

ÉTUDE DE L'INFLUENCE *IN VITRO* DE LA SPIRULINE SUR LA CROISSANCE DES BIFIDOBACTERIES

HAMOUDA ALI Imane¹ et
DOUMANDJI Amel¹

1. Laboratoire de recherche
en Biotechnologie des
Productions Végétales,
Département des Sciences
Alimentaires, Université de
Blida 1. B.P. 270, route de
Soumaa, Blida, Algérie.
Email :
imenehamouda@yahoo.fr

Reçu le 29 octobre 2015,
accepté le 12 décembre 2015

Résumé

La spiruline une micro-algue bleu-verte filamenteuse, utilisée depuis l'antiquité comme aliment traditionnel pour les peuples de Mexique et d'Afrique. Récemment elle a fait l'objet de plusieurs études thérapeutiques en raison de sa valeur nutritionnelle exceptionnelle. Plusieurs auteurs ont trouvé qu'un taux de 5 % de spiruline dans le régime alimentaire augmente la croissance des bactéries lactiques et des pseudo-lactiques grâce aux métabolites extracellulaires de cette micro-algue. Le but de ce présent travail est d'optimiser les aptitudes technologiques soit la croissance bactérienne et le pouvoir acidifiant des souches d'intérêt. Nous avons utilisé la souche *Spirulina platensis* produit français commercialisé en Maroc sous la dénomination commerciale « Vitalgue ». Deux souches bifides *Bifidobacterium bifidum* (B1) et *Bifidobacterium infantis* (B16) isolées à partir des selles de nourrissons de moyens d'âge 15,4 mois sous différents types d'allaitement ont été sélectionnées. Une supplémentation du lait infantile 1^{er} âge « Biomil 1 » avec la spiruline en raison de 3 % permet une bonne influence sur les bifidobactéries, soit une amélioration du pouvoir acidifiant (pH=1,68) après 24 h de fermentation et une accélération du taux de croissance de 0,56 à 1,82 h⁻¹ (p < 0,05) de la souche *Bifidobacterium infantis* (B16). Alors que pour la souche bifide *Bifidobacterium bifidum* (B1), elle semble présenter un pouvoir acidifiant plus important lorsqu'elle est ensemencée dans le lait infantile 1^{er} âge (pH=1,86) après 24 de fermentation, avec un taux de croissance de 1,82 h⁻¹.

Mots clés: *Bifidobacterium*, croissance, lait infantile, pouvoir acidifiant, *Spirulina platensis*

INTRODUCTION

La Spiruline, nommée aussi *Arthrospira*, une cyanobactérie microscopique filamenteuse, photosynthétique, qui se trouvent dans différents milieux aquatiques [1, 2, 3]. Elles ne sont pas à proprement parler des algues, même si par commodité on continue à les désigner comme telles [4], car ils sont vraiment procaryotes qui partagent la plupart des caractéristiques des eubactéries [5]. Les colonies filamenteuses montrent la différenciation d'habilité

entre trois différents types de cellules. Les colonies filamenteuses montrent la capacité de se différencier en trois différents types de cellules [6]. Dans le tractus intestinal des animaux et les humains, les bifidobactéries coexistent avec une grande variété de bactéries, dont la plupart sont des anaérobies stricts. Les bifidobactéries ont été découvertes dans les fèces infantiles par Tissier, qui a isolé une bactérie avec une forme étrange et caractéristique Y et l'a nommé *Bacillus bifidus* [7].

Revue Agrobiologia, (2016), volume 6(1)

L'identification de *Bifidobacterium* au niveau de l'espèce peut être obtenue par l'utilisation des essais de fermentation [8]. En ce qui concerne l'adhésion de bifidobactéries à la muqueuse intestinale humaine, cette propriété est particulièrement développée chez les adultes en bonne santé, alors qu'il se trouve à un degré moindre chez les personnes âgées [9].

Les bifidobactéries sont en mesure d'empêcher l'adhérence d'agents pathogènes au moyen d'obstacles stériques qui bloquent les récepteurs spécifiques, et aussi par les phénomènes de co-agrégation. Ces activités peuvent être mises en œuvre par la production d'acides organiques qui, en abaissant le pH, inhibe la croissance des bactéries pathogènes et par la synthèse de bactériocines et des substances qui induisent des réponses de défense immunologiques [10].

Jusqu'à ce jour, les recherches effectuées sur l'effet prébiotique de la spiruline ont principalement porté sur les produits extracellulaires de cette algue sur l'augmentation de la population des bactéries lactiques y compris les *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel biologique et milieux de cultures

Les souches de *Bifidobacterium* ont été isolées à partir des selles fraîches de nourrissons sous différents types d'allaitement. L'isolement des bifidobactéries est réalisé en

profondeur sur milieu MRS à 37°C. Après 48 h d'incubation, les colonies sont sélectionnées selon leur aspect morphologique leur forme, leur état de fraîcheur et la coloration de Gram [11]. Les colonies des bifidobactéries sont repiquées sur le bouillon MRS à pH 6,4 et les tubes sont incubés en anaérobiose (en ajoutant de l'huile de paraffine stérile à la surface du tube) pendant 24 h à 37°C.

La pureté des souches est contrôlée après chaque repiquage par des observations macroscopiques des colonies et microscopiques des cellules, des colorations de Gram, des tests de la catalase, des tests physiologiques et des tests biochimiques ainsi que la mini galerie biochimique API 20E.

La souche d'*Escherichia coli* a été isolée à partir des selles de nourrissons diarrhéiques de 4 mois sous allaitement mixte. Il s'agit d'un ensemencement en profondeur sur milieu gélosé VRBL; après 48 h d'incubation à 44°C. Le repiquage de ces colonies a été fait sur bouillon nutritif et l'incubation s'est faite à 44°C pendant 24 h.

Spiruline en paillettes emballées sous vide, produit français commercialisé en Maroc sous la dénomination commerciale «Vitalgue».

Le lait adapté 1 âge commercialisé sous l'appellation «Biomil 1» est utilisé comme milieu de culture pour les deux espèces bifides.

2. Sélection des souches bifides selon leur activité antimicrobienne et leur aptitude technologique

Une première sélection des souches a été effectuée sur la base de l'activité bactériocinogène vis-à-vis

d'*Escherichia coli* suivant la méthode de la diffusion des puits. Puis, une deuxième sélection a été réalisée sur la base de deux paramètres technologiques, le pouvoir acidifiant et la cinétique de croissance. L'évolution de la population bactérienne est déterminée par dénombrement sur milieu solide (nombre des UFC/mL). L'activité acidifiante est caractérisée par quatre paramètres : vitesse maximale d'acidification exprimée en mUpH/min (V_m), temps où intervient V_m (en min) (T_m), pH initial (pH_i), pH final (pH_f) [12] et cela permet de calculer le temps de génération exprimé en heure (G) ainsi que le taux de croissance (μ) en h⁻¹ [13].

3. Suivi in vitro de la cinétique de la croissance et du pouvoir acidifiant des flores bifides

Le pouvoir acidifiant (pH) des souches d'intérêt a été évalué toutes les 100 minutes pendant 8 h et après 24 h de fermentation dans le lait infantile seul et enrichi en spiruline à raison de 3g /ration quotidienne d'un nourrisson d'une semaine (7 jours). Le suivi de la cinétique de la croissance a été réalisé par le dénombrement des souches sur gélose MRS c et par la mesure de la densité optique (DO) à une longueur d'onde égale à 600 nm.

4. Analyse statistique

Les résultats sont représentés sous forme de moyennes plus ou moins l'écart type des trois essais ainsi que les représentations graphiques ont été réalisées par le logiciel Excel 2010 et une analyse de la variance (STATISTICA), version 6. A une valeur de $p < 0,05$ le test est considéré comme significatif.

RÉSULTATS

1. Isolement et identification des espèces d'intérêt

Les colonies du genre *Bifidobacterium* cultivées sur gélose

MRS_c apparaissent sous forme de colonies lisses, convexes, à contour régulier, de couleur blanche à crème, de 1 à 2 mm de diamètre. L'aspect microscopique après coloration de Gram révèle que ce

sont des Gram positif, et que les cellules se présentent en bâtonnets plus ou moins allongées, parfois bifurqués, en forme V ou Y

(Figure 1).

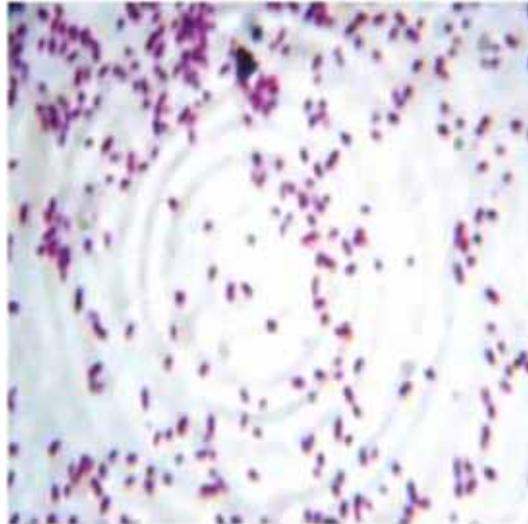


Figure 1 : Les souches bifides après coloration de Gram sous microscope optique (Gr.100×10) (Originale)

Les coliformes fécaux (*Escherichia coli*) cultivés sur gélose VRBL apparaissent sous une forme ronde, convexe, à contour régulier, de

couleur rose à violacé, de diamètre supérieur ou égal à 0,5 mm après 24 heures d'incubation, cerné d'un halo de sels biliaires précipités.

La spiruline sous microscope optique, elle se présente sous la forme d'un filament en spirale (Figure 2).

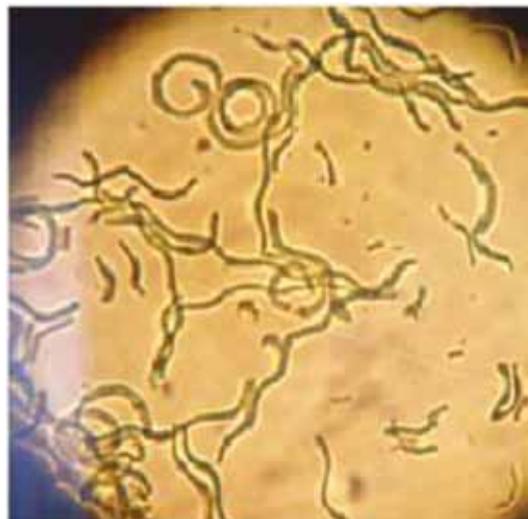


Figure 2 : Aspect de la spiruline après réactivation sous microscope optique (Gr.100×10) (Originale)

Les tests biochimiques réalisés pour les deux souches bifides 1 et 16 par la galerie API 20E, laissent penser

que la souche bifide 1 appartient à l'espèce *Bifidobacterium bifidum* et que la souche B₁₆ appartient à

l'espèce *Bifidobacterium infantis* var *lactencis* [14] (Tableau 1).

Tableau 1 : Résultats des tests biochimiques par la galerie API 20 E des deux souches bifide 1 et 16

| Tests | ONP | ADH | LDC | ODC | CIT | H ₂ S | URE | TDA | IND | VP | GEL | GLU | MA | INO | SOR | RHA | SAC | MEL | AM | ARA |
|-------|-----|-----|-----|-----|-----|------------------|-----|-----|-----|----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|
| S 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| S 16 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + | - | - | - | + | - | - | - |

- : Test négatif; + : Test positif

2. Sélection des souches bifides selon leur activité antimicrobienne et leur aptitude technologique

Une première sélection des souches est effectuée sur la base de l'activité antimicrobienne. La figure 3 montre

un exemple de zones d'inhibition de 06 souches bifides productrices de substances inhibitrices dont le diamètre d'inhibition (Zi) est supérieur ou égale à 2 mm. La meilleure souche retenue est la

souche 16 qui présente la plus importante activité antimicrobienne envers *Escherichia coli* avec un diamètre d'inhibition de 22 mm et de 44 mm pour le Surnagent brut actif (SBA) (Tableau 2).

Tableau 2 : Activité antimicrobienne des souches pseudo-lactiques à l'égard de germes pathogènes (diamètre d'inhibition en mm)

| Souches | E. coli | SBA |
|---------|---------|---------|
| Bf. 1 | + | ++++ |
| Bf. 2 | + | +++++ |
| Bf. 3 | + | ++++ |
| Bf. 5 | ++ | ++++ |
| Bf. 7 | + | +++++ |
| Bf. 9 | ++ | ++++ |
| Bf. 10 | + | +++++ |
| Bf. 11 | + | +++++ |
| Bf. 12 | + | +++++ |
| Bf. 13 | + | ++ |
| Bf. 16 | +++++ | +++++++ |

- : Pas de zone ou diamètre = à 1 mm ; + : 1,5 mm < diamètre < 12 mm ; ++ : 12 mm < diamètre < 14 mm ; +++ : 14 mm < diamètre < 16 mm ; ++++ : 16 mm < diamètre < 18 mm ; +++++ : 18 mm < diamètre < 40 mm ; ++++++ > 40 mm.

Une deuxième sélection est réalisée sur la base des deux paramètres technologiques : le pouvoir acidifiant et la cinétique de la croissance. La souche bifide B1 a présenté une meilleure vitesse d'acidification de $1,2 \text{ h}^{-1}$ avec des meilleurs paramètres de croissance, (un temps de génération (G) de $0,22 \text{ h}$ et un taux de croissance (μ) de $4,55 \text{ h}^{-1}$).

3. Suivi de la cinétique de la croissance et du pouvoir acidifiant de la flore bifide in vitro dans le lait infantile seul et enrichi en spiruline

3.1 Suivi du pH

Les résultats des variations de pH des cultures réalisées dans différentes conditions sont présentés dans la figure 4. Nous constatons Pour la souche B1, une importante diminution de pH de $6,18$ à $4,32$ en 24 h de fermentation soit un ΔpH de $1,86$ lorsqu'elle est ensemencée sur le lait seul (Figure 3). Sur le lait enrichi en spiruline, nous avons enregistré une baisse de pH un peu plus légère de $6,35$ à $4,53$ en 24 h de fermentation soit un ΔpH de $1,82$. Pour la souche bifide 16, le pH passe de $6,12$ à $4,44$ en 24

h de fermentation, soit un ΔpH de $1,68$ sur le lait additionné de spiruline alors que sur le lait seul, nous avons noté une diminution de pH de $6,42$ à $4,96$ soit ΔpH de $1,46$, cette souche a baissé le pH du lait infantile à $5,05$ en 6 h de fermentation. Elle arrive à donner un caillé de texture acceptable en un temps de fermentation remarquable. Les valeurs des vitesses d'acidification dans le lait infantile et celui enrichi en spiruline sont significative ($p < 0,05$). Nos résultats vont de pair avec ceux trouvés par d'autres auteurs [15, 16].

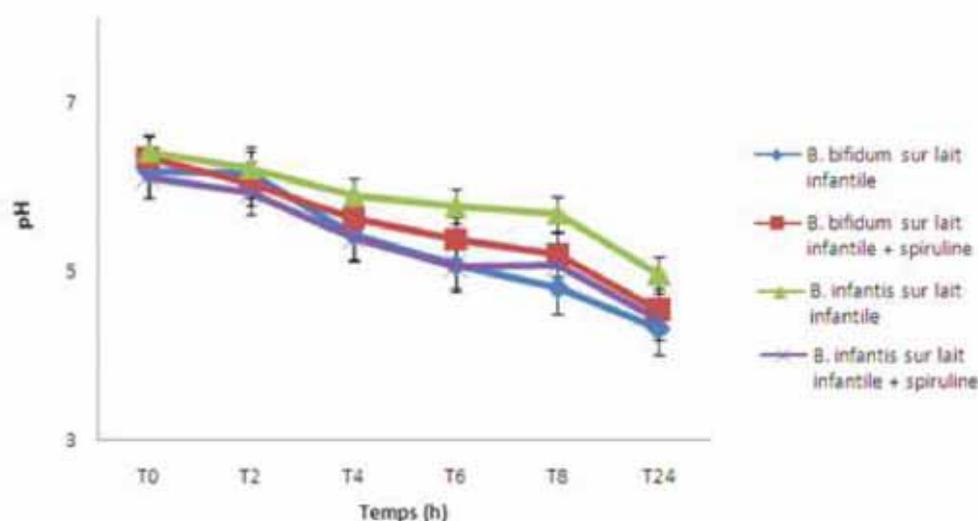


Figure 3 : Évolution du pH du lait infantile seul ou enrichi par la spiruline fermenté par *Bf. bifidum* ou par *Bf. infantis* ($n=3$, $p < 0,05$).

Nos résultats montrent une diminution de pH qui varie d'une souche à l'autre. En effet des chercheurs ont montré une corrélation entre les profils de production de l'acide lactique par quelques souches de bactéries lactiques et les profils du pH des cultures [17].

3.2 Dénombrement des deux souches bifides cultivées dans le lait infantile seul et enrichi

A partir des résultats obtenus (Figure 4), nous remarquons que seulement pour la souche bifide *Bifidobacterium infantis*, la croissance était meilleure sur le lait enrichi en spiruline par rapport au témoin. En 24 h de fermentation, nous avons atteint une biomasse de $5,73 \cdot 10^9 \text{ UFC/mL}$ avec un taux de croissance de $1,82 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ en comparaison avec le témoin ou ce dernier été près de 3 fois inférieur

($0,56 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$). A l'inverse, la croissance de la souche *Bifidobacterium bifidum* (Figure 5) était médiocre sur le lait enrichi en spiruline par rapport au témoin où la biomasse a atteint $5,45 \cdot 10^8 \text{ UFC/mL}$ avec un taux de croissance de $6,25 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$.

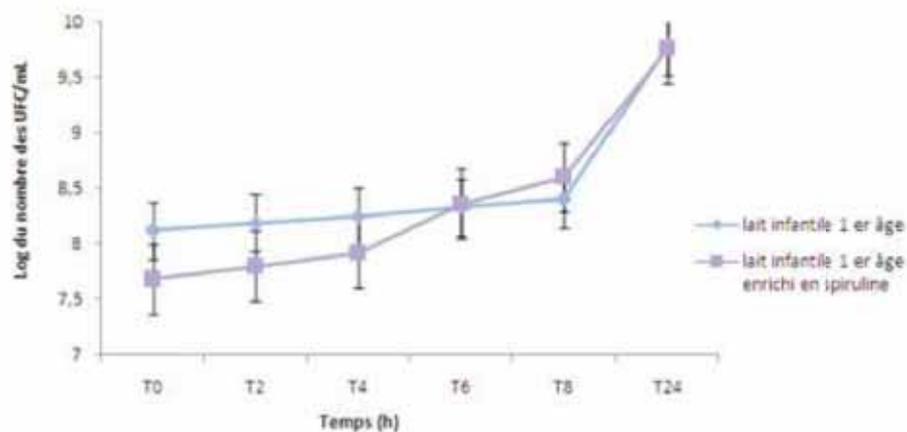


Figure 4 : Evolution du Log du nombre des UFC/mL de la souche *Bifidobacterium infantis* B16 durant la fermentation (n=3, p < 0,05).

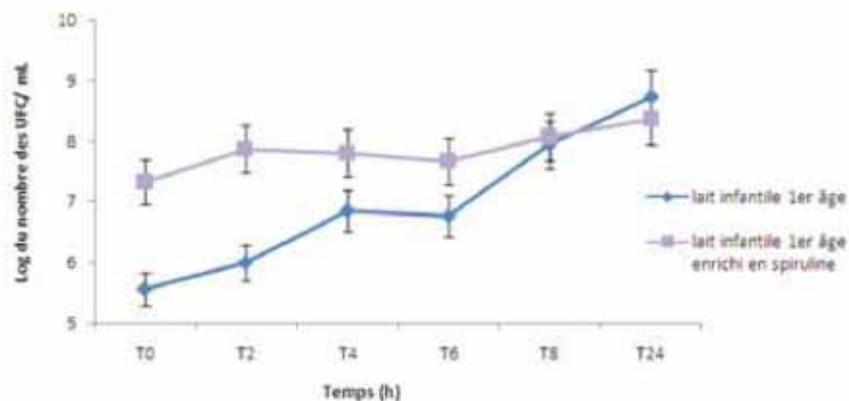


Figure 5 : Evolution de Log du nombre des UFC /mL de la souche *Bifidobacterium bifidum* B1 durant la fermentation (n=3, p < 0,05).

En effet les bifidobactéries sont des micro-organismes à faible pouvoir protéolytique [11]. De ce fait, plusieurs études ont été menées pour proposer une source d'azote plus accessible à ces micro-organismes.

Le temps de génération le plus court a été enregistré sur le lait seul avec la souche B1. Pour l'autre souche bifide 16, son temps de génération est plus court en présence de

spiruline avec un taux de croissance de $1,82 \pm 0,02 \cdot h^{-1}$. Il semblerait que l'ajout de la spiruline au lait infantile améliore significativement (p < 0,05) la croissance de la souche bifide dans les laits fermentés en vue de sa valeur nutritionnelle (protéines, sels minéraux et vitamines).

Les facteurs bifidogènes peuvent optimiser la croissance des bifidobactéries dans l'intestin [18].

D'autre part en présence de spiruline, la capacité des souches bifides à croître sur milieu lait étant donné que leur phase de latence est raccourcie à seulement 2 h [15]. La supplémentation de notre étude est basée sur l'enrichissement du lait infantile en spiruline dans le but de confirmer son efficacité en tant que supplément multi-micro éléments. D'une manière générale elle nous a permis d'accélérer la croissance des souches bifides.

3.3 Effet antagoniste des deux souches bifides sélectionnées

Nous observons d'après nos résultats que l'effet antagoniste de la souche bifide 16 vis-à-vis la souche pathogène *Escherichia coli* est plus important lorsqu'elle est ensemencé dans le lait enrichi en spiruline avec un diamètre de 20 mm après 24 h de fermentation. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par d'autres auteurs qui ont montré que les bactéries à effet probiotique sont capables d'empêcher la croissance des bactéries pathogènes *in vivo* et *in vitro* [19, 20, 21, 22]. Il a été également démontré que l'abaissement de pH pourrait inhiber la croissance des microorganismes tels que les coliformes si ce pH devenait inférieur à 4,5 [19]. Plusieurs études ont rapporté le rôle unique de polysaccharides de la spiruline dans l'amélioration de l'activité enzymatique du noyau cellulaire et du processus de réparation de l'ADN [23, 24].

Par conséquent, la spiruline

présente leur potentiel pour exercer son effet d'améliorer la croissance et la survie des souches bifides.

Les micro-algues ont longtemps été utilisées avec des fins thérapeutiques [25, 26]. La spiruline semble être efficace dans la lutte contre les maladies et la prévention dans sa capacité à améliorer la croissance, la survie et la fonction immunitaire non spécifique contre les agents pathogènes [27].

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

A partir de 32 isolats sélectionnés, deux souches bifides : *Bifidobacterium bifidum* et *Bifidobacterium infantis* var *lactencis* ont présentés le meilleur pouvoir acidifiant et la meilleure activité antimicrobienne vis-à-vis la souche pathogène *Escherichia coli*.

La supplémentation de notre étude est basée sur l'enrichissement du lait infantile en spiruline dans le but de

confirmer son efficacité en tant que supplément multi-micro éléments. Les résultats de l'étude *in vitro* indique l'ajout de la spiruline à raison de 3g/L au lait infantile à un effet sur la croissance des bifidobactéries.

En perspectives, il serait intéressant de proposer la spiruline en alimentation infantile au tant que complément alimentaire en raison de ses valeurs thérapeutiques idéal et aussi comme fortifiant, dont on peut l'utilisées aux traitements de diverses pathologies en se basant sur la composition de cet organisme et les études sur les activités de ses composants. Elle devrait être administrée très tôt chez le nourrisson et le jeune enfant pour empêcher l'installation des carences qui surviennent surtout à partir du sevrage et tout ce qui est pathogène, elle rééquilibre la composition de la flore intestinale en favorisant l'implantation des bifidus en raison de sa richesse en fibres et en glucosamine

RÉFÉRENCES

- 1 Downing J. A., Watson S. B., and McCauley E., (2001). Predicting cyanobacteria dominance in lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 58, no. 10, pp. 1905–1908.
- 2 Miyatake T., Mac Gregor B. J., and Boschker H. T. S., (2013). Depth-related differences in organic substrate utilization by major microbial groups in intertidal marine sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 79, no. 1, pp. 389–392.
- 3 Charpy L., Casareto B. E., Langlade M. J., and Suzuki Y., (2012). Cyanobacteria in coral reef ecosystems: a review. *Journal of Marine Biology*, vol. 2012, Article ID 259571, 9 pages.
- 4 Falquet J. and Hurni J.P. (2006). Aspect nutritionnel de la spiruline. *Antenna Technologie*, 41 p.
- 5 Singh M., Sharma N.K., Prasad S.B., Yadav S.S., Narayan G., and Rai A.K., (2013). Freshwater cyanobacterium *Anabaena doliolum* transformed with ApGSMT-DMT exhibited enhanced salt tolerance and protection to nitrogenase activity, but changed its behavior to halophily. *Micro-biology*, vol. 159, pp. 641–648.
- 6 Kozhevnikov I. V. and Kozhevnikova N. A., (2011). Taxonomic studies of some cultured strains of Cyanobacteria (Nostocales) isolated from the Yenisei River basin. *Inland Water Biology*, vol. 4, no. 2, pp. 143–152.
- 7 Tissier M.H. (1900). Recherches sur la flore intestinale du nourrisson (état normale et pathologique). Paris Thèses, 1-253.
- 8 Mitsuoka T. (1969). Vergleichende Untersuchungen über die Bifidobakterien aus dem Verdauungstrakt von Menschen und Tieren. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig. Reihe A*, 210: 52-64.

- 9 He F., Ouwehand A. C., Isolauri E., Hosoda M., Benno Y., Salminen S. (2001). Differences in composition and mucosal adhesion of bifidobacteria isolated from healthy adults and healthy seniors. *Curr. Microbiol.* 43, 351–354.
- 10 Velraeds M. C., van der Mei H. C., Reid G., Busscher H. J. (1996). Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1958–1963.
- 11 Tamime A.Y., Marshall V.M.E. and Robinson R. K. (1995). Microbiological and technological aspects of milk fermented by bifidobacteria. *J. Dairy Res.* 62, pp. 151-187.
- 12 Zourari A. et Desmazeaud M. J. (1991). Caractérisation des bactéries lactiques thermophiles isolées de yaourts artisanaux grecs. II souches de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et cultures mixtes avec *Streptococcus salivarius thermophilus*. *Lait*, 71, 463-482.
- 13 Oliveira E.G., Rosa G.S., Moraes M.A. and Pinto L.A.A. (2009). Moisture sorption characteristics of microalgae *Spirulina platensis*. *Braz. J. Chem. Eng.* V. 26, n°1 São Paulo.
- 14 Mitsuoka T. (1984). Taxonomy and ecology of Bifidobacteria. *Bifidobacteria microflora*, J., I, 11-28.
- 15 Ustunol Z. and Gandhi H. (2001). Growth and viability of commercial *Bifidobacterium* spp in honey-sweetened skim milk. *Journal of Food Protection*, 64(11): 1775-1779.
- 16 Chick H., Shin H.S. and Ustunol Z. (2001): Growth and acid production by lactic acid bacteria and bifidobacteria in skim milk containing honey. *Journal of Food Science*, 66, 478-481.
- 17 Adnan A.F.M. and Tan I.K.P. (2007): Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian food and assessment of the isolates for industrial potential. *Bioresource Technology*. 98: 1380-1385.
- 18 Bezkorovainy A. (2001): Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am. J. Clin., Nutr.*, 73 : 3998-4058.
- 19 Lin W.H., Shen H.J. and Hang T. (2007): Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe*. 13: 107-113.
- 20 Balcazar J.L. and Luna-Rojas T. (2007): Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *Vibrio* species confers protection against *vibrio sisinjuvenile* shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Curr Microbiol.* 55: 409-412.
- 21 Mahdhi A, Harbi B., Ángeles Esteban M., Chaieb K., Kamoun F., and Bakhrouf A. (2010b): Using mixture design to construct consortia of potential probiotic *Bacillus* strains to protect gnotobiotic-*Artemia* against pathogenic *Vibrio*. *Biocontrol Sci Techn.* 20: 983-996.
- 22 Midassirou B., Mahdhi A., Chaieb K. et Bakhrouf A. (2012) : Recherche des bactéries lactiques et étude in vitro de leurs propriétés probiotiques. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.* Vol 6, N°2, p : 147-163.
- 23 Pang Q.S., Guo B.J. and Ruan J.H. (1988): Enhancement of endonuclease activity and repair DNA synthesis by polysaccharide of *Spirulina platensis*. *Yi Chuan Xue Bao* 15:374-381.
- 24 Kaji, T., Fujiwara Y., Inomata Y. et al., (2002): Repair of wounded monolayers of cultured bovine aortic endothelial cells is inhibited by calcium spirulan, a novel sulfated polysaccharide isolated from *Spirulina platensis*. *Life Sci.* 70, 1841-1847.
- 25 Mendes R.L, Nobre B.P., Cardoso M.T., Pereira A.P., Palabra A.F., (2003): Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. *Inorganica Chimica Acta*; 356:328-334.
- 26 Mayer A.M.S., Hamann M.T. (2005) Marine pharmacology in 2001–2002: marine compounds with antihelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Phycology*, Part C.; 140:265-286.
- 27 Mai D. Ibrahim, Mohamed F. Mohamed and Marwa A Ibrahim, (2012): The role of *spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) in growth, immunity, P53 level of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its resistance to infection. *SCVMJ*, XVII (1), 211-226.