



Charakterystyka jadalnej cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira*

Magdalena Miklaszewska, Małgorzata Waleron, Krzysztof Waleron
Katedra Biotechnologii, Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin,
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i AMG, Gdańsk

Characteristics of edible cyanobacteria of the genus *Arthrospira*

Summary

The genus *Arthrospira* includes filamentous cyanobacteria with multicellular cylindrical trichomes arranged in an open helix. The biomass of *Arthrospira* is composed of protein (50-70%), carbohydrates, lipids and minerals. It also contains carotenoids, phycocyanin and vitamins. *Arthrospira* species are found in tropical and semitropical regions. *Arthrospira* is industrially cultivated because of its high nutritional values as well as of its therapeutic properties. Commercial production of *Arthrospira* is carried out in open ponds and closed bioreactors. The biomass is sold by the incorrect name "Spirulina" as a result of confusion in nomenclature regarding the genus *Arthrospira*.

Key words:

cyanobacteria, *Arthrospira*, cell structure and composition, genetics, taxonomy, cultivation.

1. Wstęp

Cyanobakterie, zwane potocznie sinicami, to prokariotyczne organizmy zaliczane do bakterii. Posiadają one chlorofil *a* i przeprowadzają fotosyntezę tlenową (z wytworzeniem tlenu). Są organizmami pionierskimi – charakteryzują się one wysoką tolerancją na czynniki środowiskowe, co pozwala im na występowanie w ekstremalnych warunkach, np. na Antarktydzie czy w źródłach termalnych. Najczęściej spotyka się je w środowisku wodnym. Zainteresowanie tymi organizmami wynika głównie z faktu, że wiele gatunków cyjanobakterii zdolnych do syntezy

Adres do korespondencji

Krzysztof Waleron,
Katedra Biotechnologii,
Międzyuczelniany Wydział
Biotechnologii UG i AMG,
ul. Kładki 24,
80-824 Gdańsk;
e-mail:
waleron@biotech.univ.gda.pl

biotechnologia

3 (82) 103–118 2008

toksyn pojawia się masowo w zanieczyszczonych zbiornikach wodnych w postaci tzw. zakwitów, dlatego też organizmy te budzą raczej negatywne skojarzenia (1).

Cyjanobakterie z rodzaju *Arthrospira* stanowią przeciwieństwo gatunków wytwarzających toksyny niebezpieczne dla ludzi i zwierząt. Właściwości odżywcze biomasy *Arthrospira* zostały odkryte niezależnie przez dwie populacje: Azteków w Ameryce Południowej i plemiona afrykańskie z rejonu jeziora Czad. W badaniach nad tym organizmem przeprowadzonych w XX w. wykazano liczne właściwości lecznicze biomasy *Arthrospira*. Obecnie preparaty z *Arthrospira* są wartościowym suplementem diety. Ponadto *Arthrospira* stanowi jeden z kompartmentów systemu MELISSA (Micro-Ecological Life Support System Alternative), którego zadaniem w przyszłości będzie podtrzymywanie życia kosmonautów w czasie długotrwałych wypraw (2). Biomasa *Arthrospira* jest stosowana również do oczyszczania ścieków i produkcji barwników używanych w przemyśle. W badania nad właściwościami cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira* angażuje się coraz większa liczba naukowców i lekarzy.

2. Morfologia trychomu i wpływ warunków zewnętrznych na strukturę helisy

Gatunki z rodzaju *Arthrospira* należą do wielokomórkowych, nitkowatych cyjanobakterii. Kilkumilimetrowe trychomy, układające się w strukturę otwartej helisy, zbudowane są z cylindrycznych komórek, które dzielą się symetrycznie (binarnie) w płaszczyźnie prostopadłej do głównej osi. W mikroskopie świetlnym widoczne są przegrody, które występują co 2-3 μm . Trychomy wykazują zdolność ruchu ślizgowego wzdłuż osi długiej. Nie mają heterocytów. Elongacja zachodzi poprzez wielokrotny podział komórek interkalarnych wzdłuż całego trychomu. Komórki terminalne niektórych szczepów mogą posiadać przypominające czapeczkę zgrubienie zewnętrznej ściany (*calyptra*). Szerokość komórek waha się od 3 do 12 μm , wyjątkowo dochodzi do 16 μm . Skok helisy mieści się w granicach od 10 do 70 μm , a jej średnica – od 20 do 100 μm . Parametry charakteryzujące helisę są odmienne dla poszczególnych gatunków *Arthrospira*; zaobserwowano nawet różnice w obrębie jednego gatunku. Ponadto zależą one od warunków środowiska. Pomimo to helikalny kształt trychomów jest uznawany za specyficzną cechę rodzaju *Arthrospira* (3,4).

Helikalny kształt trychomu utrzymywany jest jedynie w podłożu płynnym, natomiast na pożywce stałej trychomy tworzą płaską spiralę. Przejście helisy w płaską spiralę zachodzi wolno i jest uzależnione od zawartości wody w pożywce, natomiast proces odwrotny następuje prawie natychmiast w momencie kontaktu spirali z wodą. Zjawisko to jest najprawdopodobniej spowodowane koniecznością zredukowania powierzchni trychomu narażonej na działanie powietrza w przypadku wzrostu na podłożu stałym. Zachodzi ono zapewne wskutek hydratacji i dehydratacji oligopeptydów w warstwie peptydoglikanu, wchodzącego w skład ściany komórkowej, w efekcie czego następuje zmiana sztywności komórek (3).

Odnotowuje się również formy o prostych trychomach. Jeśli dany szczep przejdzie w taką formę, powrót do helikalnego kształtu zazwyczaj nie następuje. W jednej z hipotez mówi się o możliwości występowania mutacji, które ujawniają się w pewnych warunkach i wpływają na kształt trychomów niektórych szczepów. Częste występowanie form o prostych trychomach w hodowlach laboratoryjnych sugeruje, że geny warunkujące cechę helikalności mogą być zlokalizowane na plazmidach, lecz dotąd nie zidentyfikowano tego typu genów w żadnym ze szczepów *Arthrospira*. W 1996 r. Fox zdołał przywrócić helikalny kształt prostym trychomom poprzez zastosowanie światła widzialnego o wysokim natężeniu. Przypuszczalnie helikalny kształt chroni organizm przed fotolizą – zjawiskiem często występującym w naturalnych zbiornikach wodnych. Szczepy laboratoryjne, hodowane przy niskich natężeniach światła lub w dobrze mieszanych, gęstych kulturach na świeżym powietrzu, nie są narażone na fotolizę, stąd częste występowanie form o prostych trychomach (4).

Zaobserwowano również, że hodowanie szczepów *Arthrospira* w warunkach stresowych takich jak wysoka temperatura i wysoko alkaliczne podłoże powoduje silniejsze skręcenie trychomów (4).

3. Ultrastruktura komórek *Arthrospira*

Stosując techniki mikroskopii elektronowej wykazano, że ściana komórkowa *Arthrospira platensis* jest zbudowana z czterech warstw. Najbardziej zewnętrzna warstwa (L-IV), będąca analogiem błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych, układa się równolegle do długiej osi trychomu. Warstwa L-III składa się najprawdopodobniej z białkowych włókien owijających się spiralnie wokół trychomu, natomiast zbudowana z peptydoglikanu warstwa L-II załamuje się w kierunku środka trychomu, tworząc wraz z wewnętrzną fibrylarną warstwą L-I przegrodę oddzielającą komórki od siebie. Przegroda jest widoczna jako cienki, częściowo pofałdowany dysk. Rozmiar sfaldowanej powierzchni jest powiązany ze skokiem helisy – im większy skok, tym mniejszy zasięg pofałdowania. Rozciąganie trychomu powoduje zanik sfaldowania. U cyjanobakterii nieposiadających helikalnie zwiniętych trychomów nie występuje ono wcale (3). Ściana komórkowa jest pokryta śluzową otoczką składającą się z wielocukrów (4).

Tylakoidy w komórkach *Arthrospira* są ułożone w koncentryczne zwoje. Podczas podziału komórki tylakoidy pękają, co umożliwia ich dystrybucję do komórek potomnych (3). Fikobilisomy będące agregatami fikobiliprotein przylegają do tylakoidów. Do fikobiliprotein należą allofikocyjanina (APC), fikocyjanina C (CPC), fikoerytryna (PE) i fikoerytrocyjanina (PEC). Funkcją tych barwników jest absorpcja energii tych fal świetlnych, które nie są pochłaniane przez inne barwniki fotosyntetyczne. Energia jest przekazywana w kolejności PE/PEC → CPC → APC → centrum reakcji fotochemicznej z wydajnością wyższą niż 95%. Komórki cyjanobakterii z rodzaju

Arthrospira zawierają tylko allofikocyjaninę i fikocyjaninę C (5). Fikobilisomy są zbudowane z trójcylicylnego rdzenia, w którego skład wchodzi APC (każdy cylinder zawiera cztery trimery tego fikobilisomu). Od rdzenia promieniowo rozchodzą się pręciki złożone z CPC (5,6).

Komórki zawierają również wakuole gazowe zbudowane z walcowatych pęcherzyków gazowych o końcach w kształcie stożków. Ich długość wynosi 1 μm , a średnica 65 nm. Błona pęcherzyków zawiera zwoje białek ułożonych w odległe od siebie o 4-5 nm żebra (3).

Ziarna cyjanoficyny – związku zawierającego łańcuchy kwasu poli-L-asparaginoowego z dołączonymi do grup β -karboksylowych argininami – obecne są w komórkach *Arthrospira* w zależności od składu pożywki, wieku komórki i temperatury, w jakiej prowadzona jest hodowla. Wykryto również ciała poliglukanu (głównie w pobliżu przegród), ciała cylindryczne, karboksosomy i mezosomy (3,4).

Van Eykelenburg badał wpływ temperatury, intensywności oświetlenia oraz zawartości azotu w pożywce na występowanie organelli i inkluzji komórkowych. W temperaturach poniżej 25°C, gdy zapotrzebowanie na aminokwasy jest małe wskutek ograniczonego tempa wzrostu, oraz przy wysokiej zawartości azotu w pożywce (120 mM) ziarna cyjanoficyny zajmowały 18% objętości komórki. Wraz ze wzrostem temperatury, ich zawartość malała. W przedziale od 25 do 30°C nie wykryto obecności tych inkluzji. Najwyższą zawartość poliglukanu w komórkach *Arthrospira* zanotowano w temperaturach od 15 do 17°C i przy niskim (3 mM) stężeniu azotu. W temperaturach wyższych związku tego było mniej. Karboksosomy – inkluzje zawierające karboksylazę rybulozo-1,5-bifosforanową, enzym włączający CO₂ do rybulozo-1,5-bifosforanu, w wyniku czego powstają 2 cząsteczki kwasu 3-fosfoglicerynowego – obecne były jedynie, gdy komórki hodowano w intensywnym świetle i przy wysokim stężeniu azotu w pożywce (120 mM) (7).

Poli- β -hydroksymaślan (PHB) – związek będący rezerwuarem węgla i energii u wielu bakterii – jest gromadzony w czasie eksponentyjnego wzrostu osiągając na początku fazy stacjonarnej zawartość 6% suchej masy (8). W badaniach przeprowadzonych przez Vincenzini i wsp. wykazano niskie stężenie tego polimeru podczas fotoautotroficznego wzrostu, natomiast po dziesięciu dniach mikotroficznego wzrostu w obecności octanu jego zawartość wynosiła 3% suchej masy. Synteza PHB jest regulowana głównie przez 3-ketotiolazę (9).

4. Genetyka cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira*

Wielkość genomu cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira* wynosi 5,4 Mbp, a skład zasad mol% G+C – 44 (3,10). Obecnie genom *A. platensis*, poddawany jest badaniom m.in. sekwencjonowaniu (10).

Cyjanobakterie z rodzaju *Arthrospira* są odporne na powszechnie używane metody inżynierii genetycznej, co jest częściowo spowodowane wysoką aktywnością de-

oksyrybonukleaz, które powodują degradację wprowadzonych konstruktów DNA. W genomie znajduje się wiele sekwencji zmodyfikowanych przez metylację, co stanowi ochronę przed aktywnością egzo- i endonukleaz. Uniemożliwia to trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi wrażliwymi na metylację, a co za tym idzie, klonowanie genów tego organizmu (11-13). Kawata i wsp. opracowali metodę tworzenia biblioteki DNA *Arthrospira*. Kolejne etapy tej metody to sonifikacja genomowego DNA, modyfikacja końców fragmentów polimerazą Taq DNA i ligacja z wektorem typu TA. Metoda ta sprawdziła się w przypadku klonowania genu syntazy fitoenu (*crtB*) (12).

W eksperymentach przeprowadzonych przez Toyomizu i wsp. wykazano, że elektroporacja jest skuteczną metodą transformacji *A. platensis*. Najwyższą efektywność uzyskano przy zastosowaniu impulsu trwającego 5 ms i natężeniu pola elektrycznego 4 kV/cm. Jednak oporność na chloramfenikol, warunkowana obecnością genu zlokalizowanego na wprowadzonym plazmidzie, nie utrzymała się przy dłuższej hodowli, co wskazuje na niestabilność plazmidu wewnątrz komórki (14).

Próby transformacji *A. platensis* za pomocą elektroporacji z użyciem naturalnego transpozonu Tn5, transpozazy i kompleksu liposomów kationowych przeprowadzone przez Kawata i wsp. zakończyły się powodzeniem. Aktywność acetylotransferazy chloramfenikolu, kodowanej przez gen reporterowy *cat*, utrzymywała się w komórkach *Arthrospira* przez dłużej niż dwa miesiące (15).

Dotychczas pojawiły się jedynie dwa doniesienia o obserwacji lub izolacji plazmidu z komórek *Arthrospira* (10,11), ale nie zostały one potwierdzone przez inne grupy badawcze. Dlatego przyjmuje się, że gatunki *Arthrospira* nie mają plazmidów. Nie wykryto fagów infekujących komórki tych cyjanobakterii (4).

Ling i wsp. stworzyli fosmidową bibliotekę genów *Arthrospira maxima* FACHB438 zawierającą 4300 klonów. Wielkość wklonowanych fragmentów wahała się od 15,5 kZ do 48,9 kZ. Fragmenty wybrane (602 sekwencje) do analizy stanowiły 5,7% całego genomu *A. maxima*. 47,7% sekwencji było homologicznych do genów o znanych funkcjach. Wykryto dużą liczbę kopii genu kodującego odwrotną transkryptazę (ang. *retron-type* RT), co może wskazywać na obecność msDNA (ang. *mutlicopy single-stranded DNA*) (10).

5. Systematyka

Cyjanobakterie początkowo zaliczane były do glonów, gdzie stanowiły klasę *Cyanophyceae*. Wynikało to głównie z faktu, że aparat fotosyntetyczny tych organizmów miał wiele cech wspólnych z aparatem występującym w roślinie. Przykładem jest obecność chlorofilu *a* (16). Do dziś określa się je jako mikroalgi, co odzwierciedla ekologię tych organizmów. W 1962 r. został wprowadzony wyraźny podział na organizmy prokariotyczne i eukariotyczne oparty na różnicach w budowie komórkowej. W 1969 r. Stanier i van Neil umieścili sinice w królestwie *Procaryota* i zaproponowali nazwę cyjanobakterie (17).

Systematyka rodzaju *Arthrospira* (Domena: *Bacteria*, Gromada X: *Cyanobacteria*, Klasa I: *Cyanobacteria*, Podsekcja III: *Oscillatoriales*) przez kilkadziesiąt lat stanowiła problem dla specjalistów z tej dziedziny (18). Poszczególne gatunki przyporządkowywane były przez kolejnych badaczy bądź do ustanowionego w 1829 r. przez Turpina rodzaju *Spirulina*, bądź do zaproponowanego w 1852 r. przez Stizenbergera rodzaju *Arthrospira*. W 1989 r. Castenholz w *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology* odseparował oba rodzaje i umieścił je w rzędzie *Oscillatoriales*. Jednocześnie zaproponował trzy cechy mające je rozróżnić: stopień nachylenia skoku helisy trychomu do osi poprzecznej, obecność widocznych pod mikroskopem świetlnym przegród i rozmieszczenie porów w ścianie komórkowej (4). W analizie sekwencji 16S rRNA potwierdzono odrębność filogenetyczną obu rodzajów (19).

Trudności w klasyfikacji cyjanobakterii z rodzajów *Arthrospira* i *Spirulina* wpłynęły na obecną sytuację. Produkty wytwarzane z cyjanobakterii rodzaju *Arthrospira* są rozprowadzane pod nazwą handlową *Spirulina*, która weszła do powszechnego użycia, a jej stosowanie jest dopuszczalne nawet w pracach naukowych. Utrudnia to wprowadzenie prawidłowej terminologii, a także jest przyczyną niewłaściwego wyboru do hodowli cyjanobakterii z rodzaju *Spirulina*, które są niejadalne (4).

Problemy pojawiają się w również w przypadku podziału rodzaju *Arthrospira* na gatunki. Oparty jest on na cechach morfologicznych, m.in. na rozmiarach i kształtach trychomów, które – jak już wspomniano – zależą w dużym stopniu od warunków zewnętrznych. Dlatego stosuje się metody analizy genotypu w celu ustalenia pokrewieństwa poszczególnych cyjanobakterii w obrębie rodzaju. Sekwencje wykorzystywane w tych badaniach to 16S RNA, ITS (ang. *internal transcribed spacer*) regionu 16S-23S, obszar międzygenowy oddzielający geny *cpcB* i *cpcA* kodujące c-fikocyjaninę (PC-IGS) czy geny istotne dla funkcjonowania komórki (ang. *housekeeping*) takie jak *gyrA*, *recA*, *rpoC1* (19-23).

Konieczna jest również precyzyjna identyfikacja szczepów *Arthrospira* wykazujących zdolność do wytwarzania toksyn oraz potwierdzenie bądź wykluczenie ich przynależności do tego rodzaju. Obecnie identyfikacja i klasyfikacja bakterii opierają się przede wszystkim na metodzie hybrydyzacji DNA/DNA oraz na analizie sekwencji 16S rRNA. Hybrydyzacja DNA/DNA jest metodą pracochłonną wymagająca aksenicznych szczepów (wolnych od kontaminacji przez heterotroficzne bakterie), co w przypadku cyjanobakterii jest niezwykle trudne, a czasem wręcz niemożliwe do uzyskania. Dlatego też metoda ta jest bardzo rzadko wykorzystywana w celu określenia gatunku cyjanobakterii, a nowoczesna systematyka tej unikatowej grupy mikroorganizmów opiera się na analizie sekwencji 16S rRNA i charakterystyce cech morfologicznych, co jest przyczyną licznych kontrowersji. W przypadku rodzaju *Arthrospira* precyzyjną identyfikację i klasyfikację utrudnia dodatkowo brak szeregu wzorcowego.

Jako rozwiązanie alternatywne proponowana jest analiza sekwencji wielu konserwatywnych genów (technika MLST, ang. *multilocus sequence typing*) (24). Metoda ta jest coraz powszechniej stosowana i wydaje się, że może doprowadzić do kompro-

misu w kwestii sposobu opisywania nowych gatunków cyjanobakterii i ustalenia ich systematyki, w tym rodzaju *Arthrospira*.

6. Występowanie

Gatunki *Arthrospira* są izolowane z różnorodnych środowisk. Ich obecność zanotowano w glebie, piaskach, bagnach, solniskach, wodach słodkich (od klimatu równikowego do podzwrotnikowego), gorących źródłach, zbiornikach ciepłej wody pochodzącej z elektrowni czy w stawach rybnych, a także w wodach morskich. Jednak głównie występują w alkalicznych, słonawych i słonych wodach w klimacie tropikalnym i subtropikalnym (3,4).

Najbardziej rozpowszechnione gatunki to *A. platensis* odnotowana głównie w Afryce, Azji i Ameryce Południowej oraz *A. maxima*, której występowanie ogranicza się do Ameryki Centralnej (4).

Geograficzne rozmieszczenie dotychczas zidentyfikowanych populacji gatunków z rodzaju *Arthrospira* przedstawione są w tabeli 1.

Tabela 1

Występowanie dotychczas zidentyfikowanych głównych populacji *Arthrospira* (4)

Kraj	Miejsce występowania	Gatunek
1	2	3
Afryka		
Czad	jeziora sodowe: Bodou, Mombolo, Rombou, Yoan; kraina Kanem	<i>A. platensis</i> , <i>A. platensis</i> f. <i>minor</i>
Kenia	jeziora sodowe: Bogoria, Crater, Elmnteita, Nakuru; Wielka Dolina Ryftowa	<i>A. platensis</i>
	Jezioro Bogoria	<i>A. platensis</i> , <i>A. platensis</i> f. <i>minor</i> , <i>A. fusiformis</i>
	Jezioro Simki	<i>A. platensis</i> , <i>A. fusiformis</i>
Etiopia	Jezioro Aranguadi, Jezioro Chiru	<i>A. platensis</i> , <i>A. fusiformis</i>
Egipt	Jezioro Matyut	<i>A. platensis</i>
Sudan	Jezioro Dariba; Dżebel Marra	<i>A. platensis</i>
Algieria	Staw Tamanrasset	<i>A. platensis</i>
Azja		
Indie	stawy	<i>A. maxima</i>
	Jezioro Lonar	<i>A. indica</i>
Pakistan	stawy rybne; Lahore	<i>Arthrospira</i> sp.
Sri Lanka	Jezioro Beria	<i>Arthrospira</i> sp.
Tajlandia	zbiorniki ze ściekami z fabryki tapioki; Bangkok	<i>Arthrospira</i> sp.
Rosja	jezioro Tunatan; stepy syberyjskie	<i>A. fusiformis</i>

1	2	3
Chiny	stawy rybne; Nanking	<i>A. platensis</i>
Ameryka		
Meksyk	Jezioro Texcoco	<i>A. maxima</i>
Kalifornia	staw; Oakland przybrzeżna laguna; Del Mar	<i>A. maxima</i> , <i>A. platensis</i>
Peru	Jezioro Huachachina	<i>A. platensis</i> , <i>A. maxima</i>
Urugwaj	Montevideo	<i>A. platensis</i>
Europa		
Hiszpania	Jezioro Santa Olalla	<i>Arthrospira</i> sp.
Francja	małe jezioro; Camargue	<i>Arthrospira</i> sp.
Węgry	Adasztevel-Oroshaz	<i>Arthrospira</i> sp.

7. Warunki wzrostu i metody hodowli cyanobakterii z rodzaju *Arthrospira*

Gatunki z rodzaju *Arthrospira* są miksotrofami, co oznacza, że mogą się one odżywiać zarówno autotroficznie, jak i heterotroficznie (25). Dodatek do pożywki 0,1% glukozy przyspiesza tempo i wydajność wzrostu komórek. Hodowla w słabym świetle w warunkach umożliwiających wzrost miksotroficzny pozwala na uzyskanie od dwóch do trzech razy więcej komórek niż w przypadku wzrostu autotroficznego. Zastosowanie izotopu ^{14}C pozwoliło na określenie zużycia glukozy przez *A. platensis*. W ciągu 4 dni hodowli dodana do pożywki glukoza (0,1%) została usunięta z pożywki i prawie 50% znacznika znalazło się w komórkach. Reszta ^{14}C została wydalona z komórki jako CO_2 (34%) lub jako organiczny produkt uboczny wydalony do pożywki (3).

Cyanobakterie przeprowadzają fotosyntezę tlenową (z wydzieleniem tlenu). Podobnie jak u innych cyanobakterii większość cząsteczek chlorofilu *a* w komórkach różnych gatunków *Arthrospira* jest związana z fotosystemem PSI (*A. platensis* – 95%), a stosunek PSI/PSII wynosi 5,5 (26).

7.1. Rozmnażanie

W obrębie dojrzałego trychomu powstają wyspecjalizowane komórki (zamierające) – nekridia, które ulegają lizie i tworzą dwuwklęsłe dyski rozdzielające. W tym miejscu następuje rozerwanie trychomu w wyniku, którego powstają ślizgające się łańcuchy dwóch do czterech komórek (hormogonia). Zdolność ruchu pozwala im wypełznąć z rodzicielskiego trychomu i dać początek nowemu organizmowi. W kolejnym etapie komórki hormogonium tracą fragmenty komórek zamierających, zaokrąglają się na dystalnych końcach. W czasie tego procesu w cytoplazmie znajdują się niewiele inkluzji, a komórki są bladoniebieskozielone. Liczba ko-

mórek wzrasta wskutek podziałów komórkowych. Trychomy ulegają wydłużeniu i przybierają kształt helisy. W cytoplazmie wzrasta liczba inkluzji, a niebieskozielony kolor komórek staje się intensywniejszy (3).

7.2. Reakcja na czynniki środowiska

7.2.1. Światło

Optymalny wzrost *Arthrospira platensis* występuje przy natężeniu oświetlenia rzędu 120-200 $\mu\text{moli fotonów m}^{-2} \text{s}^{-1}$, co stanowi od 10 do 15% całkowitego natężenia promieniowania słonecznego o zakresie długości fal od 400 do 700 nm.

W hodowlach laboratoryjnych *Arthrospira* podczas zastosowania oświetlenia o wysokim natężeniu w warunkach niedoboru CO_2 zaobserwowano zjawisko fotoinhibicji. Zmniejszenie aktywności fotosyntetycznej spowodowane było zapewne akumulacją H_2O_2 . Odpowiedź na stres wywołany nadmiernym oświetleniem jest różna w zależności od szczepu *Arthrospira*, co może być spowodowane zarówno cechami genotypowymi, jak i warunkami wzrostu. Udowodniono, że w jednym ze szczepów ta odmienność wynika z innego niż u pozostałych tempa obrotu metabolicznego białka D1, będącego częścią PSII. Zaobserwowano również, że kultury hodowane w warunkach wysokiego natężenia oświetlenia wykazują wysoką odporność na fotoinhibicję (4).

7.2.2. Temperatura

Optymalna temperatura dla hodowli laboratoryjnej szczepów *Arthrospira* wynosi 30-38°C, ale dla niektórych szczepów wartość ta może odbiegać od podanego zakresu, np. dla szczepu SA2 wynosi 24-28°C, a dla szczepu EY – 40-42°C. Na wartość optymalnej temperatury wzrostu ma wpływ również skład biochemiczny komórek. Podczas hodowania szczepu M2 *A. platensis* w 42°C (temperatura maksymalnego wzrostu) zaobserwowano znaczne obniżenie ilości barwników fotosyntetycznych i białek oraz wzrost zawartości węglowodanów, co jest związane ze zmianą stopnia nasycenia kwasów tłuszczowych (np. ograniczenie syntezy kwasu γ -linolenowego na rzecz akumulacji kwasu linolowego) (4).

7.2.3. Zasolenie

Nie zaobserwowano powszechnego występowania gatunków *Arthrospira* w środowisku morskim, co najprawdopodobniej wynika nie tyle z wysokiej zawartości

soli, co raczej z niskiego stężenia jonów dwuwęglanowych (4). Występują one natomiast w jeziorach sodowych, charakteryzujących się dużą zawartością siarczanu lub węglanu sodu. Jony Na^+ w odpowiednim stężeniu (150-250 mM) są konieczne do prawidłowego wzrostu tych cyjanobakterii w wysokim pH i przeprowadzania procesów fotosyntezy. Zbyt niskie stężenie jonów Na^+ (< 50 mM) powoduje zahamowanie aktywności fotosystemu PSII i zmniejszenie zawartości fikocyjaniny (27).

Dodanie do hodowli *Arthrospira* NaCl (0,5 oraz 1,0 M) spowodowało natychmiastowe zatrzymanie procesu fotosyntezy, który został przywrócony dopiero po pewnym czasie. Czas zahamowania wzrostu zależy od stopnia stresu, jakiemu został poddany organizm i jest związany ze zmniejszaniem się ilości chlorofilu oraz zagęszczenia biomasy w hodowli (4).

Adaptacja do wysokiego stężenia soli polega na obniżeniu potencjału osmotycznego komórki. U cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira* zjawisko to zachodzi na drodze akumulacji węglowodanów o małej masie cząsteczkowej, m.in. dziewięciowęglowego glukozoglicerolu i trehalozy. Zanotowano również podwyższoną zawartość lipidów oraz wzrost nasycenia kwasów tłuszczowych. W szczepie M2 ilość kwasu oleinowego podwoiła się podczas wzrostu w obecności 0,5 M NaCl (4).

7.3. Hodowla laboratoryjna

Do prawidłowego wzrostu cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira* konieczne jest światło słoneczne, CO_2 , azot nieorganiczny i składniki mineralne. Optymalna temperatura wzrostu to 35-37°C, ale wartość ta może być inna dla poszczególnych szczepów. Minimalna temperatura, w której jeszcze następuje wzrost to 18°C. Optymalne pH wynosi 9,2-9,5, ale organizm ten z powodzeniem rośnie w pH w granicach 8-10. Taka wysoka wartość pH hamuje do pewnego stopnia wzrost innych organizmów takich jak bakterie czy pierwotniaki (25,28-30). Ze względu na występowanie zjawiska fotoinhibicji, zaleca się, aby hodowla była początkowo prowadzona w świetle o niskim natężeniu ($20 \mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Natężenie światła należy stopniowo zwiększać do osiągnięcia wartości optymalnej ($120\text{-}200 \mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (31).

Do hodowli laboratoryjnych cyjanobakterii *Arthrospira* stosuje się stałe lub płynne podłoże o nazwie Zarrouk medium (tab. 2) (32).

Uzyskanie aksenicznych kultur cyjanobakterii jest trudne i czasochłonne, szczególnie w przypadku gatunków nitkowatych. Choi i wsp. opracowali metodę, która pozwala na uzyskiwanie aksenicznych kultur *A. platensis* po 3 dniach hodowli. Pierwszym etapem jest oddzielenie komórek *Arthrospira* od komórek innych bakterii poprzez wirowanie – cyjanobakterie ze względu na obecność wakuol gazowych unoszą się na powierzchnię. Etap ten jest powtarzany kilkakrotnie. Następnie cyjanobakterie są hodowane bez dostępu światła w obecności antybiotyków: imipenemu (100 $\mu\text{g/ml}$), neomycyny (100 $\mu\text{g/ml}$) i cykloheksimidu (20 $\mu\text{g/ml}$). Metoda ta pozwoliła na efektywną eliminację bakterii wyizolowanych z laboratoryjnych hodowli 5 szczepów *A. platensis* (33).

Tabela 2

Skład pożywki dla *Arthrospira* (31,32)

Zarrouk medium (g/l)		Roztwór A5 (g/l)	
NaNO ₃	2,5 g	ZnSO ₄ × 7H ₂ O	0,222 g
K ₂ SO ₄	1,0 g	CuSO ₄ × 5H ₂ O	0,079 g
NaCl	1,0 g	MoO ₃	0,015 g
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,2 g	H ₃ BO ₃	2,86 g
CaCl ₂ × 2H ₂ O	0,04 g	MnCl ₂ × 4H ₂ O	1,81 g
FeSO ₄ × 7H ₂ O	0,01 g	Roztwór B6 (g/l)	
EDTA	0,08 g	NH ₄ VO ₃	0,023 g
NaHCO ₃	10,8 g	KCr(SO ₄) ₂ × 12H ₂ O	0,096 g
Na ₂ CO ₃	7,6 g	NiSO ₄ × 7H ₂ O	0,048 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g	Co(NO ₃) ₂ × 6H ₂ O	0,049 g
roztwór A5	1 ml	Na ₂ WO ₄ × 4H ₂ O	0,018 g
roztwór B6	1 ml	Ti(SO ₄) + TiOSO ₄	0,048 g
pH	9,5 – 10,5		

W badaniach nad optymalnym inokulum dla hodowli *A. platensis* prowadzonych w 200 ml kolbach i 5 l zbiornikach wykazano, że najlepszy wzrost cyjanobakterii uzyskuje się w przypadku zastosowania 6-dniowego inokulum zawierające 50 mg/l komórek. Hodowle prowadzono w temperaturze 30°C (34).

7.4. Hodowla na skalę przemysłową

Hodowle *Arthrospira* na skalę przemysłową prowadzi się głównie w otwartych i płytkich (12-15 cm głębokości) zbiornikach wyposażonych w mieszadła łopatkowe (25,35). Głównymi zaletami tej metody są niskie nakłady inwestycyjne i możliwość wykorzystania energii słonecznej. Produkcja biomasy jest jednak dużo mniejsza od teoretycznego maksimum i wynosi od 0,1 do 0,5 g suchej masy na liter (36).

W hodowli *Arthrospira* na dużą skalę do pożywki dodaje się NaHCO₃ (16,8 g/l) w celu podniesienia pH i zapewnienia obecności źródła węgla. Mikroelementy dodawane są w zależności od jakości wody używanej do hodowli (25,28). Do wzrostu tych cyjanobakterii wymagane są temperatury rzędu 30-38°C, dlatego całoroczna hodowla w otwartych zbiornikach możliwa jest jedynie w regionach tropikalnych i subtropikalnych (37).

Czynnikami wpływającymi na tempo wzrostu są: intensywność oświetlenia, temperatura, pH, stężenie soli i substancji odżywczych oraz początkowe zagęszczenie biomasy. Udowodniono, że warunki wzrostu mają wpływ zarówno na morfologię

komórek, jak i na skład chemiczny tych cyjanobakterii. Przykładem zwiększenia się zawartości kwasów tłuszczowych w komórkach w przypadku ograniczenia źródła azotu. Zaobserwowano również, że zastosowanie mocznika jako źródła azotu i wydłużenie czasu zaciemnienia pozwala na uzyskanie większej ilości kwasu γ -linolenowego (29,38).

Przez długi czas hodowle *Arthrospira* prowadzone były w warunkach umożliwiających wzrost fotoautotroficzny. Odkryto, że organizm ten jest zdolny do wykorzystywania organicznego źródła węgla, np. glukozy oraz wzrostu heterotroficznego i miksotroficznego (fotoheterotroficznego). W badaniach wykazano, że wzrost na pożywce wzbogaconej o glukozę był lepszy niż ten oparty wyłącznie na procesie fotosyntezy (39).

Zamiast azotanów (głównie KNO_3) jako źródła azotu można zastosować tańszy amoniak lub mocznik. Stężenie amoniaku powinno być niższe niż 3 mg/l, gdyż powyżej tej wartości związek jest toksyczny dla komórek *Arthrospira* (25). Przetestowano przydatność następujących źródeł azotu: KNO_3 , NaNO_3 , mocznik, NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i wykazano, że zastosowanie mocznika pozwoliło na otrzymanie wysokiego poziomu produkcji kwasu γ -linolenowego, natomiast ilość uzyskanej biomasy i zawartość chlorofilu były wyższe niż przy użyciu KNO_3 (40,41). Mocznik jest hydrolizowany do łatwo przyswajanego przez komórki amoniaku w alkalicznym pH pożywki. Pozwala to na oszczędność energii, gdyż zastosowanie KNO_3 jest związane z redukcją w komórkach cyjanobakterii azotanów do azotynów, a następnie do amoniaku. Proces ten wymaga nakładu energii. Problem toksyczności amoniaku może być rozwiązany poprzez okresowe zasilanie hodowli mocznikiem, co pozwala na utrzymanie stężenia amoniaku poniżej szkodliwej wartości oraz na bieżące uzupełnianie ilości tego związku (42).

Hodowla *Arthrospira* na dużą skalę wymaga zastosowania specjalnych technik i stałej kontroli w celu wyeliminowania trudności i zagrożeń związanych z hodowlą na powietrzu. Głównymi problemami są: zachowanie czystości gatunkowej i odpowiedniej gęstości populacji oraz optymalnej temperatury. Konieczne jest monitorowanie zawartości rozpuszczonego tlenu, gdyż jego zbyt wysokie stężenie hamuje wzrost cyjanobakterii. Poziom azotanów i fosforanów powinien być regularnie uzupełniany (25,28).

Pierwsza próba produkcji *Arthrospira* na dużą skalę została podjęta w latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku przez Sosa Texcoco Co. na jeziorze Texcoco w Meksyku. Naturalne zakwity pojawiały się w zbiornikach przeznaczonych do ekstrakcji węgla sodu z jeziora. Zaczęto zatem odzyskiwać i sprzedawać uzyskaną biomasę. Cyjanobakterie hodowane były w otwartych zbiornikach w kształcie spirali o średnicy 3 km i całkowitej powierzchni 900 ha. Dziennie placówka ta produkowała 2 tony suchej masy *Arthrospira* (3,28). Z powodu rosnącego zanieczyszczenia jeziora wskutek urbanizacyjnego i przemysłowego rozwoju miasta Meksyk, zaprzestano hodowli *Arthrospira*. W 1977 r. firmy Dai Nippon Ink i Chemicals Inc. rozpoczęły produkcję tej cyjanobakterii w Tajlandii, a do roku 1980 w Azji działało 46 placówek tego typu wytwarzających

w sumie ponad 1000 kg biomasy w ciągu miesiąca (36). Obecnie w wielu krajach hoduje się cyjanobakterie z rodzaju *Arthrospira*, a ogólnoswiatowa produkcja biomasy tej cyjanobakterii jest oceniana na 3000 ton rocznie (28).

Prowadzone są badania nad hodowlą *Arthrospira* na ściekach pochodzących z fabryki mączki sago (43) oraz gnojowicy z farm świń (44). Takie zastosowanie *Arthrospira* pozwoli nie tylko na uzyskanie biomasy, która później może być wykorzystana jako karma dla zwierząt, ale również na oczyszczenie ścieków z substancji biogenych.

7.5. Hodowla w bioreaktorach

Pomimo powszechnego zastosowania otwartych zbiorników wodnych do hodowli cyjanobakterii na dużą skalę, uważa się, że w przyszłości do tego celu wykorzystywane będą głównie bioreaktory (36). Pozwalają one na efektywniejsze oświetlanie ze względu na korzystny stosunek powierzchni do objętości, osiągnięcie wysokiej gęstości biomasy, lepszą kontrolę warunków hodowli, uniknięcie zanieczyszczenia hodowli innymi mikroorganizmami i metalami ciężkimi oraz uzyskanie wysokiej wydajności absorpcji CO₂. Wadą stosowania bioreaktorów jest wysoki koszt spowodowany głównie koniecznością chłodzenia łatwo ulegającego przegrzaniu bioreaktora (36,45). Hodowle *Arthrospira* prowadzi się w bioreaktorach rurowych i płytowych, w których wykorzystywane jest światło słoneczne oraz bioreaktorach oświetlanych lampami różnego typu. Zastosowanie sztucznego źródła światła pozwala na kontrolę natężenia światła w czasie hodowli (46). Najczęściej stosuje się bioreaktory typu air-lift, gdyż ten system mieszania nie powoduje uszkodzenia komórek (37).

7.6. Odzysk biomasy *Arthrospira*

Oszacowano, że koszt odzysku biomasy stanowi 20-30% całkowitego kosztu hodowli mikroorganizmów. W procesie odzysku biomasy stosuje się następujące metody: dodawanie flokulantów, sedymentacja, wirowanie i filtracja. Flokulanty to głównie sole metali – ich wysokie stężenie może mieć negatywny wpływ na produkt końcowy. Ostatnie trzy metody wymagają natomiast zastosowania ciężkiego sprzętu, przez co często doprowadzają do mechanicznego uszkodzenia komórek. Biomasa *Arthrospira* jest odzyskiwana poprzez trój etapową filtrację, która jest ułatwiona ze względu na nitkowatą budowę tych cyjanobakterii. W pierwszym etapie odfiltrowaniu ulegają odpadki znajdujące się w zbiorniku, w drugim – komórki glonów i innych cyjanobakterii, a na końcu odzyskiwana jest czysta biomasa *Arthrospira*.

Naturalnie występująca pływalność cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira* wynika z posiadania przez te organizmy pęcherzyków gazowych, których ściany składają się głównie z hydrofobowych białek. Zanurzenie jest kontrolowane poprzez tworze-

nie nowych lub rozpad już istniejących pęcherzyków oraz przez zmianę zawartości węglowodanów w komórce. Poddanie komórek działaniu wysokiego ciśnienia powoduje zanik pęcherzyków gazowych. Wykazano, że komórki mają zdolność do unoszenia się w wodzie w konkretnym momencie fazy logarytmicznego wzrostu, kiedy synteza białek pęcherzyków gazowych znacznie przewyższa akumulację węglowodanów. W fazie stacjonarnej wzrostu pływalność zanika. Monitorowanie zawartości białek i węglowodanów w czasie wzrostu hodowli pozwala na określenie najlepszego czasu na zbiór biomasy *Arthrospira*. Wzmocnienie zjawiska flotacji można uzyskać dodając do zbiornika jony Na^+ i Mg^{2+} , które neutralizują ładunki ujemne na powierzchni komórek zapobiegając ich agregacji. Wykorzystanie pływalności cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira* w odzyskiwaniu biomasy jest metodą, która nie powoduje znaczącego uszkodzenia komórek, a co za tym idzie nie obniża wartości otrzymanej biomasy (47).

Uzyskana ze zbiornika masa jest następnie trzykrotnie płukana i poddawana przesączaniu próżniowemu. Kolejnym etapem jest suszenie. Najczęściej stosowane jest suszenie rozpyłowe, przeprowadzane w specjalnych komorach wypełnionych ogrzonym powietrzem, z którym biomasa ma kontakt jedynie przez kilka sekund. Jest to istotne w przypadku termowrażliwych składników takich jak fikocyjanina czy enzymy (48). Stosuje się również suszenie konwekcyjne i suszenie przy użyciu specjalnych bębnow (3,49). Firma Cyanotech opatentowała zamknięty system suszenia nazwany *Ocean Chill Drying*. Stężenie tlenu jest utrzymywane poniżej 1% poprzez wpompowywanie do komory suszącej azotu i dwutlenku węgla. Zapobiega to utlenianiu karotenów i kwasów tłuszczowych. Otrzymany proszek jest również chroniony przed oksydacją poprzez zastosowanie adsorbentów O_2 . Są one umieszczane w pojemnikach, w których przechowuje się sproszkowaną biomasę (50). Proszek jest następnie wykorzystany do produkcji preparatów.

8. Podsumowanie

Badania nad cyjanobakteriami z rodzaju *Arthrospira* są prowadzone od przeszło 40 lat. Rozwój nauk biologicznych, w szczególności biologii molekularnej pozwala na ich coraz lepsze scharakteryzowanie.

Zastosowanie nowych technologii umożliwiło zoptymalizowanie warunków hodowli i odzysku biomasy *Arthrospira*. Jednak jakość biomasy uzyskiwanej z otwartych zbiorników musi być bardzo dokładnie kontrolowana, gdyż hodowle tego typu mogą ulegać kontaminacji, m.in. toksycznymi gatunkami cyjanobakterii. Może to prowadzić do utraty dużych partii uzyskiwanej biomasy. Dlatego badania nad podniesieniem bezpieczeństwa hodowli w otwartych stawach są niezwykle istotne. Hodowle w bioreaktorach, w przypadku których ryzyko kontaminacji jest niskie, wiążą się z kolei z wysokimi kosztami. Prace prowadzone w celu obniżenia tych kosztów powinny przyczynić się do stopniowego zastępowania hodowli w zbiornikach

otwartych hodowlami w bioreaktorach, a co za tym idzie poprawieniem jakości otrzymywanej biomasy.

Ze względu na trudności związane z zastosowaniem metod inżynierii genetycznej u *Arthrospira*, istnieje niewiele danych dotyczących analizy poszczególnych genów tej cyjanobakterii. Poznanie sekwencji genomu powinno ułatwić prowadzenie badań i przyczynić się do ich rozwoju, czego następstwem może być znalezienie nowych zastosowań cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira*, np. do produkcji wodoru czy jako szczepionki jadalne dla ludzi i zwierząt. Inne obszary innowacyjnych badań nad cyjanobakteriami z rodzaju *Arthrospira* dotyczą możliwości wykorzystania biomasy *Arthrospira* do oczyszczania ścieków zarówno z metali ciężkich, jak i substancji organicznych.

Pełne omówienie licznych zastosowań biotechnologicznych tych cyjanobakterii zostało przedstawione w publikacji *Biotechnologiczny potencjał cyjanobakterii z rodzaju Arthrospira*.

Autorzy dziękują Pani prof. dr hab. E. Łojkowskiej za pomoc w redagowaniu tekstu.

Literatura

1. Singleton P., (2000), *Bakterie w biologii, biotechnologii i medycynie*, 430, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.
2. <http://ecls.esa.int/ecls/?p=melissa>.
3. Ciferri O., (1983), *Microbiol. Rev.*, 47 (4), 551-578.
4. Vonshak A., Tomaselli L., (2000), *Ecology of Cyanobacteria*, Eds. Whitton B. A., Potts M., 505-523, Kluwer Academic Publishers, Holandia.
5. Padyana A. K., Bhat V. B., Madyastha K. M., Rajashankar K. R., Ramakumar S., (2001), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 282, 893-898.
6. Gomez-Lojero C., Perez-Gomez B., Prado-Flores G., Krogmann D. W., Carabez-Trejo A., Pena-Diaz A., (1997), *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 29(10), 1191-1205.
7. van Eykelenburg C., (1980), *Antonie van Leeuwenhoek*, 46(2), 113-127.
8. Campbell J. III, Stevens S. E., Balkwill D. L., (1982), *J. Bacteriol.*, 149 (1), 361-363.
9. Vincenzini M., Sili C., de Philippis R., Ena A., Materassi R., (1990), *J. Bacteriol.*, 172(5), 2791-2792.
10. Ling N., Mao Y., Zhang X., Mo Z., Wang G., Liu W., (2007), *J. Appl. Phycol.*, online first.
11. Vachhani A. K., Vonshak A., (1997), *Spirulina Platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology*, Ed. Vonshak A., 67-77, Taylor & Francis, Wielka Brytania.
12. Kawata Y., Yano S., Kojami H., (1998), *Curr. Microbiol.*, 37, 289-291.
13. Waleron M., Duysens G., Wilmotte A., Mergeay M., (2004a), MELISSA. Yearly Report for 2003 Activity, Eds. Lobo M., Lasseur Ch., 117-123. <http://ecls.esa.int/ecls/?p=bibliography>.
14. Toyomizu M., Suzuki K., Kawata Y., Kojami H., Skiba Y., (2001), *J. Appl. Phycol.*, 13, 209-214.
15. Kawata Y., Yano S., Kojami H., Toyomizu M., (2004), *Mar. Biotechnol.*, 6, 355-363.
16. Stanier R.Y., Cohen-Bazire G., (1977), *Annu. Rev. Microbiol.*, 31, 225-274.
17. Sánchez M., Bernal-Castillo J., Roza C., Rodríguez I., (2003), *Universitas Scientiarum* 8(1), http://www.javeriana.edu.co/universitas_scientiarum/vol8n1/J_bernal.htm.
18. Castenholz R. W., (2001), *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., Vol. 1, Eds. Boone D. R., Castenholz R. W., Garrity G. M., 473-597, Springer-Verlag, Nowy Jork.
19. Scheldeman P., Baurain D., Bouhy R., Scott M., Muhling M., Whitton B. A., Belay A., Wilmotte A., (1999), *FEMS Microbiol. Lett.*, 172(2), 213-222.
20. Baurain D., Renquin R., Grubisic S., Scheldeman P., Belay A., Wilmotte A., (2002), *J. Phycol.*, 38, 384-393.

21. Manen J. F., Falquet J., (2002), *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52, 861-867.
22. Waleron M., Waleron K., Duysens G., Hendrickx L., Mergeay M., Wilmotte A., (2005), MELISSA. Yearly Report for 2004 Activity, Eds. Vieira da Silva L., Lasseur Ch., 94-99, <http://ecls.esa.int/ecls/?p= bibliography>.
23. Waleron M., Wilmotte A., Mergeay M., (2004b), MELISSA. Yearly Report for 2003 Activity, Eds. Lobo M., Lasseur Ch., 123-136, <http://ecls.esa.int/ecls/?p= bibliography>.
24. Maiden M. C. J., Bygraves J. A., Feil E., Morelli G., Russell J. E., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D. A., Feavers I. M., Achtman M., Spratt B. G., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 3140-3145.
25. Chojnacka K., Noworyta A., (2001), *Chemik*, 54 (4), 87-93.
26. Berry S., Bolychevtseva Y. V., Rögner M., Karapetyan N. V., (2003), *Photosyn. Res.*, 78, 67-76.
27. Pogoryelov D., Sudhir P.-R., Kovács L., Gombos Z., Brown I., Garab G., (2003), *J. Bioenerg. Biomembr.*, 35(5), 427-437.
28. Shimamatsu H., (2004), *Hydrobiologia*, 512, 39-44.
29. Costa J. A. V., Colla L. M., Filho P. F. D., (2004), *Bioresour. Technol.*, 92, 237-241.
30. Romano I., Bellitti M. R., Nicolaus B., Lama L., Manca M. C., Pagnotta E., Gambacorta A., (2000), *Phytochemistry*, 54, 289-294.
31. Vonshak A., (1997), *Spirulina Platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology*, Ed. Vonshak A., 218-219, Taylor & Francis, Wielka Brytania.
32. Duatis J., Elvira J., Mas J., Doulami F., (2003), MELISSA Final Report for 2002 Activity, Eds. Lobo M., Lasseur Ch., 243-250, <http://ecls.esa.int/ecls/?p= bibliography>.
33. Choi G. G., Bae M. S., Ahn C. Y., Oh H. M., (2008), *Biotechnol. Lett.*, 30(1), 87-92.
34. Pelizer L. H., Dalva E., Danesi G., Rangel C., Sassano C., Carvalho J. C., Sato S., Moraes I. O., (2003), *J. Food Eng.*, 56, 371-375.
35. <http://www.naturalways.com/spirulina-production.htm>.
36. Borowitzka M. A., (1999), *J. Biotechnol.*, 70, 313-321.
37. Converti A., Lodi A., del Borghi A., Solisio C., (2006), *Biochem. Eng. J.*, 32, 13-18.
38. Costa J. A. V., Colla L. M., Filho P. F. D., (2004), *Bioresour. Technol.*, 92, 237-241.
39. Costa J. A. V., Linde G. A., Atala D. I. P., Mibielli G. M., Krüger R. T., (2000), *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 16, 15-18.
40. Chojnacka K., Noworyta A., (2004), *Enzyme Microb. Technol.*, 34, 461-465.
41. Rangel-Yagui C. de O., Danesi E. D., de Carvalho J. C., Sato S., (2004), *Bioresour. Technol.*, 92(2), 133-141.
42. Soletto D., Binaghi L., Lodi A., Carvalho J. C. M., Converti A., (2005), *Aquaculture*, 243, 217-224.
43. Danesi E. D. G., Rangel-Yagui C. de O., de Carvalho J. C. M., Sato S., (2002), *Biomass and Bioenergy*, 23, 261-269.
44. Phang S. M., Miah M. S., Yeoh B. G., Hashim M. A., (2000), *J. Appl. Phycol.*, 12, 395-400.
45. Olguín E. J., Galicia S., Mercado G., Pérez T., (2003), *J. Appl. Phycol.*, 15, 249-257.
46. Torzillo G., (1997), *Spirulina Platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology*, Ed. Vonshak A., 101-115, Taylor & Francis, Wielka Brytania.
47. Tredici M. R., Chini Zittelli G., (1997), *Spirulina Platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology*, Ed. Vonshak A., 117-130, Taylor & Francis, Wielka Brytania.
48. Kim S.-G., Choi A., Ahn C.-Y., Park C.-S., Park Y.-H., Oh H.-M., (2005), *Let. Appl. Microbiol.*, 40, 190-194.
49. <http://www.spirulinasource.com/earthfoodch6a.html>.
50. Desmorieux H., Decaen N., (2005), *Journal of Food Engineering*, 66, 497-503.
51. <http://www.cyanotech.com/html/spir/prod/6.html>.