); bactérias gram negativas (Agar EMB); estreptococos presuntivos (Agar Azida), estafilococos presuntivo (Agar B.P) e bactérias sulfito redutoras (Agar S.F) em cultivos de *Spirulina* em tanques abertos. Resultados expressos em UFC/ml. 40
- Tabela 02. Distribuição de Contagens Padrão em Placas (CPP) e de bactérias gram negativas (Agar EMB), em quatro tanques (A, B, C e D) de cultivo de *Spirulina*. Resultados em UFC/ml. Leituras feitas após 07 dias de incubação..... 44

Tabela 03. Distribuição das contagens totais de mesófilos (CPP e CPP/sp); de bolores e leveduras (ABD); de bactérias proteolíticas (Agar leite); bactérias gram-negativas (Agar EMB); estreptococos presuntivos (Agar Azida); estafilococos presuntivos (Agar B.P.) e bactérias sulfito redutoras (Agar S.F.) em cultivos de <i>Spirulina</i> em "geléia" de <i>Spirulina</i> . Resultados expressos em UFC/g.....	46
Tabela 04. Distribuição das Contagens totais de mesófilos (CPP e CPP/sp); de bolores e leveduras (ABD); bactérias proteolíticas (Agar leite); bactérias gram negativas (Agar EMB); estreptococos presuntivos (Agar Azida); estafilococos presuntivos (Agar B.P.) e bactérias sulfito-redutoras (Agar S.F.) em alga seca. Resultados expressos em UFC/g.....	48
Tabela 05. Logarítmos (Log) ^a e Desvios Padrões (D.P.) das Contagens (UFC/ml ou g) Totais de Bactérias (C.P.P.), de Bactérias Gram Negativas (Agar EMB) e de Bolores e Leveduras (ABD) na Água de Cultivo dos Tanques e na Geléia de <i>Spirulina</i>	51

Tabela 06. Comportamento de alguns grupos de microrganismos durante a estocagem da "geléia" de <i>Spirulina</i> a 35°C. Resultados expressos em log das contagens (média de três repetições) e Desvio Padrão.....	53
---	----

Tabela 07. Contagem Padrão em Placas (CPP) e Bolores de Leveduras (ABD) em UFC/g e de Coliformes Totais e Fecais (NMP/g) em <i>Spirulina</i> em pó, produzida em um período de 06 meses, após medidas de higiene nos tanques e secagem. Programa de estufagem envolvendo temperaturas de 60 e 70°C.....	58
---	----

Figura 02. Comportamento da unidade (X), contagem padrão em placas (CPP) e contagem de bactérias gram negativas (BGN) durante a secagem de geléia de <i>Spirulina</i> à temperatura de 70°C. As temperaturas do interior da geléia estão indicadas pelas setas.....	59
---	----

ÍNDICE DE FIGURA

- Figura 01. Comportamento da umidade (%), contagem padrão em placas (CPP) e contagem de bactérias gram-negativas (EMB) durante a secagem de geléia de *Spirulina* à temperatura de 60°C..... 56
- Figura 02. Comportamento da umidade (%), contagem padrão em placas (CPP) e contagem de bactérias gram-negativas (EMB) durante a secagem de geléia de *Spirulina* à temperatura de 70°C. As temperaturas do interior da geléia estão indicadas pelas setas..... 57

RESUMO

Foram examinadas microbiologicamente 54 amostras de água de tanques de cultivo, 28 de "geléia" e 37 de pó de *Spirulina* em uma planta industrial (Microalgas S.A.) situada na localidade de Santa Cruz, Estado do Rio de Janeiro. Procurou-se avaliar os níveis de contaminações nas diferentes fases de produção, visando a análise de riscos do processo.

As análises das amostras de água dos tanques, de "geléia", e da *Spirulina* em pó, mostram que os níveis de contaminação estão, respectivamente, na faixa de 10 a 10^7 UFC/ml, 10^4 a 10^7 UFC/g e 10^3 a 10^7 UFC/g para CPP; de 1 a 10^4 UFC/ml, 10 a 10^7 UFC/g e 10^2 a 10^6 UFC/g para bactérias gram negativas e de <10 a 10^4 UFC/ml, <10 a 10^5 UFC/g e <10 a 10^3 UFC/g para bolores e leveduras. Contagens de outros grupos de microrganismos foram também realizadas. Os resultados mostraram níveis de contaminação elevados em todas as fases, mas especialmente na *Spirulina* em pó.

Experimentos feitos após serem tomadas algumas medidas de ordem higiênico-sanitária nos tanques de cultivo no processamento e do pessoal de produção, mostraram que cultivos com contagens totais (CPP) e de gram negativas da ordem de 10^3 e de 10 UFC/ml forneceram geléias com contagens da ordem de 10^5 e 10^4 UFC/ml, respectivamente, indicando que na fase de produção da geléia ocorre um aumento de 2-3 ciclos em relação as contagem nos tanques.

Experimentos mantendo a geléia em temperatura de 35°C , mostraram que após quatro horas já ocorriam aumentos sensíveis das populações, e que em seis horas aumentos de contagem superiores a 1 ciclo logarítmico já eram observados.

Com relação a secagem, temperatura de 60°C na estufa deu origem a produto seco com carga bastante elevada de microrganismos. Já a 70°C houve uma redução considerável dos coliformes, mas o mesmo não ocorreu na contagem total.

A análise de 21 amostras de *Spirulina* em pó feita após a adoção de medidas higiênico-sanitárias e a modificação da temperatura programada da estufa, mostraram uma considerável redução nos níveis de contaminantes do produto final. Entretanto, a produção de *Spirulina* em pó grau alimentício é bastante dificultada pelo processo de secagem em estufa, especialmente em decorrência da contagem total de bactérias.

SUMMARY

ASPECTS ABOUT BIOTICS CONTAMINANTS IN *Spirulina* GROWTH. With purpose of evaluating the level of contamination and the risk of the production, 54 samples of water from a grow pond, 28 of "jelly" and 37 samples of *Spirulina* in form of powder were microbiologically examined. The samples came from an industrial plant (Microalga S.A.) located at Santa Cruz in the State of Rio de Janeiro.

The samples from the water of the grow pond, "jelly" and dried *Spirulina* presented a level of contamination in SPC from 10^1 to 10^7 , 10^4 to 10^7 and 10^3 to 10^7 UFC/g respectively; from $<10^1$ to 10^4 , 10^1 to 10^7 and 10^2 to 10^6 UFC/g for gram negative bacterias and from $<10^1$ to 10^4 , $<10^1$ to 10^5 and $<10^1$ to 10^3 UFC/g for mold and yeasts. Counts of other groups of microorganisms were also made. The results showed high level of contamination in all production phase specially in powder *Spirulina*.

After taking some care related to sanitation of grow pond, production and personal, experiments carried out

showed grow with total and Gram negative counts at the level of 10^3 and 10^1 CFU/ml given "jelly" with a total count of 10^5 and 10^4 CFU/ml respectively. This indicates that in the production phase of "jelly" take place an increase of 2-3 cycle in relation to the counts in growth ponds. After a period of 4 hours by maintaining the "jelly" temperature at 35°C become sensitive the increase in the population and after 6 hours the increase in counts is superior to a logarithm cycle. The drying process at 60°C resulted a dry product with a high load of microbial contaminants. At 70°C there was a considerable reduction in coliforms but not of the total count.

An analysis of 21 samples of dried *Spirulina* showed a considerable reduction in the level of contamination after taking sanitary measures and modification of the programmed oven temperature. However a production of food grade powder *Spirulina* is very difficult due to the drying process in the oven since it caused a high bacterial count.

Na produção de microalga para fins alimentícios, há necessidade de certos cuidados com relação a sua qualidade microbiológica. De acordo com a FDA a *Spirulina* pode ser comercializada legalmente como alimento ou suplemento alimentar, desde que não contenha contaminantes e/ou adulterantes (SWITZER, 1990).

1. INTRODUÇÃO

A *Spirulina* é uma cianobactéria denominada industrialmente como microalga, que tem demonstrado possuir grande potencial para fins alimentares. Sua rica composição química representa uma grande fonte de nutrientes para a alimentação humana e animal e bem como para extração de uma série de produtos naturais. É bastante rica em proteínas (até 70% do seu peso seco) e em várias vitaminas, inclusive B₁₂, e de minerais.

A *Spirulina* já vem sendo utilizada nos EUA como ingrediente de misturas altamente nutritivas, no Japão como fonte de corantes para alimentos e como fonte de proteína para enriquecimento de produtos alimentícios e em vários países, inclusive o Brasil, como controlador (moderador) do apetite.

Na produção da microalga para fins alimentícios, há necessidade de certos cuidados com relação a sua qualidade microbiológica. De acordo com a FDA a *Spirulina* pode ser comercializada legalmente como alimento ou suplemento alimentar, desde que não contenha contaminantes e/ou adulterantes (SWITZER, 1980).

A produção comercial de *Spirulina* tem sido feita em larga escala no México, Taiwan, Tailândia, USA, Japão e Israel. No México, a produção diária é de cerca de 2 toneladas de peso seco, proporcionando um rendimento de proteína de cerca de 28 toneladas/ha/ano (SANTILLAN, 1982). Na Tailândia, a Siam Algae co Ltda, uma subsidiária da Greater Japan Ind. e Chemicals Inc (DIC) no Japão, começou a operar em 1978. A Tailândia foi escolhida, após longa procura, por possuir o clima ideal para o cultivo de *Spirulina*. Nos EUA, a pioneira na produção de *Spirulina* foi a Earthrise Farms, estabelecida no Valley Imperial na California. A companhia opera 105.000 m² de tanques. A planta está preparada para alcançar um rendimento de cerca de 100 toneladas(Base Seca)/ano com as atuais instalações. O Brasil é um país que possui excelentes condições climáticas para o cultivo de microalgas; entretanto, a produção é ainda insignificante. Alguns estudos têm sido desenvolvidos na UFRJ, USP e PUC-RJ e UFRRJ. Uma significativa experiência industrial foi a da Aquacultura S.A., posteriormente Microalgas S.A., no município de Santa Cruz-RJ. A Aquacultura teve como propósito o cultivo de *Spirulina* grau alimentício. Adotou o sistema aberto, em tanques circulares de 500 m², dotados de agitadores do tipo "pá".

O controle de qualidade, tanto estático quanto dinâmico, é um aspecto importante na produção de *Spirulina* grau alimentício. O desenvolvimento microbiano, inclusive de

patogênicos, pode ocorrer em todas as fases de produção, se não houver um bom controle. Assim, é importante conhecer o comportamento dos grupos de microrganismos envolvidos na deterioração do produto e em saúde pública, nas diversas fases de produção, para que se possa controlá-los. São escassas, entretanto, as informações da literatura abordando contaminações em plantas de processamento das microalgas.

Com base no exposto e considerando que a *Spirulina* venha a ser no Brasil, além de seu uso já consagrado para controle do apetite, uma das fontes alternativas para enriquecimento proteico e vitamínico de alimentos, desenvolveu-se o presente trabalho visando aumentar os conhecimentos sobre os microrganismos contaminantes durante as fases de produção desta microalga, com ênfase em bactérias.

exemplo, como alimento humano e animal, como matéria prima para a extração de muitos tipos de substâncias químicas e para tratamento de resíduos. Entretanto, as microalgas têm sido pouco exploradas, se visto o grande potencial que apresentam, conforme relatado em várias publicações, ROSENBERG (1976); RICHARD (1985) e RICHMOND (1988).

2.1.1.1. Importância das microalgas na alimentação humana e animal

O potencial das microalgas na alimentação humana (MORIMURA & TANIYA, 1964; TANURA et al., 1968; SONDER et al., 1970; SONDER & MØRSTAD, 1972; BRAIN, 1988) e animal (COMES, 1982; MACDONELL & LEVINE, 1983; SPARKS et al., 1983) é muito grande.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Microalgas

2.1.1. Importância

O potencial das microalgas têm sido alvo de muitas pesquisas pois, sob condições adequadas, se reproduzem rapidamente produzindo biomassa que pode ser utilizada, por exemplo, como alimento humano e animal, como matéria prima para a extração de muitos tipos de substâncias químicas e para tratamento de resíduos. Entretanto, as microalgas têm sido pouco exploradas, em vista do grande potencial que apresentam, conforme relatado em várias publicações, ROSENBERG (1976); RICHMOND (1986) e RICHMOND (1988).

2.1.1.1. Importância das microalgas na alimentação humana e animal

O potencial das microalgas na suplementação da alimentação humana (MORIMURA & TAMIYA, 1954; TAMURA *et al.*, 1958; SOEDER *et al.*, 1970; SOEDER & MODESTA, 1972; BRAUN, 1988) e animal (COMBS, 1952; MACDOWELL & LEVILLE, 1963; SPACEK *et al.*, 1970) foi demonstrada como excelente, com particular sucesso na aquacultura (SNELL *et al.*, 1983). Neste caso podem ser empregadas na criação de ostras (CHU *et al.*, 1982 e BECKER, 1981), peixes (SILVALIZIGAM *et al.*, 1979; BECKER, 1981; FABREGAS & HERRERO, 1986 e PANTASTICO *et al.*, 1986) e camarões (BECKER, 1981). Alguns estudos incluindo microalgas na alimentação de aves domésticas têm sido feitos (MACINTYRE, 1955).

A inclusão de algas microscópicas na alimentação humana e animal, segundo FISHER & LITTLE (1953), aumentou o conteúdo de vitaminas na dieta. Estima-se que 600g de alga por dia seriam capazes de nutrir adequadamente um indivíduo no que diz respeito as suas necessidades, tanto proteicas como vitamínicas (BRATTACHARJEE, 1970).

As algas apresentam as vantagens de possuírem menor conteúdo de ácidos nucleicos que as leveduras, embora trabalhos com ambos tenham demonstrado a possibilidade de se obter concentrados proteicos com baixos teores desses ácidos (HEDENSKOG & EBBINCHAUS, 1972 e HEDENSKOG & MOGREN, 1973). O Departamento de Comércio dos Estados Unidos da América

concluiu que até 100 g/dia de algas unicelulares podem ser incluídas na dieta humana (BHATTACHARJEE, 1970).

2.1.1.2. Importância das microalgas no tratamento de resíduos

Algumas algas podem seletivamente absorver vários íons metálicos de sistema aquático (KAPLAN *et al.*, 1987), tendo esta característica despertado grande interesse do ponto de vista de controle de poluentes ambientais, assim como na recuperação de certos metais de importância econômica (HORIKOSHI *et al.*, 1979; BLANK, 1985; GREENE *et al.*, 1986 e KESSLER, 1986).

FRANÇA *et al.* (1978) citam que muitas microalgas são resistentes a poluição. Estudos demonstram que as microalgas podem ser cultivadas em esgoto sanitário, onde as fontes orgânicas de carbonos são muito bem utilizadas. Apresentam ainda a vantagem de absorverem o nitrogênio e o fósforo, os quais não são retirados nos tratamentos convencionais de esgotos, ocorrendo portanto perda desses elementos. Havendo incorporação do N e P nas células algais, estas posteriormente poderão servir para alimentação, fertilização do solo (REID & ASSENZO, 1961; BARLOW *et al.*, 1975 e WONG & LAY, 1980) ou para ração animal (FRANÇA *et al.*, 1978a) além da conseqüente purificação de efluentes (FRANÇA *et al.*, 1981).

2.1.1.3. Produtos químicos de microalgas

RICHMOND (1986) salienta o fato de algumas algas poderem crescer em climas quentes, como o desértico, e utilizar água do mar ou águas poluídas, condições não apropriadas para o cultivo de plantas convencionais. Como o cultivo algal é um eficiente sistema biológico para o uso de energia solar com conseqüente produção de matéria orgânica, pode ser utilizado para produção e extração de substâncias químicas. O autor destaca também em sua revisão os produtos das microalgas incluindo dentre eles os lipídios, pigmentos, enzimas, hidrogênio, metano, osmoreguladores, polímeros e produtos farmacêuticos. Dentre os constituintes químicos das microalgas que podem ter valor comercial, inclui-se os pigmentos vitamínicos (BOROWITZA & BOROWITZA, 1988).

A produção de lipídios, especialmente daqueles contendo ácidos graxos polinsaturados (com uma à seis dupla ligações) é de grande interesse. Dentre os polinsaturados os mais importantes são os ácidos graxos essenciais. Estes são raros em plantas e em fontes animais. Certas algas, entretanto, contém quantidades relativamente altas destes ácidos graxos (NICHOLS & WOOD, 1968).

Com relação aos polímeros, as proteínas são, sem dúvida, os produtos de maior interesse. Microalgas podem ser utilizadas como fonte de proteínas devido a sua rápida velocidade de crescimento e alto conteúdo proteico. Com a *Spirulina* calcula-se que se possa produzir anualmente

50.000 kg de proteína por hectare (SAVINS, 1978).

Com relação aos pigmentos, o beta caroteno é um constituinte frequente das misturas de carotenóides de microalgas. O potencial destas, como fonte comercial de carotenóides têm sido extensivamente estudado. O desenvolvimento da produção de beta caroteno usando a microalga *Dunaliella salina* já é feito em várias partes do mundo, tais como: Israel (BENAMOTZ & AVRON, 1980), USA e Austrália (BOROWITZKA *et al.*, 1984). Um outro pigmento importante e já explorado industrialmente nas algas é a clorofila (YAMAGUCHI, 1981). A ficocianina também tem despertado grande interesse industrial, sendo utilizada como pigmento para alimentos, drogas e cosméticos, em substituição aos corantes sintéticos, suspeitos de serem carcinogênicos. Inclusive a ficocianina da *Spirulina*, já é comercializada pela "DAINIPPON E CHEMICAL OF JAPAN" com o nome de "Linablue", usado como corante para doces, sorvetes, produtos de laticínio e refrigerantes. Outra patente desta mesma companhia é de um preparado não solúvel em água, para uso em cosméticos (DAINIPPON INK AND CHEMICAL, INC, 1980).

Além dos pigmentos, diversos tipos de enzimas tais como endonucleares de restrição, aminoácidos redutases, superóxido desmutases e certas quinases, podem ser extraídas para produção industrial de compostos químicos finos. Talvez a classe mais útil de enzimas sejam os sistemas enzimáticos capazes de gerar hidrogênio (hidrogenases e nitrogenases).

Algas verdes e cianobactérias formam hidrogênio molecular. O metabolismo das microalgas bem como os aspectos práticos deste metabolismo foram estudados por BENEMANN *et al.* (1980) e KUMAZAMAS & MITSUI (1982).

Algumas propriedades medicinais de microalgas já foram observadas. Extratos de *Chlorella*, *Ochromonas danica* e outras microalgas são conhecidas pela atividade antibiótica, sendo ácido graxos e seus produtos de oxidação, citados como responsáveis pela mesma. Efeitos contra vírus e fungos também foram observados em extratos de algas (COHEN, 1986). Atividades bactericidas (REICHELT & BOROWITZKA, 1984 e fungicida HALVORSEN *et al.*, 1984) exibida "*in vitro*" por extrato celular de microalgas foram relatadas.

2.1.2. Microalgas de maior importância industrial

Spirulina, *Chlorella* e *Scenedesmus* e *Dunaliella* são os gêneros de microalgas mais estudados e cultivados sendo os três primeiros para uso alimentar e o último para extração de corante (BOROWITZA & BOROWITZA, 1988). A *Spirulina* tornou-se mais conhecida a partir das observações realizadas no lago do Chad, África Central (ILTIS, 1970, 71, 72, 73, 74). A *Spirulina maxima* foi utilizada na República do Chad como alimento básico, conforme o INSTITUT FRANCAIS DU PETROLE (1967). Existem indicações de que a *Spirulina* é conhecida há mais de três mil anos. De acordo com HANSEN

(1984) a *Spirulina maxima* foi utilizada pelos aztecas como alimento principal à cerca de 400 anos antes da chegada dos conquistadores espanhóis. Os aztecas deram nome de "Tecuitlatl" a então hoje conhecida como *Spirulina*.

2.2. *Spirulina*

2.2.1. Características

A *Spirulina* é uma cianobactéria multicelular filamentosa, também conhecida como microalga verde-azulada. Ela consiste de filamentos formados por células cilíndricas, medindo 1 - 12 μ m de diâmetro de disposição helicoidal. Os filamentos se movimentam suave e continuamente ao longo de seu eixo (RICHMOND, 1988). O formato helicoidal dos filamentos é mantido somente em meio líquido e tornam-se verdadeiros espirais em meio sólido. A transição de uma hélice para espiral é lenta, enquanto que o reverso ocorre rapidamente. A forma helicoidal do filamento é característica do gênero *Spirulina*, porém, a distância entre as espirais da hélice, assim como o seu comprimento e as dimensões, variam com as diferentes espécies e mesmo dentro das espécies (CIFERRI, 1983).

LEWIN (1980), salienta que, somente um número limitado de caracteres morfológicos pode ser usado para distinguir os diferentes gêneros de algas verde-azuladas. A ultra estrutura da *Spirulina* é similar à aquelas outras

algas verdes azuladas (HOLMGREN *et al.*, 1971; CARR & WHITTON, 1973 e VAN-EYKELEMBURG, 1979), e juntamente com a morfologia, é afetada pelas condições ambientais e fatores nutricionais. A temperatura influencia o tamanho da célula e a ocorrência de diferentes organelas (VAN-EYKELEMBURG, 1979).

2.2.2. Composição química da *Spirulina*

A composição química da *Spirulina* reflete seu potencial como alimento humano, animal e fonte de produtos naturais. A composição celular da *Spirulina* sofre variações que são dependentes das condições de cultivo. De acordo com SWITZER (1980), na *Spirulina* seca por "spray dring" a maior variação assinalada na composição ocorre no conteúdo proteico, que varia de 50 a 70% (peso seco). A maioria dos aminoácidos estão em quantidades adequadas, sendo os teores de aminoácidos sulfurados e triptofano baixos.

O conteúdo de lipídio e lipopolissacarídeo pode alcançar valores de cerca de 16,6 g(%) do peso seco na *Spirulina platensis*. Os componentes lipídicos dominantes da fração apolar são os ácidos graxos, sendo os ácidos linoleico e gama linolênico os mais importantes sob o aspecto nutricional. Dentre os lipídios polares mais importantes, destacam-se o fosfatidilglicerol, digalactosildiglicerídeo e fetragalactosildiglicerídeo (TORNABENE *et al.*, 1985).

De acordo com QUILLET (1975), os carboidratos da *Spirulina* atingem cerca de 15% da matéria seca. Os produtos resultantes da hidrólise são: glucose, levulose, sacarose, glicerol e vários poliois.

Os pigmentos da *Spirulina* pertence a três classes: clorofila a, compreendendo 1,7% do peso das células, carotenóides e xantofilas, compreendendo aproximadamente 0,5% do peso orgânico e ficocianina e aloficocianina que estão presentes normalmente em cerca de 20% da proteína celular sendo quantitativamente os pigmentos dominantes na *Spirulina* (QUILLET, 1975).

As principais vitaminas que estão presentes na *Spirulina* em mg/kg de peso seco são: betacaroteno 1700; cianocobalamina 1,6; ácido fólico 0,5; inositol 350; niacina 118; piridoxina 0,3; tiamina 55; tocoferol 190; d-pantotenato de cálcio 11 (RICHMOND, 1988).

O conteúdo de B₁₂ é mais elevado do que qualquer alimento vegetal, sendo que 20 g de *Spirulina* proporciona todo o requerimento do corpo humano desta vitamina, bem como de 70% da recomendação diária admissível (RDA) para B₁, 50% para B₂, 12% para B₃. Em relação a vitamina A, 10 g de *Spirulina* contém 25.000 U.I., o que representa mais de 500% do RDA.

A *Spirulina* contém aproximadamente 3,6% de RNA e 0,8% de DNA em base de peso seco, (SWITZER, 1980) considerado um baixo teor comparado com outras microalgas. Sendo uma boa característica para a alimentação.

Com relação aos minerais, a *Spirulina* representa uma importante fonte, com maior destaque para o ferro.

De acordo com HANSSEN (1982) a quantidade de ferro presente na *Spirulina* é cerca de 10 vezes mais do que a existente no espinafre. A composição aproximada em minerais da *Spirulina* (em mg/kg de peso) é: cálcio 1; fósforo 8942; ferro 580; sódio 412; magnésio 1915; zinco 39; potássio 15400; manganês 25 (HANSSEN, 1982).

2.2.3. Utilizações da *Spirulina* na medicina

O gênero *Spirulina* têm revelado uma surpreendente concentração de compostos incomuns. Nenhum outro alimento natural possui betacaroteno, ácido gama linolênico (GLA), ferro, vitamina B12 e ficocianina em concentrações tão apreciáveis. Isto levou aos pesquisadores considerarem a *Spirulina* como sendo o alimento do futuro. Na área médica esta microalga têm-se demonstrado importante, tanto na prevenção como na terapêutica de diversas patologias (HENRIKSON, 1988). Dentre os efeitos mais importantes já demonstrados experimentalmente ou passíveis de serem obtidos com o uso de *Spirulina*, têm-se:

- a) recuperação de crianças mal nutridas (RAMOS, 1973; SAUTIER, 1976 E MIAO, 1987);

- b) redução do colesterol (DEVI & VENKATARAMAN, 1983; TAKEMOTO, 1984; NAKAVA, 1986). De acordo com esses autores a redução de colesterol pode ser parcialmente devido a alta concentração de GLA contido na *Spirulina*;
- c) regulação da pressão arterial, já que o GLA é um ácido graxo essencial e por ser insaturado (18:3 - 6, 9, 12) é precursor das prostaglandinas, hormônios que controlam muitas das funções essenciais do organismo (TUDGE, 1981);
- d) recuperação de artrites (KUNKEL *et al.*, 1982), de doenças cardíacas (KERNOFF *et al.*, 1977), e recuperação da deficiência de zinco (HUANG *et al.*, 1982);
- e) auxílio no tratamento do alcoolismo, da psicose maníaco depressiva, de certos sintomas de envelhecimento e de esquizofrenia, já que têm sido atribuído parcialmente a deficiência de GLA (HORROBIN, 1981a,b; HORROBIN & HUANG, 1983);
- f) auxílio no controle de certos tipos de câncer, através da ficocianina encontrada na *Spirulina*, que tem mostrado propriedades terapêuticas em neoplasias (HENRIKSON, 1988).
- g) controle da obesidade (HENRIKSON, 1988).

2.2.4. Sistemas de cultivo de *Spirulina*

O cultivo de *Spirulina* pode ser feito, de acordo com RICHMOND (1988), em sistema aberto ou fechado. No sistema aberto são utilizados tanques, que podem ser circulares ou oblongos, rasos, adaptados com agitador de pás ("Paddle wheel"). As áreas dos tanques comerciais variam entre 500 e 5000 m². Esses tanques podem permanecer abertos e expostos à atmosfera ou cobertos com material transparente. O sistema fechado consiste em tubos de polietileno transparentes, com parede de espessura aproximada de 0,3 mm e com diâmetro de 15 cm.

No sistema de cultivo aberto, para produção de *Spirulina platensis*, torna-se obrigatório no inverno, em regiões onde a temperatura pode chegar próxima a 0°C, a cobertura dos tanques. Cobrir os tanques diminui a perda de calor durante a noite, além de reter radiações de comprimento de ondas ao longo do dia.

O sistema fechado possui a vantagem de diminuir as perdas por evaporação, principalmente nas regiões quentes e ensolaradas, que são mais apropriadas para a produção. As perdas por evaporação podem chegar até 2500 mm/ano o equivalente ao volume de 20 tanques. Outra vantagem do sistema fechado é a redução da quantidade de sujidades e contaminantes.

O sistema de tanque fechado possui algumas desvantagens, sendo uma delas ligada a penetração de luz,

marcadamente reduzida devido aos materiais disponíveis para uso nas tubulações; além disso, poeira acumulada na superfície externa, associada a condensação de água na superfície interna, reduz em até 40% a quantidade da radiação que alcança a cultura. Outra desvantagem do sistema é o aumento de cerca de 15% do capital empregado por unidade de área, em relação aos tanques (RICHMOND, 1988).

2.2.5. Princípios do cultivo de biomassa de *Spirulina*

À semelhança das demais algas azuladas, a *Spirulina* é essencialmente fotoautotrófica, não podendo crescer no escuro e em meio contendo fontes de carbono orgânico; entretanto, na presença de luz ela pode utilizar carboidratos. A adição de 0,1% p/p de glucose ao meio de cultivo favorece a velocidade de crescimento e o rendimento das células (KENYON *et al.*, 1972).

Os principais fatores ambientais que governam a produção de massa de *Spirulina* são: nutrientes, pH, salinidade, temperatura e luz. Na prática, a velocidade de crescimento de microalgas fotossintéticas depende da temperatura e luz, podendo ser influenciada por fatores nutricionais (RICHMOND, 1988). Com efeito, a importância da luz e do interrelacionamento com a temperatura na velocidade do crescimento algal já foi demonstrado por VONSHAK *et al.* (1982).

A disponibilidade de luz para cada célula da cultura fotoautotrófica está na dependência da intensidade e duração da radiação, bem como na concentração de células no cultivo (TAMIYA, 1957). A absorção da luz incidente é maior pela célula algal mais próxima da superfície iluminada, decrescendo nas células abaixo, onde a quantidade de luz disponível é menor.

Existe uma relação íntima entre a velocidade de crescimento algal e densidade de população de células. Quanto maior a densidade da população de células, maior a extensão de células que não estão sendo iluminadas em um dado momento; com isso há um menor potencial fotossintético. Estima-se que 400 - 500 mg(peso seco)/l, seja o ótimo para o máximo rendimento de biomassa de *Spirulina* (RICHMOND, 1988). Segundo o autor, a mudança abrupta na concentração celular, o que pode ocorrer por grande diluição, é também prejudicial às culturas de *Spirulina*, principalmente nas cepas que são sensíveis a alta radiação.

O fator básico que modifica os efeitos na densidade da população no cultivo de *Spirulina* é a agitação. Muitas observações indicaram que um fluxo turbulento no tanque representa um requerimento muito importante para a produção máxima. De acordo com RICHMOND & BECKER (1986) a agitação tem várias funções sendo que, a mais importante é assegurar um regime intermitente de luz.

VONSHAK *et al.*, (1982) correlacionaram o efeito da intensidade de luz, temperatura e concentração do oxigênio. Foi observado que no período mais quente do dia, das 11 às 14 h, a intensidade da luz é maior, ocorrendo o mesmo com a concentração do oxigênio.

A temperatura é outro fator de grande importância no cultivo de *Spirulina*. RICHMOND *et al.* (1980), observaram que diferentes cepas de *Spirulina* obtiveram crescimento ótimo nas faixas de temperatura entre 35 e 37°C. Já à temperatura de 40°C tornou-se prejudicial em cultivos abertos. Um aumento de temperatura até 39°C por algumas horas, não causou nenhum efeito maléfico detectável. A temperatura mínima que ainda permite algum crescimento é a de cerca de 18°C. Em cultivos abertos, quando a temperatura máxima é inferior a 12°C, a cultura deteriora. Por outro lado, a *Spirulina* pode, à noite, tolerar temperaturas relativamente baixas (RICHMOND *et al.*, 1980).

Um outro requerimento importante, para o crescimento da *Spirulina* é um meio de alcalinidade elevada, com pH entre 8,3 a 11,0. A *Spirulina* pode tolerar mudanças progressivas no pH, contudo a cultura pode deteriorar rapidamente quando o pH se altera de forma abrupta, o que pode ocorrer em um meio de cultivo que não é bem tamponado. Uma boa capacidade tamponante para o meio pode ser obtida com bicarbonato de sódio 2,2 M (ZAROUK, 1966).

O nitrato, constitui a principal fonte de nitrogênio para a *Spirulina*; contudo, sais de amônio podem ser usados, desde que a concentração do NH_4^+ seja menor do que 100 mgN/l. A uréia pode ser empregada sem inconveniente no pH 8,4, desde que sua concentração seja inferior a 1,5 g/l.

As ficocianinas podem também servir como fonte de reserva de N. Quando o nível de nitrogênio disponível no meio diminui ou quando o cultivo está completamente desprovido de nitrogênio, é observado uma diminuição correspondente no conteúdo de ficocianina na célula (BOUSSIBA & RICHMOND, 1980).

2.2.6. Colheita e secagem da *Spirulina*

Remover a microalga do meio de crescimento onde a célula cresce numa suspensão diluída (400-800 mg/l), constitui uma das grandes dificuldades do processo. A primeira etapa de colheita consiste na filtração. Através dessa operação consegue-se aumentar a quantidade de biomassa por unidade de volume. A dificuldade da colheita é atenuada com a *Spirulina*, uma vez que seus filamentos são bastante longos facilitando sua remoção do meio de crescimento por filtração. Atualmente, algumas plantas de produção usam peneiras vibratórias para a colheita de *Spirulina*. Este processo contudo, pode causar injúria à célula.

Deve ser ressaltado que, quando o processo de colheita é acompanhado por injúria celular, o fluxo que retorna ao tanque de cultivo oriundo do processo de filtração torna-se rico em matéria orgânica, proporcionando vantagens para competidores mixotróficos e heterotróficos. Sendo assim, é critério básico na colheita de *Spirulina* que a biomassa seja removida de tal maneira a não ocorrer rompimento das células. Porém, um sistema de colheita ideal não foi ainda desenvolvido. "Microstraining" é outro método que pode ser usado para colheita de *Spirulina*; entretanto, os detalhes técnicos desse sistema ainda não estão disponíveis (RICHMOND, 1988).

O processo de secagem constitui um problema de grande importância econômica na produção comercial de *Spirulina*. Os vários sistemas de secagem diferem no montante do capital investido e na necessidade de energia utilizada no processos, e influenciam marcadamente no custo e no sabor do produto.

O método mais adequado para secagem de *Spirulina* é através de "Spray-drying", do qual resulta um produto de melhor qualidade. Secagem em "Roller-drying" (tambor) também fornece um produto adequado na forma de flocos, de especial aroma, sabor e consistência, para o qual pode haver uma demanda comercial.

A secagem da *Spirulina* inicialmente era feita ao sol; este processo, entretanto, não é recomendado para

produção da microalga para uso na alimentação humana devido ao odor desagradável causado pela lentidão do processo de secagem, propiciando uma certa degradação do produto. A secagem ao sol também não expõe o produto à temperaturas elevadas (da ordem de 120°C), e em decorrência apresenta uma maior contagem de contaminantes (RICHMOND, 1988). Um método alternativo é a secagem em estufas com circulação de ar, que permite a aceleração do processo.

2.3. Contaminantes bióticos em cultivo de microalgas

Manter uma cultura monoalgal é um dos grande desafios encarados pelos produtores de biomassa algal. Naturalmente o cultivo de monoculturas de alga em sistema aberto é comprometido principalmente pela contaminação de outras algas, bactérias, fungos, vírus, protozoários e zooplanctons. Esses contaminantes reduzem a uniformidade do produto e podem influenciar muito na redução do rendimento e da qualidade de biomassa. Os critérios usados no controle dos contaminantes são baseados na manutenção das condições ótimas de cultivo da alga cultivada, promovendo seu crescimento e inibindo os organismos indesejáveis (RICHMOND, 1986).

2.3.1. Contaminação por outras microalgas

Fatores como nutrientes, luminosidades pH e temperatura têm sido apontados como seletivos no sistema de produção algal. MUR *et al.* (1975) relataram que a luz é um fator seletivo na competição entre algas verdes e cianobactérias. Sugeriram que o sombreamento proporciona condições mais favoráveis para algas verdes-azuladas do que algas verdes.

A temperatura é um fator de destaque para predominância do cultivo monoalgal. As relações de dominância entre várias espécies de fitoplâncton de acordo com a temperatura, foram descritas por GOLDMAN (1979a,b). É fundamental que a temperatura no tanque não desvie em demasia da temperatura ótima da espécie cultivada, para a manutenção de monocultura algal. VONSHAK *et al.* (1983) estudaram o efeito deste fator na competição de *Spirulina* com *Chlorella* em sistema de cultivo aberto. O crescimento da *Spirulina platensis* diminuiu com a chegada do inverno quando a temperatura diária tornou-se muito baixa. Uma cepa de *Chlorella vulgaris* a qual, possui temperatura ótima de 10°C mais baixa do que a da *Spirulina*, dominou o cultivo. O aumento da temperatura em 8°C através do uso de uma cobertura de polietileno, permitiu o restabelecimento do crescimento da *Spirulina* e o decréscimo da população de *Chlorella*.

A concentração de bicabornato constitui outro parâmetro importante no cultivo. RICHMOND *et al.* (1982) e VONSHAK *et al.* (1982), elucidaram as condições de cultivo que afetam *Spirulina* e *Chlorella vulgaris* em tanques abertos sob condição de baixa concentração de bicabornato, por exemplo, 4 g/l, o que representa 25% da concentração padrão de ZAROUK (1966). Essa concentração foi suficiente para suportar a velocidade de crescimento máximo da *Spirulina*. Contudo, nesta concentração de bicabornato, um significativo aumento da contaminação pela *Chlorella* foi observado. A contaminação do cultivo de *Spirulina* pela *Chlorella*, também foi afetado pelo sistema de colheita. Quando realizada em peneira vibratória de 375 mesh, não reteve as células de *Chlorella* as quais retornaram ao tanque. Nessas condições mais de 80% da biomassa algal no tanque pertenciam a outras espécies que não a *Spirulina*. Na realidade foi impossível manter uma cultura monoalgal de *Spirulina platensis* em sistema aberto mesmo com 8 g/l de bicabornato. A dominância da *Spirulina*, com o sistema de colheita já mencionado anteriormente, somente pode ser mantido com 16 g/l de bicabornato.

Além do bicabornato, o CO₂ gasoso exerceu uma influência decisiva na competição entre as duas algas, sendo isto claramente evidenciada por RICHMOND *et al.* (1982) em uma cultura mixta de *Spirulina* e *Chlorella* cultivada em um turbidostato. Quando o CO₂ foi retido pela substituição da

corrente de ar enriquecido com 1,5% de CO_2 , com ar livre de CO_2 , ocorreu um imediato e agudo declínio da população de *Chlorella*. Com o restabelecimento de CO_2 ocorreu uma recuperação na população de *Chlorella* alcançando a mesma densidade populacional anterior ao interrompimento do suprimento de CO_2 . O declínio acentuado na população de *Chlorella*, de acordo com o autor, foi mais uma consequência da elevação do pH, (o que ocorreu quando o CO_2 foi suprimido), do que a eliminação do CO_2 por si só.

As cianobactérias são relatadas como sendo mais eficiente do que as algas verdes em condições de baixas concentrações de CO_2 . Dessa forma quando o pH se eleva, como nos tanques enriquecidos, as cianobactérias predominam. Da mesma forma a adição de nutrientes e CO_2 resultaram em um exacerbado aumento da população de algas verdes em detrimento das cianobactérias (SHAPIRO, 1972).

2.3.2. Contaminação por bactérias

Não existe evidências de que bactérias possam influenciar diretamente a população algal nos cultivos bem conduzidos.

DAFT *et al.* (1975) realizaram alguns estudos a respeito de injúrias em microalgas, provocadas por certas mixobactérias. HUESSLER *et al.* (1978) relataram que isolaram 100 cepas de bactérias em cultivo de algas sadias e doentes. Aproximadamente 75 dessas cepas foram nocivas para

Scenedesmus quando inoculadas individualmente em cultivo dessas algas com crescimento estacionário. Entretanto, nas culturas jovens e em pleno desenvolvimento, não foram verificados prejuízos à célula algal. Além disto, poucas bactérias puderam ser isoladas nessas culturas. Portanto, não existe evidências de que as bactérias possam, por si só, limitar a população algal nos cultivos bem conduzidos e com rápido crescimento.

FAGGI (1980) desenvolveu na Itália, estudos a respeito da microbiota contaminante (bactérias, bolores e leveduras) de "geléia" e *Spirulina* e *Spirulina* em pó, provenientes de cultivos em tanques abertos e em sistema fechado (tubos). Os resultados mostraram que as contagens totais de bactérias, fungos e de leveduras foram menores no sistema fechado do que em sistemas abertos, tanto para geléia quanto na *Spirulina* em pó.

SCOTT & SHUTTER (1981) sugeriram que, sendo as mixobactérias menos específicas do que os vírus com relação a faixa de hospedeiros, provavelmente devam ser mais importantes em afetar a população algal, merecendo mais estudos.

2.3.3. Contaminação por fungos

Os fungos que parasitam algas de água doce são denominados CHYTRIDIALES. Assemelham-se a um grupo de fungos

primitivos, descobertos parasitando várias algas. Podem ocorrer de forma epidêmica destruindo, desta forma, gerações inteiras de células hospedeiras.

Características morfológicas têm sido usadas na identificação de espécies de fungos aquáticos. MULLER & SENGBUCH (1983) valeram-se da microscopia por fluorescência para melhor visualização das estruturas parasíticas de tais fungos.

Em uma população mixta de algas de um mesmo plancton, parasitada por fungos de forma epidêmica, verificou-se que, cada espécie foi atacada por um fungo diferente. Isto indica que há especificidade de fungo para uma pequena faixa de hospedeiro. Há fortes indícios de que há estreita correlação entre certos parâmetros culturais e as epidemias fúngicas (MULLE & SENGBUCH, 1983; BLINN & BUTTON, 1973; ABELIOVICH & OICKBUCH, 1977).

CANTER & JAWORSKI (1983) estudaram parasitismo da *Fragilaria crotonensis* por fungos *Chytridiaceos* e constataram forte especificidade nas relações parasito e hospedeiro. Descobriram também que, em clones diferentes da *Fragilaria crotonensis*, há variações na susceptibilidade com relação ao parasitismo por *Chytrideos*.

De acordo com HUESSLER *et al.* (1978) e SOEDER & MAIWEG (1969) *Chytridium sp* ocorrem em cultivos a céu aberto parasitando células de *Scenedesmes* associado geralmente com o flagelado *Aphelidium*. Segundo os autores, esses parasitas

ainda não se expandiram a ponto de se tornar um grande problema no cultivo de algas.

MULLER & SENGBUCH (1983) relataram que o desenvolvimento de fungos no cultivo de microalgas pode ser afetado por diversos fatores externos. Na inter-relação entre o parasito e o hospedeiro, a temperatura parece ser o fator mais importante que governa o parasitismo por chytrideos (MULLER *et al.* 1967 e BLINN & BUTTON, 1973).

Com iluminação, a adesão para as células hospedeiras aumenta consideravelmente. De acordo com MULLER *et al.* (1967) e CANTER & JAWORSKI (1981) os zoosporos podem permanecer vivo no escuro, porém, o grau de adesão às células hospedeiras é baixo.

2.4. Outros contaminantes bióticos

Além das bactérias e fungos, uma suspensão relativamente rica organicamente, como ocorre no cultivo de massa algal, está sujeita também a outros contaminantes como vírus, protozoários e zooplanktons.

Apesar de não existir relatos da ocorrência de vírus em *Spirulina*, PADAN & SHILO (1973) e RICHMOND (1988), documentaram a ocorrência desses em cianobactérias (*Plectonema* sp). Esses vírus, denominados cianófagos, têm sido responsabilizados em ser uma das possíveis causas das algas verde-azulada raramente alcançarem um alta densidade nos tanques. PADAN & SHILO (1973), relataram que as

interações dos cianófagos com as células hospedeiras são muito influenciadas pelas condições ambientais. Os cianófagos toleraram bem a alcalinidade, condição essa favorável ao desenvolvimento de cianobactérias.

A temperatura afeta a sobrevivência de fagos livres assim como o desenvolvimento do cianófago na célula hospedeira. Alguns cianófagos mostram similar sensibilidade a temperatura; 85% de partículas de fagos livres permaneceram infectivo à temperatura de até 40°C, enquanto somente 55% infecta a 45°C e menos do que 0,001% à 50°C (PADAN & SHILO, 1973). A complexidade da interação alga e cianófagos depende não somente de propriedades inerentes a ambos, fago e hospedeiro, mas também da flutuação dos fatores ambientais. É indispensável conhecer-se esse aspecto.

Outros organismos mencionados que interferem na produção de massa algal, são os protozoários. De acordo com GROBBELAAR (1981), o predomínio de uma espécie de alga sobre a outra pode ser afetado pela presença de protozoários. O mesmo observou que o cultivo de *Chlorella* sp. foi dominado por *Scenedesmus* sp. num período de 5 dias, em consequência da contaminação pelo *Stylonichia* sp. CANTER & LUND (1968) ao investigar o papel de protozoário em controlar a abundância de plancton nos lagos, descobriram que *Pseudosporos* podem reduzir a população algal em quase 100% em uma ou duas semanas.

Dentre os protozoários predadores de cianobactérias filamentosas, o gênero *Nassuda* parece ser o mais importante de acordo com GOULDER (1972). Algumas espécies de amebas predadoras de algas foram descritas por, HUANG & WU (1982).

HO et al. (1974), estudaram a influência de variáveis ambientais, tais como temperatura e pH na velocidade reprodutiva de protozoários, principalmente o gênero *Ameba*.

Os zooplankton presente nos tanques de cultivo são outros organismos que podem afetar a produção de biomassa algal (WHLMANN, 1971). LOOSANOFF et al. (1957) reportaram que a maior dificuldade encontrada no cultivo de *Chlorella vulgaris* em larga escala foi a invasão da cultura por zooplankton. Dentre esses os mais comuns foram os crustáceos, especialmente os membros da *Subelose copedada*.

Informações à respeito de contaminantes em cultivo de biomassa algal são relativamente complexas. Dentre os vários fatores, um dos principais é que o estudo do parasitismo depende da cultura tornar-se infectada, o que geralmente não pode ser reproduzido exatamente sob condições controladas. As infecções ocorrem ocasionalmente e são relatadas como observações casuais realizadas durante o decorrer normal do sistema de cultivo a céu aberto (GROBBELAAR, 1981).

2.5. Objetivos

O presente estudo teve por objetivos:

- a) Verificar participação de certos grupos de microrganismos durante o cultivo de *Spirulina* em tanques abertos;
- b) Verificar as modificações da microbiota durante o processo de obtenção da geléia e da secagem da *Spirulina*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostragem para avaliação de contaminações nos tanques na "geléia" e na *Spirulina* em pó

Foram analisadas, nos anos de 1990 e 1991, 54 amostras de água de cultivo de *Spirulina*, provenientes de quatro tanques identificados como A, B, C e D; 28 amostras de "geléia" de *Spirulina* (biomassa obtida após filtração) e 37 de *Spirulina* seca. Todas as amostras foram provenientes de uma empresa que produzia *Spirulina* em larga escala, localizada no Rio de Janeiro.

Resumidamente, o fluxograma do processo da indústria consistia de: cultivo em tanques circulares de 500 m² cada, com meio recomendado por ZAROUK (1966), entretanto com 6 g/l de $\text{HCO}_3^- + \text{CO}_3^{=}$ dotados de sistema de distribuição de CO_2 , e agitação através de agitadores de pá ("paddle-wheel"); pré-concentração do líquido de cultivo em peneira de 60 μ , com retorno do meio para o tanque; filtração à vácuo do pré-concentrado para formação da "geléia" de *Spirulina* (80-85% de umidade); extrusão da

"geléia" para formação de fitas com 2-3 mm de *Spirulina*; secagem em estufa com circulação de ar em temperatura de 60°C por um período de 15-18 h; resfriamento e moagem da *Spirulina* seca; embalagem em sacos polietileno.

As amostras de água dos tanques foram colhidas após passarem pelos agitadores ("paddle wheel"), utilizando-se frascos de vidros esterilizados, com capacidade de 300-500 ml. Procurou-se assim uma maior homogeneidade visto ser a zona de maior turbulência dos tanques.

As amostras de "geléia" foram colhidas logo após sua obtenção e acondicionadas em sacos de polietileno.

As amostras de *Spirulina* seca foram obtidas após processo de secagem e uniformização da partida, sendo acondicionadas da mesma forma que a "geléia".

Com excessão da *Spirulina* em pó, as demais amostras foram transportadas sob refrigeração (caixa de isopor com gelo) e logo analisadas.

3.2. Amostragem para experimentos específicos

3.2.1. Para verificar o desenvolvimento da microbiota na geléia

Para estudar o crescimento de grupos específicos de bactérias durante a permanência da "geléia" à temperatura de 35°C, amostras do produto foram distribuídas em camadas de 1 a 2 cm em placas de Petri esterilizadas, as quais foram mantidas em estufa a 35°C±1°C por um período de até 24 h.

Nas 10 primeiras horas, as análises foram feitas a cada 2 horas. Posteriormente foi feita uma análise do produto estocado por 24 h. Foram feitas três repetições.

3.2.2. Para verificar o comportamento da microbiota durante o processo de secagem

Neste caso, "geléia" de *Spirulina* após a extrusão (espessura de 2-3 mm), foram colocadas sobre telas de aço inoxidável de 10x15 cm, e submetidas a secagem a estufa FANEM (modelo 120/2) com circulação forçada de ar. Para controle das condições de secagem, utilizou-se de um "termopar" marca Omega, de 11 canais, dois dos quais foram empregados para medir a temperatura no interior da "geléia" e outro para medir a temperatura ambiente da estufa.

A temperatura era tomada a cada 10 minutos. A cada hora, por um período de 06 horas, uma das grades era colhida para análise microbiológica (CPP e contagem em Agar EMB) e determinação da umidade. Posteriormente foi feita uma análise com 24 horas.

Foi realizado um experimento a 60°C (temperatura do ar da estufa) e outro a 70°C.

3.2.3. Para verificar a relação entre as contagens nos tanques e nas geléias

Para este estudo, foram feitos experimentos (quatro repetições) colhendo-se água dos tanques de cultivo

juntamente com a geléia que estava sendo produzida no momento, conforme metodologia já descrita. Foram feitas as CPP, contagem Agar EMB e contagens bolores e leveduras em (ABD).

As amostras de geléia foram colhidas logo após sua obtenção no filtro à vácuo, e acondicionadas em frascos esterilizados.

As amostras de alga seca foram obtidas após processo de secagem, moagem, uniformização e embalagem em saco de polietileno.

Todas as amostras foram transportadas ao laboratório logo após a colheita e mantidas sob refrigeração (exceto a alga em pó) até serem analisadas, o que foi feito em um período máximo de duas horas.

3.3. Análises microbiológicas

3.3.1. Preparo das amostras e das diluições

As amostras das águas do cultivo foram diretamente utilizadas para a obtenção das diluições decimais, feitas pela transferência de 1 ml de amostra para 9,0 ml de tampão fosfato pH 7,0 esterilizado.

No caso das "geléias" e de *Spirulina* seca, pesou-se 25 gramas em condições assépticas e procedeu-se a homogeneização em 225 ml de tampão fosfato pH 7,0 no liquidificador. A partir da diluição 10^{-1} assim obtida, foram feitas diluições decimais.

Foram seguidos os cuidados recomendados pela APHA (1984).

3.3.2. Exames realizados

3.3.2.1. Contagem total de bactérias mesófilas (CPP e CPP/sp)

Foi efetuada nas amostras de águas dos tanques, amostras de "geléias" e alga seca. Esta determinação foi realizada em meio Agar Contagem Padrão - Merck (denominada CPP) e no mesmo meio enriquecido com 0,1% de *Spirulina* em pó (denominada CPP/sp). A inoculação foi feita em superfície, utilizando-se alíquota de 0,1 ml da diluição selecionada. As placas foram incubadas à $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, sendo as contagens das colônias realizadas após 03 e/ou 07 dias de incubação.

3.3.2.2. Contagem de microrganismos gram-negativos lactose positivo. (Agar EMB)

Foi efetuada nas amostras de águas dos tanques, amostras de "geléias" e alga seca.

Em placas contendo o meio Agar-Eosina-Azul de Metileno-Lactose, segundo Levine-Merk (Agar EMB) inoculou-se alíquota de 0,1 ml da diluição selecionada sobre a superfície do meio, espalhando-se o inóculo com auxílio da alça de Drigalsky por toda a superfície. As placas foram incubadas à $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, sendo as leituras feitas em 03 e/ou 07 dias.

3.3.2.3. Contagem de microrganismos proteolíticos - (Agar leite)

Foi realizada nas amostras de águas dos tanques, "geléias" e alga seca. O meio utilizado foi o Agar Contagem Padrão (Merck), adicionado de 1,0% de leite desnatado esterilizado (Marca Molico, da firma Nestlé), pH 7,0. A inoculação foi feita na superfície do meio, utilizando-se 0,1 ml como inóculo da diluição selecionada. As placas foram incubadas à $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por até 03 dias. A leitura foi feita contando-se as colônias com halo característicos de proteólise, posteriormente confirmadas pela adição de HCl a 1% sobre a superfície do meio de cultura (APHA, 1984).

3.3.2.4. Contagem presuntiva de estreptococos (Agar-Azida)

Foi efetuada nas amostras de águas dos tanques, "geléias" e alga seca. Placas contendo o meio Azida (Merck) foram semeadas com 0,1 ml da diluição selecionada, na superfície do meio e incubadas à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. As leituras foram feitas com 03 e 07 dias de incubação, contando-se todas as colônias desenvolvidas.

3.3.2.5. Contagem de Bolores e Leveduras (ABD)

Foi efetuada nas amostras de águas dos tanques, "geléias" e alga seca. Foi empregado o meio Agar Batata Dextrose - Merck (ABD), com pH ajustado no momento do uso à

3,5 pela adição de solução estéril de Ácido Tartárico (Merck) à 10%. A inoculação foi feita por incorporação, utilizando-se alíquota de 1,0 ml da diluição selecionada. A incubação foi feita à $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por até 07 dias, sendo feita a contagem de todas as colônias desenvolvidas.

3.3.2.6. Contagem de microrganismos sulfito redutores (Agar SF)

Foi efetuada nas amostras de águas dos tanques, "geléias", e alga seca. Esta determinação visou avaliar a população de clostrídeos sulfito redutores, freqüentemente envolvidos na deterioração de material proteico.

Foi inoculada uma alíquota de 1,0 ml das diluições selecionadas em tubos contendo meio Agar sulfito-ferro (Agar-SF), previamente fundido. O tubo foi homogeneizado e após solidificar foi colocado uma camada de Vaspar (50% vaselina, 50% parafina) na superfície do meio. A incubação foi feita à $44,5^{\circ}\text{C}$ por 03 dias, quando se contou todas as colônias presentes que apresentavam halo negro.

3.3.2.7. Contagem de microrganismos em meio de nitrato (Agar nitrato^A; Agar nitrato^B)

Foi efetuada somente nas amostras de águas dos tanques. Para esta determinação utilizou-se os meios Caldo nitrato (Merck), adicionado de 1,8% de Agar (Agar nitrato^A) e o meio contendo NO_3^- (Agar nitrato^B), com a seguinte

composição (em g/l): glicose, 100; Na_2HPO_4 , 2,0; NaCl , 3,0; KNO_3 , 1,5; Extrato de Levedura, 3,0 e Agar, 18,0. Em ambos os meios, foi semeada alíquota de 0,1 ml das diluições selecionadas sobre a superfície do Agar. As placas foram incubadas à $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, por até 07 dias, sendo as leituras feitas em 03 e/ou 07 dias de incubação, contando-se todas as colônias desenvolvidas.

3.3.2.8. Contagem presuntiva de estafilococos (Agar BP)

Foi efetuada nas amostras de "geléias" e alga seca. Inoculou-se 0,1 ml das diluições selecionada na superfície de placas contendo o meio Agar Baird-Parker (Merck), sendo a incubação à $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ e examinando-se as placas após 24-48 h para contagem de colônias. Fez-se a contagem total das colônias desenvolvidas, bem como observou-se se haviam colônias típicas de *S. aureus*.

3.3.2.9. Contagem de coliformes totais e fecais

Os coliformes totais foram pesquisados pelo método do número mais provável (NMP), compreendendo as seguintes etapas: teste presuntivo e teste confirmativo.

a) Teste presuntivo

Foram retiradas alíquotas em triplicata de 10 e 1 ml da diluição 10^{-1} e de 1 ml das demais diluições, as quais foram inoculadas em caldo Lauril-Sulfato-Triptose (CLST), da Merck, em concentração dupla para as alíquotas de 10 ml e simples para as demais; os tubos de CLST foram incubados a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24-48h, sendo considerado positivo a presença de gás nos tubos de Durhan.

b) Teste confirmativo

Dos tubos positivos no teste presuntivo foram repicadas alçadas do crescimento para tubos contendo Caldo Verde Brilhante-Lactox-Bile 2% - CVBLB (Merck) para confirmar a presença de coliformes totais, bem como para tubo contendo Caldo *E. coli* - meio EC - Merck para evidenciar-se a presença dos coliformes fecais. Os tubos de VCBLB foram incubados a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em estufa por 24-48 h e os de meio EC, em banho termostado com circulação (FANEM, S. Paulo, mod. 120/2) a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, por 24h. Os tubos que apresentaram produção de gás foram considerados positivos e o N.M.P. de coliformes totais e fecais foi determinado em tabela para a série de três tubos (APHA, 1976).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em uma suspensão relativamente rica de compostos orgânicos, tal como é o cultivo de *Spirulina* que emprega o sistema de retorno da solução mineral após a peneiragem para pré-concentração da microalga, também ocorre o desenvolvimento de outros microrganismos. Os dados contidos na tabela 01, dão uma idéia da contaminação bacteriana e fúngica nos tanques de cultivo industrial da Microalga S/A. Como se pode observar, a Contagem Padrão em Placas (CPP) pode variar da ordem de 10^1 a 10^7 UFC/ml, com predominância entre 10^4 e 10^6 UFC/ml. Nota-se que, as contagens efetuadas em 07 dias, de um modo geral, foram mais elevadas do que as realizadas em 03 dias, possivelmente devido ao tipo de microbiota bacteriana desenvolvida nos tanques, adaptada às condições de alta alcalinidade. Em meio enriquecido com *Spirulina*, com contagens em 07 dias, obteve-se maiores proporções de contagens elevadas, mostrando que, a microalga pode fornecer nutrientes que estimulam o desenvolvimento de certas espécies.

Tabela 01. Distribuição das contagens totais de mesófilos (CPP; CPP/sp), de bolores e leveduras (ABD); de bactérias que utilizam nitratos (Agar nitratog, Agar nitratog_A, Agar nitratog_B); bactérias proteolíticas (Agar leite); bactérias gram negativas (Agar EMB); estreptococos presumptivos (Agar Azida), estafilococos presumptivos (Agar B.P.) e bactérias sulfito redutoras (Agar S.R) em cultivos de *Spirulina* em tanques abertos. Resultados expressos em URG/ml.

Tipos de Contagem	Total de Análises	≤ 10		10-10 ²		10 ² -10 ³		10 ³ -10 ⁴		10 ⁴ -10 ⁵		10 ⁵ -10 ⁶		10 ⁶ -10 ⁷		> 10 ⁷	
		n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%
CPP ^a	21			2	9,5	4	19,0	4	19,0	6	28,6	4	19,0	1	4,8		
CPP ^b	21					3	14,3	3	14,3	9	42,9	4	19,0	2	9,5		
CPP/sp ^a	22					2	9,1	6	27,3	7	30,4	5	21,7	1	4,5	1	4,5
CPP/sp ^b	18									8	44,4	8	44,4	2	11,1		
ABD ^b	21	3	14,3	10	47,6	7	33,3	1	4,8								
Agar nitratog ^a	25							4	16,0	6	24,0	11	44,0	4	16,0		
Agar nitratog ^a	23	4	17,4	4	17,4	8	34,8	7	30,4								
Agar leite ^a	17	2	11,8	6	35,3	6	35,3	3	17,6								
Agar EMB ^a	18	10	55,6	4	22,2	2	11,1	2	11,1								
Agar Azida ^a	22			1	4,5	10	45,5	10	45,5	1	4,5						
Agar B.P. ^a	19	4	21,1	8	42,2	7	36,8										
Agar S.F. ^a	20	20	100,0														

a - Leitura realizada com 03 dias.

b - Leitura realizada com 07 dias.

Ainda em relação às bactérias, contagens no meio Agar nitrato^A forneceram, em 03 dias, resultados semelhantes ao de PCA/sp com 07 dias, com elevada incidência entre 10^4 e 10^6 UFC/ml, sugerindo ser o meio mais indicado para enumeração de bactérias totais em águas de tanques de cultivo. Já o meio Agar nitrato^B, que contém NO_3^- como principal fonte de nitrogênio, embora não adequado para enumeração total, fornece uma boa noção sobre a população microbiana que utiliza NO_3^- , fonte inorgânica de N adicionada ao meio. Observa-se portanto que, os níveis desta população situam-se entre 10^2 e 10^4 em mais de 50% das amostras, estando as restantes com contagens inferiores. Isto indica que ocorre quebra de células da microalga durante a colheita (bombeamento para a peneira e peneiramento) permitindo a liberação para o meio de cultivo de outras fontes de N para a microalga. Este problema, já salientado por RICHMOND (1988), leva ao aumento da disponibilidade de fontes, tanto de N como de C orgânico no meio de cultivo. Nesta tabela observa-se também que, bactérias proteolíticas estão presentes no cultivo, e que estas poderão causar problemas na qualidade do produto. Apesar das contagens terem sido mais baixa (entre 10 e 10^4 UFC/ml) que a população total de bactérias, já mostra que há um potencial de risco para a deterioração por este grupo.

Contagens totais de bactérias realizada por SCOTT & SHUTTER (1981) em tanques de cultivo aberto de laboratório, mantido em regime de rápido crescimento algal, mostraram níveis entre 1 e 5×10^3 UFC/ml. O pequeno tamanho da população bacteriana encontrada, segundo o autor, pode ser devido à ação da radiação U.V. da luz incidente ou devido a interação alga e bactéria. O autor salienta que, uma vez ocorrendo deterioração no tanque e o conseqüente aumento da carga orgânica, a contagem bacteriana pode aumentar rapidamente, por uma ou mais ordens de grandeza.

A população de bactérias gram negativas lactose positivos foi avaliada em meio Agar EMB (Tabela 01). Verificou-se que na maioria das amostragens (55,6%) as contagens foram abaixo de 10 UFC/ml, estando o restante entre 10 e 10^4 UFC/ml. O potencial de inóculo deste grupo para o produto é de grande importância, inclusive pela probabilidade da presença de enterobactérias. Em dados que serão discutidos posteriormente, verifica-se que o grupo coliforme também está presente. Estudos desenvolvidos por SCOTT & CHUTTER (1981) indicam que os microrganismos capazes de causar lise em alga de água doce, são geralmente bastonetes, aeróbicos, flagelados, gram negativo. Vê-se pelos resultados, portanto, que no próprio tanque já há uma carga relativamente grande do grupo.

A população de cocos gram positivos (Tabela 01), especialmente dos *Streptococcus*, foi avaliadas em meio Agar Azida. Verificou-se que, em mais de 90% das amostras, os

níveis foram entre 10^2 e 10^4 UFC/ml. Já os *Staphylococcus* de um modo geral, juntamente com alguns grupos capazes de se desenvolverem em meio Agar B.P., em mais de 75% das amostras foram detectados em níveis de 10 e 10^3 UFC/ml.

Um grupo que não foi observado neste ambiente foi o de bactérias sulfito-redutores, examinado em Agar S.F. (Tabela 01), muitas vezes responsável pelo desenvolvimento de odores em produtos proteicos em degradação.

Já com relação aos bolores e leveduras, os níveis detectados nas águas de cultivo foram bem mais baixos do que o das bactérias totais, situando-se entre 10 e 10^3 UFC/ml em mais de 80% dos casos (Tabela 01). Com efeito, MULLER & SENG BUSH (1967) afirmam que o crescimento de fungos pode ser afetado por vários fatores externos, tais como temperatura, luz e concentração de oxigênio, dentre outros, e que esses organismos não se difundem a ponto de tornar-se um problema no cultivo de algas.

A tabela 02, mostra a oscilação das CPP e contagens em Agar EMB em amostras de quatro tanques (A, B, C e D) de produção industrial. É interessante notar-se a grande dispersão entre os resultados das contagens totais (principalmente entre 10^2 e 10^7 UFC/ml) e dos gram negativos (entre 10^1 e 10^3 UFC/ml). Observa-se também que, não houve grandes diferenças de contagens entre os tanques B e C e que os tanques A e D tiveram amostras com níveis já elevados, indicando possíveis problemas, como por exemplo, necessidade de limpeza.

Tabela 02. Distribuição de Contagens Padrão em Placas (CPP) e de bactérias gram negativas (Agar ENB), em quatro tanques (A, B, C e D) de cultivo de *Spirulina*. Resultados em UFC/ml. Leituras feitas após 07 dias de incubação.

Distribuição	Nº de Amostras	≤ 10	10-10 ²	10 ² -10 ³	10 ³ -10 ⁴	10 ⁴ -10 ⁵	10 ⁵ -10 ⁶	10 ⁶ -10 ⁷
		$\frac{n^0}{n} \%$	$\frac{n^0}{n} \%$	$\frac{n^0}{n} \%$	$\frac{n^0}{n} \%$	$\frac{n^0}{n} \%$	$\frac{n^0}{n} \%$	$\frac{n^0}{n} \%$
CPP								
Tanque A	6			1 16,7		1 16,7	2 33,3	2 33,3
Tanque B	2			1 50,0		1 50,0		
Tanque C	2				1 50,0	1 50,0		
Tanque D	7	1 14,3		1 14,3	1 14,3	1 14,3	2 28,6	1 14,3
Agar ENB								
Tanque A	6	3 50,0	1 16,7		2 33,3			
Tanque B	2	1 50,0	1 50,0					
Tanque C	2	1 50,0	1 50,0					
Tanque D	7	5 71,4		2 28,6				

No processo de colheita da *Spirulina*, inicialmente o cultivo é passado por peneiras com malha de 50-60 μ para uma pré-concentração e, posteriormente, esta suspensão com cerca de 100 vezes mais biomassa, é filtrada a vácuo, tornando-se uma "geléia" (com 80-85% de umidade), a qual pode sofrer lavagens com água acidulada. A "geléia" segue posteriormente para outra fase do processamento (resfriamento, congelamento ou secagem), sendo que sua qualidade microbiológica pode influenciar muito o produto final, dependendo da tecnologia empregada. No caso da Microalga S/A a geléia, após formada, sofria um processo de extrusão (em temperatura ambiente) de forma a dar origem a "fitas" de *Spirulina* de 2 a 3 mm de espessura e 10-15 cm de largura, as quais eram distribuídas em bandejas para secagem. Pela tabela 03, têm-se um quadro das contagens observadas para o produto, contendo 80-85% de umidade, obtida após a fase de filtração a vácuo (formação de geléia). Pode-se observar que a maioria das contagens totais (CPP e CPP/sp) foram superiores a 10^5 UFC/g, com predominância entre 10^5 e 10^7 UFC/g, maiores portanto do que as observadas para a água de cultivo (10^4 - 10^6 UFC/ml) em cerca de 1 ciclo.

Entretanto, outras contagens mostraram um aumento muito maior que as CPP. As contagens em Agar leite (Tabela 03) predominaram entre 10^3 e 10^6 , as em Agar EMB entre 10^4 e 10^7 , as em meio Agar Azida entre 10^6 e 10^7 e as em Agar BP entre 10^1 e 10^5 UFC/g. Nesta fase, mais de 30%

Tabela 03. Distribuição das contagens totais de mesófilos (CPP e CPP/sp); de bolores e leveduras (ABD); de bactérias proteolíticas (Agar leite); bactérias gram-negativas (Agar ENB); estafilococos presuntivos (Agar Azida); estafilococos presuntivos (Agar B.P.) e bactérias sulfito redutoras (Agar S.F.) em cultivos de *Spirulina* em "geléia" de *Spirulina*. Resultados expressos em UFC/g.

Tipos de Contagem	Total de Análises	≤ 10	10-10 ²	10 ² -10 ³	10 ³ -10 ⁴	10 ⁴ -10 ⁵	10 ⁵ -10 ⁶	10 ⁶ -10 ⁷	> 10 ⁷
		n°	%	n°	%	n°	%	n°	%
CPP ^a	8								
CPP ^b	8								
CPP/sp ^a	6								
CPP/sp ^b	6								
ABD ^b	13	1	7,8	5	38,5	4	30,8	1	7,8
Agar leite ^a	5								
Agar ENB ^a	6								
Agar Azida ^a	8								
Agar B.P. ^a	3								
Agar S.F. ^a	9	6	66,7	3	33,3				

a - Leitura realizada com 03 dias.

b - Leitura realizada com 07 dias.

das amostras já apresentaram também contagens em Agar S.F. Uma elevação nos níveis de bolores e leveduras foi observada, porém não tão grande quanto os de bactérias. A predominância para mais de 65% das amostras foi entre 10^2 e 10^3 UFC/g, mas cerca de 20% estavam com contagens entre 10^3 - 10^5 UFC/g.

Os resultados, de um modo geral, foram semelhantes aos obtidos por FAGGI (1980), que examinou amostras de geléia proveniente de colheitas de tanques abertos (T.A.) e de cultivo em tubos plásticos (CTP), na Itália. Em Agar nutritivo, as contagens foram da ordem de 10^5 e de 10^6 UFC/g para as amostras produzidas em TA e em CTP, respectivamente. Já os níveis de fungos foram de 10^4 (TA) e 10^5 UFC/g (CTP), em Agar Azida de 10^4 e nos meios Agar Desoxicolato e Agar Sal-manitol menor que 10^4 UFC/g. Estes dois últimos meios foram substituídos por Agar EMB e Agar B.P., respectivamente, no presente trabalho.

No caso das algas secas, obtidas no mesmo período em que foram colhidas as amostras de águas e geléia, observou-se também níveis bastante elevados, com predominância de CPP entre 10^5 e 10^7 UFC/g como na geléia, porém com um percentual relativamente alto de amostras com CPP superiores a 10^7 UFC/g (Tabela 04). Isto demonstra que problemas deviam está ocorrendo entre a fase de obtenção de "geléia" e secagem, ou mesmo durante a fase de secagem. Observa-se também na mesma tabela, aumentos nos percentuais

Tabela 04. Distribuição das Contagens totais de mesófilos (CPP e CPP/sp); de bolores e leveduras (ABD); bactérias proteolíticas (Agar leite); bactérias gram negativas (Agar ENB); estreptococos presumptivos (Agar Azida); estafilococos presumptivos (Agar B.P.) e bactérias sulfito-redutoras (Agar S.F.) em alga seca. Resultados expressos em UFC/g.

Tipos de Contagem	Total de Análises	≤ 10	$10-10^2$	10^2-10^3	10^3-10^4	10^4-10^5	10^5-10^6	10^6-10^7	$> 10^7$
		$\frac{0}{n}$ %	$\frac{0}{n}$ %	$\frac{0}{n}$ %	$\frac{0}{n}$ %	$\frac{0}{n}$ %	$\frac{0}{n}$ %	$\frac{0}{n}$ %	$\frac{0}{n}$ %
CPP ^a	16				1 6,3	2 12,5	3 18,7	7 43,8	3 18,7
CPP ^b	16					2 12,5	4 25,0	5 31,3	5 31,3
CPP/sp ^a	14						3 21,4	8 57,2	3 21,4
CPP/sp ^b	14						2 14,3	7 50,0	5 35,7
ABD ^b	16	3 18,8	9 56,3	4 25,0					
Agar leite ^a	11			2 18,2	2 18,2	3 27,3	2 18,2	2 18,2	
Agar ENB ^a	13			1 7,7	3 23,1	2 15,4	7 53,8		
Agar Azida ^a	16				2 12,5	4 25,0	10 62,5		
Agar B.P. ^a	11				2 18,2	8 72,7	1 9,1		
Agar S.F. ^a	14	9 64,3	1 7,1	4 28,6					

a - Leitura realizada com 03 dias.

b - Leitura realizada com 07 dias.

de amostras com contagens superiores as encontradas na geléia para todos os grupos de microrganismos estudados. Somente para bolores e leveduras houve uma diminuição da população.

As contagens observadas no presente trabalho são muito elevadas, se comparadas com as encontradas por FAGGI (1980). Em amostras de *Spirulina* obtidas por secagem em "Drum dryer", este pesquisador detectou níveis de 10^3 - 10^4 /g para a contagem total de mesófilos. As contagens de fungos, realizados em Agar cenoura, foram menores que as de bactérias (da ordem de 10^2 /g), sendo *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhodotorula* os gêneros mais freqüentes. A microbiota bacteriana era constituída sobretudo de bastonetes gram positivos esporulados, cocos e actinomicetos. Nos meios Agar Sal-manitol, Agar Azida e Agar desoxicolato, não foram isolados nem *Staphylococcus* fermentadores de manitol, nem *Streptococcus* e nem, coliformes, embora tenham sido as contagens na faixa de 10^2 - 10^3 , 10^2 - 10^3 e $< 10^2$ - 10^2 UFC/g, respectivamente, bastante inferiores portanto, às obtidas no presente estudo.

Em vista dos resultados obtidos, quando a planta industrial já funcionava há mais de dois anos, vê-se claramente problemas de natureza microbiológica nas diferentes fases de produção e, possivelmente, ligados ao controle higiênico-sanitário e às condições de processamento (especialmente secagem).

Assim, uma série de medidas visando melhorar as condições higiênico-sanitárias da indústria foram tomadas, sendo as principais:

- a) limpeza periódica dos tanques de cultivo para remoção de biomassa morta;
- b) higienização de tanques de coleta do concentrado e de filtração com água clorada (100 ppm de cloro livre, pH 7,0-7,5);
- c) melhoria do sistema de limpeza com emprego de peneiras para remoção de sujidades que caiam no tanque;
- d) treinamento em aspectos higiênicos do pessoal de produção.

Após a implantação das melhorias, procurou-se entender melhor o que ocorre em termos de oscilações das contagens durante as diferentes fases do processamento.

A tabela 05 expressa os resultados de quatro experimentos visando relacionar as CPP, de gram negativas (em Agar EMB) e de bolores e leveduras (em ABD), da água de cultivo (junto com a microalga) com as contagens da geléia obtida. Observa-se que, de um modo geral, ocorre um aumento de 2 a 3 ciclos logarítmicos nas contagens das bactérias e menos que 1 para os bolores e leveduras.

As contagens, como se pode notar, tanto na água quanto na geléia, foram bem inferiores às encontradas antes de serem adotadas as medidas de higiene, mostrando a

Tabela 05. Logarítmos (Log)^a e Desvios Padrões (D.P.) das Contagens (UFC/ml ou g) Totais de Bactérias (C.P.P.), de Bactérias Gram Negativas (Agar ENB) e de Bolores e Leveduras (ABD) na Água de Cultivo dos Tanques e na Geléia de *Spirulina*.

Contagens	Experimentos	Log $\pm$ D.P. na água	Log $\pm$ D.P. na geléia	Diferença dos Log das Contagens
C.P.P.	I	3,27 $\pm$ 0,25	5,96 $\pm$ 0,49	2,69 $\pm$ 0,33
	II	2,74 $\pm$ 0,07	5,17 $\pm$ 0,26	2,44 $\pm$ 0,19
	III	3,45 $\pm$ 0,26	5,32 $\pm$ 0,13	1,87 $\pm$ 0,39
	IV	3,27 $\pm$ 0,12	5,68 $\pm$ 0,31	2,41 $\pm$ 0,41
Agar ENB	I	1,90 $\pm$ 0,44	4,78 $\pm$ 0,21	2,88 $\pm$ 0,63
	II	1,13 $\pm$ 0,23	3,42 $\pm$ 0,26	2,29 $\pm$ 0,35
	III	1,00 $\pm$ 0,30	3,14 $\pm$ 0,24	2,14 $\pm$ 0,44
	IV	1,32 $\pm$ 0,13	5,32 $\pm$ 0,32	4,00 $\pm$ 0,28
ABD	I	2,71 $\pm$ 0,89	2,49 $\pm$ 0,44	-0,22 $\pm$ 0,80
	II	1,84 $\pm$ 0,87	2,42 $\pm$ 0,26	0,59 $\pm$ 0,93
	III	0,92 $\pm$ 0,29	1,90 $\pm$ 0,14	0,98 $\pm$ 0,35
	IV	0,95 $\pm$ 0,40	1,34 $\pm$ 0,32	0,39 $\pm$ 0,71

a - Cada resultado expressa a média de três repetições.

importância das mesmas. Outro ponto relevante, é o de que estes dados dão uma idéia bastante concreta dos níveis de contagens bacterianas que devem ser mantido no tanque para se obter uma geléia com uma dada carga bacteriana. Isso vai ser muito importante em função do processamento posterior (refrigeração, congelamento ou secagem) bem como, do processo de secagem a ser utilizado e do emprego da *Spirulina* produzida. Para *Spirulina* grau alimentício, por exemplo, admite-se geralmente uma contagem total de no máximo $1,0 \times 10^4$ UFC/g; de bolores e leveduras no máximo de $1,0 \times 10$ UFC/g ausência de *Escherichia coli* e de patogênicos. Assim, dependendo o que ocorre com a "geléia" após sua obtenção e de sua carga inicial, estes padrões podem ser atingidos ou não.

O tempo e a temperatura que a "geléia" permanece até entrar no processo de secagem é importante. Para avaliação do que pode ocorrer em termos de desenvolvimento microbiano na "geléia", se esta for mantida a 35°C (temperatura ambiente, freqüentemente encontrada no verão). Foram realizados três experimentos, cujos resultados estão na Tabela 06. Verifica-se que até duas horas praticamente não houve variações nas contagens; que com quatro horas, já se detecta aumento cerca de 0,5 a 1 ciclo logarítmico para a maioria dos grupos estudados; e que com seis horas os aumentos já foram bem marcantes para todos os grupos estudados (≥ 1 ciclo). Vê-se portanto que, até duas horas, a geléia pode permanecer em temperatura ambiente, sem que haja

Tabela 06. Comportamento de alguns grupos de microrganismos durante a estocagem da "geléia" de *Spirulina* a 35°C. Resultados expressos em log das contagens (média de três repetições) e Desvio Padrão.

Tempo (h)	CPP (UFC/g)	Agar leite (UFC/g)	Agar S.F. (UFC/g)	Agar EMB (UFC/g)	Coliformes Presumitivos (NMP/g)	Coliformes totais (NMP/g)	Coliformes fecais (NMP/g)
0	5,4±0,6	4,1±0,5	1,1±0,5	5,0±0,4	2,0±0,4	1,3±0,3	<1,0
2	5,3±0,5	4,2±0,7	1,1±0,8	5,4±0,5	2,1±1,0	1,1±0,7	<1,0
4	5,8±0,5	4,7±0,6	1,5±0,7	5,6±0,3	2,5±1,3	1,0±0,8	<1,0
6	6,5±0,8	5,3±0,6	1,6±0,9	6,0±0,3	3,8±0,7	1,7±0,6	<1,0
8	6,8±0,1	6,3±0,8	1,9±0,2	6,7±0,0	3,1±0,9	1,1±0,1	<1,0
10	8,4±1,3	6,7±0,6	3,4±0,1	7,0±0,3	3,7±0,5	2,2±0,8	<1,0
24	8,9±0,6	7,3±1,4	3,5±0,0	7,6±0,5	4,8±0,9	4,6±1,2	5,4

modificação sensíveis nas contagens microbianas. Os aumentos das contagens de coliformes, clostrídios sulfito redutores (Agar S.F.) e de proteolíticos (Agar leite), demonstram o perigo que representa resíduos da microalga na linha de processamento, em decorrência de uma higienização deficiente.

Outra operação que pode influenciar marcadamente a contagem microbiana na farinha de *Spirulina* é a secagem. Esta pode ser feita ao sol, em estufas, em "Spray-dryer" ou em secador de tambor ("drum-dryer"). Nos dois últimos casos, a temperatura é elevada (acima de 100°C) e a secagem se processa em segundos. Desta forma, ocorre redução das contagens microbianas, resultando um produto de boa qualidade microbiológica (RICHMOND, 1986). Com efeito, FAGGI (1980) analisando a microbiota de *Spirulina* crescida em lagoas abertas e em sistema de tubos transparentes, verificou contagens totais de bactérias mesófilas na alga seca na faixa de 10^3 - 10^4 UFC/g, tendo sido a secagem em tambor o processo utilizado. Entretanto, a situação é diferente quando a secagem é lenta, como ocorre na secagem em estufa e ao sol, onde o produto permanece por período prolongado (mais do que 12 horas) em temperaturas inferiores a 70°C-80°C. A secagem ao sol, inclusive, não é recomendada para obtenção de produto algal direcionado ao consumo humano. Isto, não só devido a elevada contagem microbiana, em decorrência da lentidão do processo, mas também ao

surgimento de odores desagradáveis que se estabelece no produto antes da completa secagem (RICHMOND, 1986).

A figura 01 e 02, mostram os resultados referentes ao comportamento da umidade, da CPP e da contagem em Agar EMB, durante à secagem da "geléia" com uma espessura de 2-3 mm, a 60 e 70°C (temperatura do ar da estufa), respectivamente. Observa-se que a 60°C praticamente não houve alteração nos níveis de contaminação durante todo o processo. Já a 70°C, verificou-se redução de cerca de 1 ciclo para a CPP e de mais de 5 ciclos logarítmos para as contagens em Agar EMB, mostrando ter esta temperatura um efeito na redução das contagens. Isto pode ser visto a partir das 5 horas de secagem e especialmente nas contagens em Agar EMB. Com efeito, como pode ser visto na figura 02, os termopares colocados no interior da geléia só registraram temperaturas da ordem de 60°C após 5 horas de secagem, mostrando a necessidade desta ordem de temperatura para que ocorra redução marcante da população, especialmente de gram negativos.

A tabela 07, expressa os resultados de contagens na farinha de *Spirulina* após as medidas de higiene terem sido implantadas, e após modificada a programação de estufagem. Pode-se observar que o percentual de amostras com contagens totais na faixa de 10^4 - 10^5 foi grande (57%), e que poucas amostras estavam com contagens superiores a 10^6 /g. Também foi bastante satisfatório os resultados com relação a coliformes totais e fecais. Pode-se observar, entretanto,

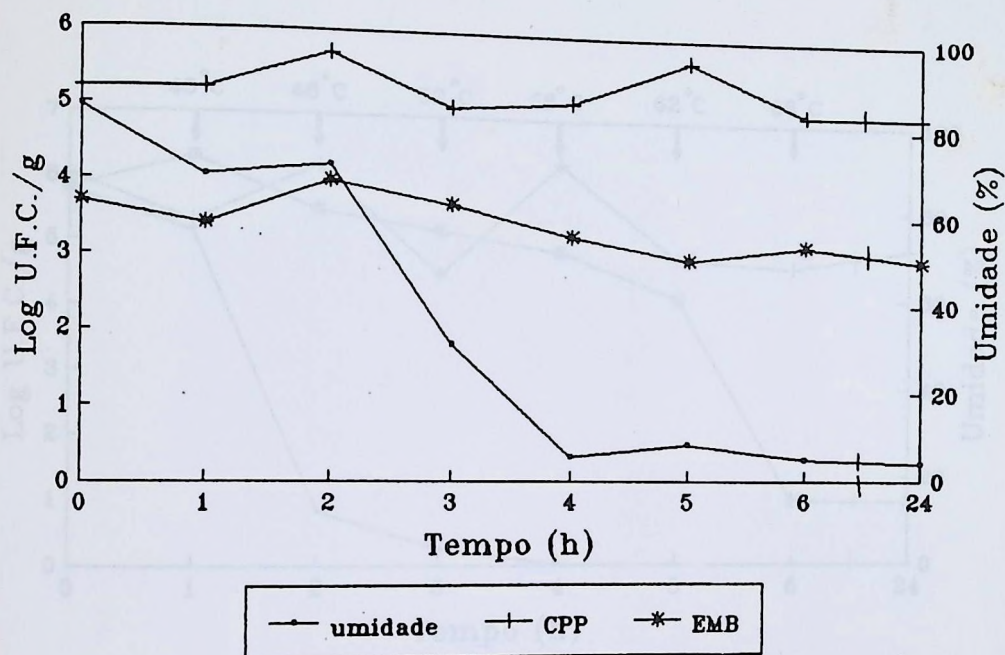


Figura 1. Comportamento da umidade (%), contagem padrão em placas (CPP) e contagem de bactérias gram-negativas (EMB) durante a secagem de geléia de *Spirulina* à temperatura de 60°C.

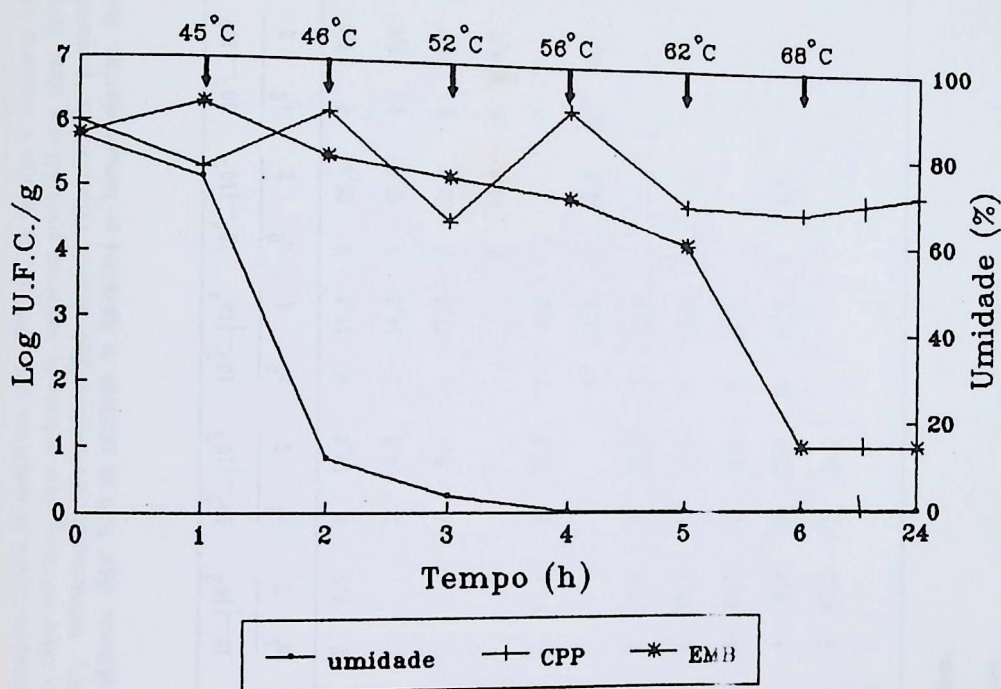


Figura 2. Comportamento da umidade (%), contagem padrão em placas (CPP) e contagem de bactérias gram-negativas (EMB) durante a secagem de geléia de *Spirulina* à temperatura de 70°C. As temperaturas do interior da geléia estão indicadas pelas setas.

Tabela 01. Distribuição das contagens totais de mesófilos (CPP; CPP/sp), de bolores e leveduras (ABD); de bactérias que utilizam nitratos (Agar nitrato^a; Agar nitrato^b); bactérias proteolíticas (Agar leite); bactérias gram negativas (Agar EMB); estreptococos presuntivos (Agar Azida), estafilococos presuntivos (Agar B.P.) e bactérias sulfito redutoras (Agar S.F.) em cultivos de *Spirulina* em tanques abertos. Resultados expressos em UFC/ml.

Tipos de Contagem	Total de Análises	≤ 10		10-10 ²		10 ² -10 ³		10 ³ -10 ⁴		10 ⁴ -10 ⁵		10 ⁵ -10 ⁶		10 ⁶ -10 ⁷		> 10 ⁷	
		n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%
CPP ^a	21			2	9,5	4	19,0	4	19,0	6	28,6	4	19,0	1	4,8		
CPP ^b	21					3	14,3	3	14,3	9	42,9	4	19,0	2	9,5		
CPP/sp ^a	22					2	9,1	6	27,3	7	30,4	5	21,7	1	4,5	1	4,5
CPP/sp ^b	18																
ABD ^b	21	3	14,3	10	47,6	7	33,3	1	4,8			8	44,4	2	11,1		
Agar nitrato ^a	25																
Agar nitrato ^b	23	4	17,4	4	17,4	8	34,8	4	16,0	6	24,0	11	44,0	4	16,0		
Agar leite ^a	17	2	11,8	6	35,3	6	35,3	3	17,6								
Agar EMB ^a	18	10	55,6	4	22,2	2	11,1	2	11,1								
Agar Azida ^a	22			1	4,5	10	45,5	10	45,5	1	4,5						
Agar B.P. ^a	19	4	21,1	8	42,2	7	36,8										
Agar S.F. ^a	20	20	100,0														

a - Leitura realizada com 03 dias.

b - Leitura realizada com 07 dias.

que os níveis microbiológicos são ainda superiores aos desejáveis para o produto grau alimentício, especialmente no que diz respeito a CPP. O desenvolvimento de leve odor desagradável também ocorre no produto seco em estufa, especialmente em baixas temperaturas.

3. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- As contaminações por bactérias dos tanques de cultivo de *Spirulina* podem ser elevadas (de até 10^7 /ml), se cuidados na manutenção da limpeza não forem tomadas.
- A "geléia" de *Spirulina* contém uma carga bacteriana de 2 a 3 ciclos logarítmicos a mais que o cultivo no tanque que lhe deu origem.
- A manutenção da "geléia" em temperatura ambiente ocasiona um aumento das contagens superior a um ciclo logarítmico após 8 horas, mostrando o risco que causam os resíduos de produção na planta de processamento, bem como a desvantagem para a obtenção da geléia.
- O processo de secagem em estufa tem que ser muito bem controlado e com temperaturas adequadas (orden de 70°C), para obter-se a *Spirulina* em grau alimentício com boas qualidades microbiológicas; mesmo assim, não parece ser um bom processo para obtenção de *Spirulina* grau alimentício.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- As contaminações por bactérias dos tanques de cultivo de *Spirulina* podem ser elevadas (de até 10^7 /ml), se cuidados na manutenção da limpeza não forem tomados;
- A "geléia" de *Spirulina* contém uma carga bacteriana de 2 a 3 ciclos logarítmicos a mais que o cultivo em tanque que lhe deu origem;
- A manutenção da "geléia" em temperatura ambiente ocasiona um aumento das contagens superior a um ciclo logarítmico após 6 horas, mostrando o risco que causam os resíduos de produção na planta de processamento, bem como a demora para a secagem da geléia;
- O processo de secagem em estufa tem que ser muito bem controlado e com temperaturas adequadas (ordem de 70°C) para obter-se a *Spirulina* em pó com boa qualidade microbiológica; mesmo assim, não parece ser um bom processo para obtenção de *Spirulina* grau alimentício.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELIOVICH, A. & OICKBUCH, S., 1987. Factors affecting infection of *Scenedesmus obliquus* by a *Chytridium* sp. in sewage oxidation ponds, Appl. Environ. Microbiol., 34: 832.
- APHA, 1984, Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 2^a ed. (Speck, Mied). American Public Health Association, Washington, D.C.
- BARLOW, E.W.R.; BOERSMA, L.; PHINNEY, H.K.; MINER, J.R., 1975. Algal growth in diluted prg waste. AGRICULTURE AND ENVIRON., 2:339-355.
- BECKER, E.W., 1981. Algal mass cultivation, production utilization. Process Biochemistry, 8/9:20-27.
- BEN-AMOTZ, A. & AVRON, M., 1980. Glycerol, beta-caroten and dry algae meal production by canmercial cultivation of *Dunaliella*. ALGAE BIOMASS Ed. G. SHELLEF and SOEDER, pp.603-610.

- BENEMANN, J.R.; MIYAMOTO, K. & HALLENBECK, P.C. 1980. Bioengineering aspects of biophotolysis. *Enzyme Microb. Technol.*, 2:103.
- BHATTACHARJEE, J.K., 1970. Microorganisms as potential sources of food. *ADV. APPL. MICROBIOL.* 13:139-161.
- BLANCK, H. 1985. Inhibition of growth of freshwater microalgal by long-chained aliphatic amines employed in solvent extraction processes. *Arch Environment Contam. Toxicol.*, 14:609-620.
- BLINN, D.W. & BUTTON, K.S., 1973. The effect of temperature on parasitism of *Pandorina* sp by *Dangeardia mammilata* B. Schroder in the Arizona mountain lake, *J. Physiol.*, 9:323.
- BOROWITZKA, L.J. & BOROWITZKA, A.M., 1988. Microalgal biotechnology. CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS. Cambridge. New York, Port Chester, Melbourne, Sydney.
- BOROWITZKA, L.J.; BOROWITZKA, M.A. & MOULTOR, T.P., 1984. The mass culture of *Dunaliella salina* for fine chemicals. *HYDROBIOLOGIE.* 116/117:115-134.
- BOUSSIBA, A. & RICHMOND, A. 1980. C-phycocyanin as a storage protein in the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology*, 125:143-147.
- BRAUN, L., 1988. *Spirulina*: food for the future. Beltsville, Md.: US Dept. of Agriculture. National Agricultural Library, Aquaculture Information Center, 9pp.

- CANTER, H.M. & JAWORSKI, G.H.M., 1981. A further study of parasitism of the diatom *Fragilaria crotonensis* kifton by chytridiaceous fungi in culture. *Ann. Bot.*, 52:549.
- CANTER, H.M. & LUND, J.W.G., 1968. The importance of protozoa in controlling the abundance of planktonic algal in lakes, *Proc. Linn. Soc. London*, 179:203.
- CARR, N.G. & WHITTON, B.A., 1973. *The Biology of the Blue-Green Algal*. Berkeley: Universith of California Press.
- CHU, F.L.E.; DUPUY, J.L. & WEBB, K.L., 1982. Polysaccharide composition of five algal species used as fool for larval of the American oysters, *Crassostrea virginica*. *AQUACULTURE*, 29:241-252.
- CIFERRI, O., 1983. *Spirulina*, the edible microorganism. *Microbiological Reviews*, 47:551-78.
- COHEN, Z., 1986. *Products from microalgal*. Richmond, A. (ed.) CRC PRESS INC. Boca Raton. Florida.
- COMBS, G.F., 1952. Algae *Chlorella* as source of nutrients for the chick. *SCIENCE*. 116:453-454.
- DAFT, M.J.; McCORD, S.B.; STEWART, W.D.P., 1975. Ecological studies on algae lysing bacteria in fresh waters, *Freshwater Biol.*, 5:577.

- DAINIPPON INK & CHEMICALS INC., 1980. Production of highly purified alcoholophilic phycocyanin. Japanese Patent. 80, 77, 890.
- DEVI, M.A. & VENKATARAMAN, L.V., 1983. "Hypocholesterolemic effect of blue-green algal *Spirulina platensis* in albino rats". Nutrition Reports International. 28:519-530.
- FABREGAS, J. & HERRERO, C., 1986. Marine microalgal as a potential source of minerals in fish diets. Aquaculture, 51:237-243.
- FAGGI, E., 1980. Caratteristiche Microbiologiche delle Biomasse di *Spirulina* in Italia (Projeto financiado pelo Conselho de Pesquisa Italiano) Firenze pp.127-130.
- FISHER Jr., A.W. & LITTLE, A.D., 1953. Microscopic algae as industrial raw material. In: BURLEW, J.S. (ed.) Algae Culture from laboratory to pilot plant. Carnegie Institution of Washington, publication 600. Washington S.C., p.311-315.
- FRANÇA, F.P.; GOMES, M.P.D.; ALVERNAZ, M.T.G. & SILVA FILHO, M.V., 1978a. Influence of temperature on the production of *Chlorella homosphaera* biomass. REV. LAT. AMER. MICROBIOL., 20:235-238.
- FRANÇA, F.P. & YUAN, M.C., 1978b. Influência da concentração de NaNO_3 na produção de biomassa de *Chlorella homosphaera*. REV. MICROBIOLOGIA (São Paulo). 9(2):88-91.

- FRANÇA, F.P.; GOMES, S. & CASTRO, A.C.D., 1981. Consumo de fosfato por *Chlorella homosphaera*. REV. LAT. AMER. MICROB., 23(3):167-174.
- GOLDMAN, J.C., 1979a. Outdoor algal mass cultures. I. Applications, Water Res. 13:1.
- GOLDMAN, J.C., 1979b. Outdoor algal mass cultures. II. Photosynthetic yield limitations, Water Res., 13:119.
- GOULDER, R., 1972. Grazing of the ciliated protozoon *Loxocodes magnus* on the alga *Scenedesmus* in a eutrophic pond, Oikos, 23:109.
- GREENE, B.; HOSEA, M.; Mc PHERSON, R.; HENZI, M.; ALEXANDER, M.D. & DARNALL, D.M., 1986. Interaction of Gold (I) and Gold (III) complexes with algal biomass. Environ. Sci. Technol., 20(6):627-632.
- GROBBELAAR, J.U., 1981. Open semi-defined systems for outdoor mass culture of algal in waste water for Aquaculture, Grobbelaar, J.V., Soeder, C.J. and Te, D.F. Eds., UOFS Publ., Series C., 3:20-30.
- HALVORSEN, M.J.; TESTRAKE, D. & MARTIN, D.F., 1984. Effect of aponin, a substance from a green alga *Nannochloris* species on the spore germination of two fungi. MICROBIOS, 41:105-113.

- HANSSEN, M., 1984. La Espirulina, un sorpren dente suplemento dietético natural. EDAF MEXICANA S/A.
- HEDENSKOG, G. & EBBINGHAUS, L., 1972. Reduction of the nucleia acid content of single-cell protein concentrates. Biotechnol. Bioeng., 14:447-457.
- HEDENSKOG, G. & MOGREN, H., 1973. Some methods for processing of single cell protein. Biotechnol. Bioeng., 15:129-142.
- HENRIKSON, R., 1988. Medical Research with *Spirulina*. Revue Earthrise Newsletter, 10:01-04.
- HO, T.S.S.; ALEXANDER, M. & THERESA, S.S., 1974, The feeding of amebae on algae in culture, J. Phycol., 10:95.
- HOLMGREN, P.R.; HOSTETTER, H.R. & SHOLES, V.E., 1971. Ultrastructural observation of crosswalls in the blue-green alga *Spirulina major*. Journal of Phycology, 7:309-311.
- HORIKOSHI, T.; NAKAJIMA, A. & SAKAGUSHI, T., 1979. Uptake of uranium by *Chlorella regularis* e Agric. Biol. Chem., 43(3):617-623.
- HORROBIN, D.F., 1981a. Lass of δ -desaturase activity as a key factor in aging. Medical Hypotheses. 7:1211-1220.

- HORROBIN, D.F. & HUANG, Y.S., 1983. Schizophrenia the role of abnormal essential fatty acid and prostaglandin metabolism. *Medical Hypotheses*, 10:329-336.
- HORROBIN, D.F. 1981b. The possible roles of prostaglandins and of essential fatty acids in mania depression and alcoholism. In: *Progress in lipid Research*, ed. R.T. Holman, 20:539-541. New York: Pergamon Press.
- HUANG, T. & WU, H., 1982. Predation of amoeba on the filamentous blue-green algal, *Bot. Bull. Acad. Sinica*, 23:63.
- HUESSLER, P.; CASTELLO, S.J. & MERINO, M.F., 1978. Parasite problems in the outdoor cultivation of *Scenedesmus*, *Arch. Hydrobiol. Beih. Erg. Limnol.*, 11:223.
- ILTIS, A., 1970. Phytoplancton des lacs natronés du Kanem (Tchad). IV. Note sur les espèces du genre *Oscillatoria*, sous-genre *Spirulina* (Cyanophyta). *Cahiers O.R.S.T.O.M., Séries Hydrobiologie*, 4:129-137.
- ILTIS, A., 1971. Phytoplancton des eaux natronées du Kanem (Tchad). V. Les lacs mesohalins. *Cahiers O.R.S.T.O.M., Séries Hydrobiologie*, 5:73-84.
- ILTIS, A., 1972. Taxonomic remarks on the algal in the ponds of Kanem Chad. *Revue Algologique*, 10:3344-3346.

- ILTIS, A., 1973. Phytoplancton des eaux natronées du Kanem (Tchad). VI. Estimation de biomasses et groupes d'algues dominautes. Cahiers O.R.S.T.O.M., Séries Hidrobiologie, 7:167-194.
- ILTIS, A., 1974. Phytoplancton des eaux natronées du Kanem (Tchad). VIII. Classification des milien estudies et espèces caracteristique. Cahiers O.R.S.T.O.M., Séries Hydrobiologie, 8:81-92.
- INSTITUT FRANÇAIS DU PETROLE, 1967. A new type of food algal. Ref. 14. 237A:1-9.
- KAPLAN, D.; CHRISTIAEN, D. & ARAD, S.M., 1987. Chelatind properties of extracellular polysacharides from *Chlorella* spp. APPL. ENVIRONMENTAL MICROBIOL, 53(12):2953-2956.
- KENYON, C.N.; RIPPKA, R. & STANIER, R.Y., 1972. Fatty acid composition and physiological properties of some filamentous blue-green algae. Archiv für Microbiologie, 83:216-236.
- KERNOFF, P.B.A.; WILLIS, A.L.; STONE, K.J. & MCNICOL, G.P., 1977. Antithrombetic potential of dihom-Y-linoleinc acid in man. British Medical Journal, 2:1441-1444.
- KESSLER, E., 1986. Limits of growth of five *Chlorella* spp. in the presence of toxic heavy metals. Arch Hydrobiol. Suppl. (Algological Studies, 42) 73:123-128.

- KUMAZAMAS, S. & MITSUI, A., 1982. Hydrogen metabolism of photosynthetic bacteria and algae, In: CRC Handbook of Biosolar Resources, Vol. 1. Part 1. Zaborsky, O.R., Ed. CRC Press.
- KUNKEL, S.L.; OGAWA, H.; WARD, P.A. & SURIER, R.B., 1982. Suppression of chronic inflammation by evening primrose oil. In: Progress in Lipid Research, ed. R.T. Holman, New York. Pergamon Press. 20:885-888.
- LEWIN, R.A., 1980. Uncoiled variants of *Spirulina platensis* (Cyanophyceae: Oscillatoricaceae). Archives of Hydrobiology, Supplement, 60:48-52.
- LOOSANOFF, V.L.; HANKS, J.E. & GANAROS, A.E., 1957. Control of certain forms of zooplankton in mass algal cultures, Science, 125:1092.
- MACINTYRE, T.M., 1955. The digestibility of dried ground seaweed meal by the laying hen. J. AGRIC. SCI., 35:168-174.
- MCDOWEEL, M.E. & LEVEILLE, G.A., 1963. Feeding experiments with algae, Fed. Proceed., 22(6):1431-1438.
- MIAO, J.R., 1987. *Spirulina* in Jianoxichina. Academy of Agricultural Science. Jianoxi province. China paper presented at: Soc. Appl. Algology Lille. France.

- MORIMURA, Y. & TAMIYA, N., 1954. Preliminary experiments on the use of *Chlorella* as human food. Food Technol., 8:178-182.
- MULLER, U.V. & SENGEBUSCH, P., 1983. Visualization of aquatic fungi (Chytridiales) parasitizing on algal by mean of induced fluorescence, Arch. Hydrobiol., 97(4):471.
- MULLER, U.V.; SEWGBUSCH, P.; BARR, D.J.S. & HICKMAN, C.J., 1967. Chytrids and algal. II. Factors influencing parasitism of *Rhizophyidium spaherocarpum* on *Spirogyra*, Can. J. Bot., 45:431.
- MUR, L.R.; GONS, H.J. & VAN LIERE, L., 1975. Some experiments on the competition between green alga and blue-green bacteria in light-limited environments. Microbiol. Lett. 1:335.
- NAKAVA, N., 1986. The effect of *Spirulina* on reduction of serums cholesterol. Tokai, Univ. Japan. Progress in Medicine, 6/11.
- NICHOLS, B.W. & WOOD, B.J.B., 1968. The occurence and byosyntheses of gammalinolenico acid in a blue-green alga, *Spirulina platensis*. Lipids., 3:46.
- PADAN, E. & SHILO, M., 1973. Cyanophager - viruses attacking blue algae, Bacteriol. Rev., 37(3):343.

- PANTASTICO, J.B.; BALDIA, J.P. & REYES Jr., D.M., 1986. Feed preference of milkfish (*chanos chanos forsskal*) fry given different algae species as natural feed. *AQUACULTURE*. 56:169-178.
- QUILLET, M., 1975. Recherche, sur les substances glucidiques élaborés par les Spirulines. *Annales de la Nutrition et de l'Alimentation*, 29:553-561.
- RAMOS, G., 1973. Clinical experimentation with *Spirulina*. Paper presented al colioque sur la valeur nutritionelli des algues spirulines. Pueill.
- REICHELT, J.L. & BOROWITZKA, M.A., 1984. Antimicrobial activity from marine algal: results of a large-scale screening programm. *HIDROBIOLOGIE*. 116/117:158-68.
- REID, G.W. & ASSENZO, J.R., 1961. Culture and harvest of attached algae grown on domestic sewage. Part I. *WATER & SEWAGE*. 6:248-265.
- RICHMOND, A., 1986. Handbook of microalgal mass culture. CRC PRESS INC, FI.
- RICHMOND, A., 1988. Micro-algal biotechnology. *Spirulina*, ed. BOROWITZKA, M.A. & BORONITZKA, L.J., pp.85-118.
- RICHMOND, A. & BECKER, W., 1986. Technological aspects of mass cultivation a general cultive. In *Algae Mass Culture*, ed. A. Richmond, pp. 245-63. Boca Raton: CRC Press.

- RICHMOND, A.; KARG, S. & BOUSSIBA, A., 1982. Effect of bicarbonate and carbon dioxide on the competition between *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*, Plant Cell Physiol., 23(8):1411.
- RICHMOND, A.; VONSHAK, A. & ARAD, S.M., 1980. Environmental limitations in outdoor production of algal biomass. In: Algae Biomass, ed. G. Shelef & C.J. Soeder, pp.65-72.
- ROSEMBERG, J.A., 1976. O potencial das algas: possibilidades de *Scenedesmus quadricauda* isolada no Rio de Janeiro. Tese Prof. Titular do Departamento de Engenharia Bioquímica da Escola de Química da UFRJ.
- SANTILLAN, C., 1982. Mass production and use of *Spirulina*. Experientia 38:40-43.
- SAUTIER, C. & TREMOLIERES, J., 1976. Vateur alimentaries des algues Spirulines Chez l'home. Annales de la Nutrition et de l'Alimentation, 30:517-534.
- SAVINS, J.G., 1978. Di recovery process employng thickened aqueous driving fluid. U.B. Patent 4, 079, 544.
- SCOTT, W.E. & CHUTTER, F.M., 1981. Introduction: infections and predators, U.O.F.S. Publ., Ser. C, 3:103-109.
- SHAPIRO, A., 1972. Blue-green alga: Why they become dominant, Science, 179:382.

- SILVALIZIGAM, P.M.; WUAN, T.D.; FUSETANI, H. & WATANABE, T., 1979. Propagation of *Chlorella vulgaris* in the treatment of palm oil mill sludge. Prog. Wat. Tech., 11(6):69-87.
- SNELL, T.W.; BIEBERICH, C.J. & FUERST, R., 1983. The effects of green and blue-green algal diets on the reproductive rate of the totifer *Brachionus plicatilis*. AQUACULTURE, 31:51-30.
- SOEDER, C.J. & MAIWEG, D., 1969. Eiflub pilzreicher parasiten auf unsterd massenkulturen von *Scenedesmus*, Arch. Hydrobiol., 66:48.
- SOEDER, C.J. & MODESTA, S., 1972. Suitability of unicellular algae as supplementary foods. Dechema (Deut. Ger. Chem. Aparatew) Monogr., 70:55-70.
- SOEDER, C.J.; MULLER-WECKER, H.; PABST, W.; KRAUT, H., 1970. Working basis for using microalgas in food and diet. Ann. Hyg. Lang. Fr., 6(4):49-59.
- SPACEK, F.; CECHOVSKY, J.; JURCOVA, Z. & KRIZ, L., 1968. The use of algal for feeding chickens. Acta Univ. Fac. Agron., 16(3):391-369. Apud Biol. Abst., 51(1):3500.
- SWITZER, L., 1980. *Spirulina*. The Whole Food Revolution. Los Angeles, CA: Bantarn Books.

- TAKEMOTO, K., 1984. "Effects of Spiruline on hypercholesterolemia and fatty in rats". Santama Med. College. Japan.
- TAMIYA, H., 1957. Mass culture of algal. AN REV. OF MICROBIOLOGY. 8:309-334.
- TAMURA, E.; BABA, H.; TAMURA, A.; MATSUNO, N.; KOBATAKE, Y. & MORIMOTO, K., 1958. Nutritional studies on *Chlorella* Report II. Human experiment on absorption of decolored *Scenedesmus*. Ann. Rept. Nat. Inst. Nutr. Tokyo. p.31.
- TORNABENE, T.G.; BOURNE, T.F.; RAZIUDDIN, S. & BEN-AMOTZ, A., 1985. Lipid and lipopolysaccharide constituents of cyanobacterium *Spirulina platensis* (Cyanophyceae, Nostocales). Marine Ecology, Progress Series, 22:121-125.
- TUDGE, C., 1981. Why we could all need the evening primrose. New Scientist, 19:506.
- VAN EYKELENBURG, C., 1979. The ultrastructure of *Spirulina platensis* in relation to temperature and light intensity. Antonie van Leeuwenhoek, 45:369-390.
- VONSHAK, A.; ABELIOVICH, A.; BOUSSIBA, S.; ARAD, S. & RICHMOND, A., 1982. Production of *Spirulina* biomass: effects of environmental fact.
- VONSHAK, A.; BOUSSIBA, S.; ABELIOVICH, A.; RICHMOND, A., 1983. Production of *Spirulina* biomass: maintenance of monoalgal culture outdoors, Biotechnol Bioeng., 25:341.

- WHLMANN, D., 1971. Influence of dilution sinking and grazing rate on phytoplankton population of hyperfertilized ponds and micro-ecosystems, Mitt. Int. Ver. Limnol., 19:100.
- WONG, H.M. & LAY, C.C., 1980. The comparison of soy-bean wastes, used tea-leaves and sewage sludge for growing *Chlorella pyrenoidosa*. ENVIRON. POLLUTION (Series A) 23:247-259.
- YAMAGUCHI, T., 1981. Strong Deodorant. Japanese patent 79 JP-116131.
- ZAROUK, 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*. Geitler. Ph.D. Thesis, University of Paris, France.