



Biotechnologiczny potencjał cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira*

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

Biotechnological potential of cyanobacteria of the genus *Arthrospira*

Summary

Nutritional properties of *Arthrospira* have been known for hundred years. It was consumed by the Aztecs and it is still an important food source for the Kanembu tribe in Chad. The biomass of *Arthrospira* is the source of eight essential and twelve non-essential amino acids, as well as lipids, carbohydrates, minerals, vitamins and carotenoids. It has immunomodulative, antioxidant, antiviral and anticancerogenic properties. *Arthrospira* is also used for heavy metal and inorganic nutrients removal from wastewater. *Arthrospira* PCC 8005 strain was chosen to be a part of MELISSA system (Micro Ecological Life Support System Alternative), where it will be used to produce oxygen and as food for astronauts.

Key words:

cyanobacteria, *Arthrospira*, nutritional value, antioxidant, antiviral and anticancerogenic activities, wastewater treatment, MELISSA.

1. Historia konsumpcji cyjanobakterii *Arthrospira*

Nie wiadomo, od jak dawna człowiek wykorzystuje gatunki *Arthrospira* jako suplement diety (1). Właściwości odżywcze *Arthrospira* zostały odkryte niezależnie na dwóch kontynentach – Ameryce Południowej i Afryce.

Wzmianki o stosowaniu *Arthrospira maxima* przez Azteków pojawiły się w XVI w., czyli w czasie podboju Ameryki przez krąże europejskie. Aztekowie wylawiali rosnące w jeziorze Texcoco cyjanobakterie i suszyli je na słońcu. Pożywienie to określane było mianem Tecuitlatl (1,2).

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) 119–142 2008

W Afryce biomasa *Arthrospira* spożywana jest do dziś przez zamieszkujące rejonny jeziora Czad plemię Kanembu. Z wysuszonych mat utworzonych przez *Arthrospira platensis* otrzymuje się placki nazywane przez miejscową ludność Dihé. Próbkę tego pożywienia opisał po raz pierwszy w 1940 r. francuski fykolog Dangeard. Niecałe 25 lat później Leonard, botanik uczestniczący w belgijskiej wyprawie na Saharę, wraz z zespołem wykonali pierwszą chemiczną analizę biomasy *A. platensis*, z której wytwarzano Dihé (2).

Lata 70. ubiegłego wieku przyniosły intensywny rozwój badań nad gatunkami rodzaju *Arthrospira*, ich właściwościami odżywczymi i zastosowaniami w medycynie. Skupiano się przede wszystkim na wykorzystaniu tych cyjanobakterii w uzupełnianiu diety niedożywionych populacji w krajach azjatyckich takich jak Indie czy Tajlandia. Rozpoczęto również masową hodowlę tych cyjanobakterii w celu otrzymywania aminokwasów i oczyszczania wody (1). W 1979 r. pierwszy preparat z *Arthrospira* został wprowadzony na rynek przez amerykańską firmę *Earthrise Farms* (3).

Obecnie preparaty z *Arthrospira* (m. in. *A. maxima* i *A. platensis*) są sprzedawane pod nazwą „Spirulina” na całym świecie, a najbardziej znane firmy je produkujące to m. in. *Earthrise Farms* (USA), *Cyanotech* (USA), *Hainan DIC Microalgae Co., Ltd* (Chiny), *Marugappa Chettir Research Center* (Indie), *Genix* (Kuba) and *Solarium Biotechnology* (Chile) (1). Można je kupić także w Polsce w postaci tabletek, sproszkowanej masy i chipsów nie tylko w aptekach czy sklepach zielarskich, ale również w działach ze zdrową żywnością w supermarketach.

2. Właściwości odżywcze i perspektywy zastosowania cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira* jako źródła pożywienia

Niewiele jest publikacji naukowych, w których szczegółowo opisuje się gatunki *Arthrospira* pod kątem ich zastosowania we wzbogacaniu codziennej diety. Informacje tego typu można natomiast znaleźć na stronach internetowych licznych firm wytwarzających preparaty z *Arthrospira*. Mają one jednak charakter popularnonaukowy. W pierwszej analizie chemicznej biomasy *A. platensis* opublikowanej przez Leonarda i wsp. w 1967 r. wykazano 45% zawartość białka w suchej masie. W *Institute Française du Pétrole* wykonano niezależne badania na hodowanym w laboratorium szczepie tego gatunku. Wykazano, że wartość ta jest wyższa i wynosi 62-68% białka w suchej masie. We współcześnie wykonanych analizach potwierdza się, że białko stanowi od 55 do 70% suchej masy. Zawartość ta zależy od warunków hodowli: *A. platensis* i *A. maxima* hodowane w laboratorium zawierały więcej białka niż te pochodzące z otwartych zbiorników, które z kolei charakteryzowały się wyższą zawartością węglowodanów (2).

Biomasa *Arthrospira* wykorzystywana do produkcji preparatów odżywczych zawiera wszystkie osiem aminokwasów egzogennych (47% masy wszystkich białek)

i dwanaście endogennych. Aminokwasami ograniczającymi¹ w przypadku *Arthrospira* są cystyna i metionina, jednak ich zawartość jest wyższa w porównaniu do zbóż czy warzyw. Współczynnik wykorzystania białka netto (NPU, ang. *net protein utilization*), określający stosunek ilości białek spożytych do ilości zatrzymanych w organizmie dla preparatów *Arthrospira* wynosi 53-61%. Natomiast wskaźnik wydajności wzrostowej białka (PER, ang. *protein efficiency ratio*), określający przyrost masy ciała na 1g spożytego białka, waha się od 1,8 do 2,6. Ściany komórkowe cyjanobakterii z tego rodzaju nie zawierają celulozy, dzięki czemu łatwo ulegają trawieniu (strawność białek suszonej biomasy *Arthrospira* wykorzystywanej do produkcji preparatów wynosi 83-90%) (3,4).

Dane dotyczące zawartości lipidów cechują duże odchylenia (od 1,5 do 12% suchej masy *Arthrospira*). Wynika to zapewne z różnic w efektywności stosowanych metod ekstrakcji i szacowania zawartości tych związków (2). Lipidy dzielą się na dwie frakcje – zmydlające się (83%) oraz nie zmydlające się (17%). Do pierwszej frakcji należą głównie wolne kwasy tłuszczowe, a także mono- i digalaktozydylglicerydy oraz fosfatydyloglicerol. Do lipidów nie ulegających zmydleniu należą sterole, alkohole terpenowe, parafiny oraz barwniki. Jednym z ważniejszych składników jest kwas γ -linolenowy, będący prekursorem prostaglandyn, leukotrienów i tromboksanów. W organizmie człowieka jest on syntetyzowany z kwasu linolowego, ale może być także efektywnie pobierany z pożywienia, co jest szczególnie ważne w przypadku zaburzeń jego syntezy. Kwas γ -linolenowy stanowi 10-20% wszystkich kwasów tłuszczowych *A. maxima* i 40% *A. platensis*, co czyni te organizmy jednym z lepszych znanych źródeł tej substancji. Zawartość kwasu palmitynowego, który w nadmiarze przyczynia się do powstawania miażdżycy i innych niekorzystnych zmian w organizmie człowieka, w przypadku *A. maxima* wynosi 63% wszystkich kwasów tłuszczowych, a w przypadku *A. platensis* – 25%. Komórki *Arthrospira* nie zawierają kwasów tłuszczowych o nieparzystej liczbie atomów węgla, a poziom rozgałęzionych kwasów tłuszczowych jest niski. Jest to korzystne, gdyż oba wymienione typy kwasów nie są metabolizowane przez zwierzęta wyższe. Preparaty z *Arthrospira* zalecane są jako uzupełnienie diety w przypadku niedoboru kwasów tłuszczowych (4).

Biomasa *Arthrospira* zawiera kilka różnych węglowodanów, ale przez człowieka przyswajanie są głównie glukozamina, ramnoza i glikogen. Dwa ostatnie polisacharydy są transportowane do wnętrza komórek przy niewielkim udziale insuliny, dzięki czemu nie pojawia się stan hipoglikemii (3). Ważnym węglowodanem, gromadzonym w komórkach *Arthrospira*, jest fosforan mezoinozytolu, który jest dobrym źródłem fosforu organicznego i inozytolu. Zawartość jego wynosi 350-850 mg/kg suchej masy preparatów z *Arthrospira*, czyli jest ośmiokrotnie wyższa niż w wołowinie. Niektóre polisacharydy *Arthrospira* są odpowiedzialne za stymulację i regulację działania układu immunologicznego oraz za wspomaganie mechanizmów naprawy DNA (4).

¹ Aminokwas ograniczający – aminokwas egzogenny, który w danym białku występuje w najmniejszej ilości w porównaniu do wzorca (białko jaja kurzego) (74).

Wśród karotenoidów obecnych w biomacie *Arthrospira* są β -karoten (80% wszystkich karotenoidów) – zawartość 700-1700 mg/kg suchej masy i kryptoksantina – 100 mg/kg. Substancje te są prekursorami witaminy A u ssaków. Brak retinolu (wolnej formy witaminy A) eliminuje możliwość powstania hiperwitaminozy. Preparaty z *Arthrospira*, jak się okazało, były skuteczne w uzupełnianiu niedoboru witaminy A, co jest szczególnie ważne w przypadku kobiet w ciąży zarażonych wirusem HIV (wykazano, że awitaminoza zwiększa prawdopodobieństwo zainfekowania płodu). Ponadto β -karoten ma zdolność neutralizacji wolnych rodników, przez co zmniejsza ryzyko wystąpienia nowotworów (4).

Zawartość witaminy B12 (1,5-2,0 mg/kg) w biomacie *Arthrospira* jest czterokrotnie większa niż w surowej wątrobie wołowej. W 10 g biomasy znajduje się 20 μ g tej witaminy, co stanowi 330% zalecanej dziennej dawki (5). W badaniach przeprowadzonych przez Watanabe i wsp. wykazano, że preparaty z *Arthrospira* zawierają jedynie 17% aktywnie wiążącej się do czynnika wewnętrznego Castle'a formy witaminy B12. Pozostała część to tzw. pseudowitamina B12 nie wykazująca właściwości aktywnej witaminy (6). W późniejszych eksperymentach wykazano, że hodowanie *A. platensis* bez dodatku CoSO_4 do pożywki znacząco obniża zawartość nieaktywnej formy B12 (7). Wykazano także, że niektóre analogi witaminy B12 mogą blokować metabolizm właściwej formy tej witaminy (8). Suplementacja diety witaminą B12 jest szczególnie ważna w przypadku wegan i wegetarian, jednak ze względu na wyniki tych badań stosowanie preparatów z *Arthrospira* w tym celu nie jest polecane (9).

Arthrospira jest bardzo dobrym źródłem makro- i mikroelementów takich jak żelazo, wapń, fosfor, potas, miedź, chrom, cynk i selen. Żelazo pochodzące z preparatów z *Arthrospira* (580-1800 mg/kg) jest dwukrotnie lepiej przyswajalne niż żelazo pochodzące z warzyw i większości mięs. Ponadto biomasa *Arthrospira* jest dużo lepszym źródłem żelaza niż powszechnie stosowane suplementy diety zawierające ten pierwiastek np. siarczan żelaza (przyswajalność większa o 60%). To zjawisko tłumaczy się obecnością w komórkach *Arthrospira* fikocyjaniny, której porfirynowa struktura warunkuje tworzenie kompleksów z Fe. Takie połączenie sprzyja wysokiej przyswajalności żelaza. W innej teorii mówi się, że pomiędzy żelazem a powierzchnią białek tworzą się wiązania jonowe, przez co ułatwione jest uwalnianie żelaza podczas trawienia. Prawdopodobnie obie pule tego pierwiastka występują jednocześnie (10). Zawartość wapnia, fosforu i magnezu w preparatach z *Arthrospira* jest zbliżona do ilości znajdujących się w mleku (4).

Arthrospira jest również źródłem barwników: chlorofilu i wspomnianych karotenoidów oraz fikocyjaniny. Chlorofil pobudza perystaltykę jelit, reguluje wydzielanie kwasów żółciowych, łagodzi stany zapalne oraz wspomaga przenoszenie impulsów nerwowych w sercu. Fikocyjanina stymuluje układ immunologiczny, działa ochronnie na wątrobę oraz ma właściwości przeciwzapalne. Zarówno fikocyjanina, jak i karotenoidy są antyoksydantami (5,11).

Istotną cechą biomasy uzyskanej z cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira* jest niska zawartość kwasów nukleinowych. Zawartość RNA w komórkach *A. maxima* i *A. platensis*

waha się od 2,2 do 3,5%, natomiast zawartość DNA – od 0,6 do 1% suchej masy, co w sumie daje całkowitą ilość kwasów nukleinowych mniejszą niż 5% suchej masy, która w porównaniu z wartościami odnotowanymi dla bakterii czy jednokomórkowych drożdży (przeciętnie 4-10%, a w hodowlach na skalę przemysłową: 9-22%) jest znacznie niższa (2). Produktem metabolizmu puryn jest kwas moczowy, którego wysokie stężenie przyczynia się do powstawania kamieni nerkowych i nasila objawy dny moczanowej. Maksymalna dopuszczalna dzienna dawka kwasów nukleinowych dla dorosłego człowieka wynosi 4 g. Ilość ta znajduje się w około 80 g suchej biomasy *Arthrospira*, co znacznie przewyższa rekomendowane dzienne spożycie tej cyjanobakterii (2,4).

Dzisiejsze rolnictwo nie jest w stanie zapewnić całej populacji ludzkiej wystarczającego zasobu pełnowartościowej żywności. Hodowanie mikroorganizmów w celu dostarczania pokarmu jest, jak się wydaje, atrakcyjnym rozwiązaniem, gdyż nie koliduje z tradycyjnymi uprawami lądowymi, w mniejszym stopniu zależy od warunków pogodowych, a ponadto, w przeliczeniu na jednostkę powierzchni i czasu, daje wysokie plony. Niestety pierwsze próby pozyskiwania białek z organizmów jednokomórkowych (SCP, ang. *single cell protein*) takich jak bakterie czy drożdże (lata 60. i 70. ubiegłego wieku) spotkały się z niechęcią społeczeństwa. Ludzie obawiali się negatywnych skutków zdrowotnych bezpośredniego spożywania tego rodzaju pokarmu, a nawet mięsa zwierząt karmionych SCP. Dodatkową przeszkodą były rosnące ceny ropy naftowej, gdyż większość mikroorganizmów hodowano na pożywkach zawierających węglowodory. Obecnie produkcja SCP jest wysoka, a uzyskaną biomasę wykorzystuje się do produkcji paszy dla zwierząt (2).

Deficyt białek, szczególnie we wczesnych etapach życia, powoduje nieodwracalne zmiany w rozwoju fizycznym i psychicznym. Zapewnienie organizmowi odpowiedniej ilości kalorii rzadko łączy się z zaspokojeniem zapotrzebowania na białko. Dlatego tak ważne jest masowe wytwarzanie produktów, które uzupełniałyby dietę, dostarczając odpowiednie ilości białka i substancji odżywczych. Wykorzystanie w tym celu preparatów z *Arthrospira* jest obiecującym rozwiązaniem ze względu na następujące czynniki (2):

- wysoką zawartość aminokwasów,
- białka *Arthrospira* nie wywołują alergii; mogą zatem uzupełniać dietę osób uczulonych na białka zawarte w jajkach czy mleku,
- zawartość witamin, kwasów tłuszczowych (przede wszystkim γ -linolenowego) oraz makro- i mikroelementów,
- niską zawartość kwasów nukleinowych,
- brak celulozy w ścianie komórkowej, co ułatwia trawienie,
- naturalnie występowanie tych cyjanobakterii w subtropikalnych i tropikalnych rejonach, czyli tam, gdzie problem niedożywienia jest powszechny,
- wysoką produktywność hodowli,
- możliwość prowadzenia hodowli na nieurodzajnych terenach, przy wykorzystaniu nadwyżki CO₂ pochodzącego ze spalania paliw lub ciepłej wody z zakładów chłodniczych,

– alkaliczne pH, optymalne dla wzrostu *Arthrospira*, ogranicza wzrost większości innych mikroorganizmów, w tym patogenów ludzi i zwierząt,

– spiralny kształt trychomów i obecność wakuol gazowych sprzyja powstawaniu unoszących się na wodzie mat, co ułatwia ich zbieranie; dzięki temu koszty hodowli są niższe.

Ze względu na kurczenie się terenów nadających się pod uprawę, rosnącą populację ludzką, a co za tym idzie, postępujące niedożywienie w wielu krajach, poszukiwanie alternatywnych źródeł substancji odżywczych coraz bardziej zyskuje na znaczeniu. W dotychczasowych badaniach wykazano, że cyjanobakterie z rodzaju *Arthrospira* mogą w przyszłości stanowić jeden z najważniejszych elementów diety ludzkiej (2).

Skład chemiczny *Arthrospira* sp. przedstawiony jest w tabelach (tab. 1-4).

Tabela 1

Skład chemiczny i pierwiastkowy biomasy *Arthrospira* (4,12)

Substancja	Zawartość (% suchej masy)	Minerały (mg/kg)	
białka	50-71	Ca	1300-1400
węglowodany	15-25	P	6700-9000
lipidy	1,5-12	Mg	2000-2900
związki mineralne	7-13	Fe	580-1800
włókna	8-10	Zn	21-40
H ₂ O	3-7	Cu	8-10
		Mn	25-37
		Na	4500
		K	6400-15 400
		Cr	2,8

Tabela 2

Zawartość aminokwasów w biomacie *Arthrospira* (12)

Aminokwasy (g/kg)					
Aminokwasy egzogenne	Zawartość (g/kg)	(%) całkow. ilości	Aminokwasy endogenne	Zawartość (g/kg)	(%) całkow. ilości
1	2	3	4	5	6
izoleucyna	35	5,6	alanina	47	7,6
leucyna	54	8,7	arginina	43	6,9
lizyna	29	4,7	kwas asparaginowy	61	9,8
metionina	14	2,3	cystyna	6	1

1	2	3	4	5	6
fenyloalanina	28	4,5	kwas glutaminowy	91	14,6
treonina	32	5,2	glicyna	32	5,2
tryptofan	9	1,5	histydyna	10	1,6
walina	40	6,5	prolina	27	4,3
			seryna	32	5,2
			tyrozyna	30	4,8

Tabela 3

Skład węglowodanowy i lipidowy biomasy *Arthrospira* (13)

Węglowodany (% suchej masy)	Lipidy (g/kg lub mg/kg)				
ramnoza	9	kwasy tłuszczowe	57	sterole	325
glukan	1,5	palmitynowy	21	cholesterol	196
ufosforylowane cykitole	2,5	palmitooleinowy	2	fitosterol	97
glukozamina i kwas muraminowy	2	stearynowy	0,3	dihydro-7-cholesterol	31
glikogen	0,5	oleinowy	3	cholesten-7-ol-3	33
kwas sjałowy i inne	0,5	linolenowy	13	stigmasterol	32
		γ -linolenowy	12	inne	32
		α -linolenowy	0,5	alkohole terpenowe	800
		inne	5,2	inne	170

Tabela 4

Zawartość barwników i witamin w biomacie *Arthrospira* (5,13)

Barwniki (g/kg)	Witaminy (mg/kg)		
fikocyjaniny	140	biotyna (H)	0,4
chlorofil	10	cyjanokobalamina B ₁₂)	2
karotenoidy	3,7	d-Ca pantotnian	11
karoteny	2	kwas foliowy	0,5
β -karoten	0,7-1,7	inozytol	350
inne	0,3-1,3	kwas nikotynowy (PP)	118
ksantofile	1,7	pirydoksyna (B ₆)	3
miksoksanofile	0,7	ryboflawina (B ₂)	40
kryptoksanofity	0,1	tiamina (B ₁)	55
echinenony	0,1	tokoferol (E)	190
zeaksantyny	0,6		
luteina i euglenanon	0,2		

3. Zastosowanie cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira* w medycynie

3.1. Immunomodulacja

Molekularny mechanizm oddziaływania ekstraktów z *Arthrospira* na układ immunologiczny nie jest poznany. Pierwsze doświadczenia z wykorzystaniem różnych zwierząt laboratoryjnych przeprowadzane były w latach 90. ubiegłego wieku.

Podawanie preparatów z *Arthrospira* myszom spowodowało wzrost ilości komórek śledziony produkujących przeciwciała w czasie pierwotnej odpowiedzi immunologicznej na erytrocyty barana (SRBC, ang. *sheep red blood cells*), zwiększenie procentu komórek fagocytarnych wśród populacji makrofagów otrzewnowych oraz zwiększenie poziomu immunoglobin IgE i IgA po immunizacji z użyciem ekstraktu z surowych krewetek. W badaniach przeprowadzanych *in vitro* z użyciem ekstraktu z *Arthrospira* wykazano, że dodany do kultury komórek śledziony zwiększa ich proliferację, a u makrofagów wywołuje wzrost produkcji interleukiny-1 (IL-1) (14).

W eksperymentach przeprowadzonych na jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC, ang. *peripheral blood mononuclear cells*) wykazano, że ekstrakt z *Arthrospira* stymuluje wytwarzanie interleukiny 1 β (IL-1 β), interleukiny 4 (IL-4) i interferonu γ (IFN- γ). Ponieważ produkcja IL-4 wzrasta 3,3-krotnie, a IFN- γ aż 13,6-krotnie, przypuszcza się, że *Arthrospira* wzmacnia odpowiedź typu Th-1, czyli komórkową. Preparaty z tej cyjanobakterii mogą zatem zapewnić lepszą ochronę organizmu przeciwko wewnątrzkomórkowym patogenom i pasożytom.

Podobne efekty stymulacji układu immunologicznego uzyskano w badaniach prowadzonych na grupie 40-letnich mężczyzn. Po dwóch tygodniach codziennego spożywania 50 ml dostępnego na rynku napoju firmy Dainippon Ink & Chemicals Inc., zawierającego 40% ekstrakt z *Arthrospira*, zaobserwowano wzrost wydzielania IFN- γ i wzmożoną aktywność komórek NK. Efekt ten utrzymywał się przez sześć miesięcy po zakończeniu podawania napoju (14).

Zaobserwowano również wzrost poziomu IgA (s-IgA, ang. *secretory IgA*) w ślinie 127 ochotników, którym podawano ekstrakt z *Arthrospira* przez rok. Sugeruje to, że spożywanie preparatów z tej cyjanobakterii wzmacnia odporność śluzówkową (13).

Preparaty z *Arthrospira* wykazują również działanie przeciwalergiczne. Yang i wsp. przeprowadzili eksperymenty na szczurach, którym podano sproszkowaną biomasę *Arthrospira* w ilości 0,5 i 1,0 mg/g masy ciała. Zaobserwowano zahamowanie szoku anafilaktycznego indukowanego przez komponentę 48/80 oraz redukcję poziomu histaminy w surowicy (15).

3.2. Właściwości antyoksydacyjne i przeciwzapalne

Wykazano, że ekstrakty z *A. platensis* mają zdolność neutralizacji wolnych rodników ponadtlenkowych, peroksydowych, hydroksylowych i nadnitylowych oraz hamowania peroksydacji lipidów. Za właściwości tych cyjanobakterii odpowiedzialna jest głównie fikocyjanina, a w mniejszym stopniu związki fenolowe (głównie kwas chlorogenowy i kofeinowy), α -tokoferol i β -karoten (16-18). W eksperymentach Bhat i Madyastha wykazano, że w blokowaniu działania wolnych rodników istotną rolę spełnia chromofor fikocyjaniny – fikocyjanobilina (19).

Wykazano, że suszenie rozpyłowe biomasy *Arthrospira* nie obniża aktywności fikocyjaniny. Obliczono, że skuteczność fikocyjaniny jako antyoksydanta jest tylko trzy razy niższa niż dysmutazy ponadtlenkowej (14). Ekstrakt metanolowy (0,5 mg) z *A. maxima* hamował w 95% peroksydację homogenatu szczurzej tkanki mózgowej (16).

W eksperymentach przeprowadzonych na szczurzym hipokampie wykazano, że podawana ustnie fikocyjanina zapobiega drgawkom wywołanym przez kwas kainowy. Zaproponowany mechanizm działania tego kwasu zakłada indukowanie powstawania reaktywnych form tlenu. Działanie ochronne w stosunku do neuronów może zatem wynikać z właściwości antyoksydacyjnych fikocyjaniny. Na podstawie tych badań sugeruje się, że związek ten przekracza barierę krew-mózg, co otwiera perspektywę zastosowania fikocyjaniny w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych takich jak choroba Parkinsona czy choroba Alzheimera, do powstania których przyczyniają się m.in. wolne rodniki (20).

Fikocyjanina wykazuje również właściwości przeciwzapalne – zaobserwowano zmniejszenie obrzęku ucha u myszy, który jest indukowany przez kwas arachidonowy i tkankowy aktywator plazminogenu. W tym przypadku przeciwzapalne działanie fikocyjaniny nie wynika jedynie ze zdolności eliminacji przez ten związek wolnych rodników, ale zapewne także z hamowania metabolizmu kwasu arachidonowego (13). Odkryto również, że fikocyjanina jest selektywnym inhibitorem odpowiedzialnej za powstanie stanu zapalenia cyklooksygenazy typu 2 (COX-2). IC50 (stężenie powodujące 50% inhibicji) dla fikocyjaniny jest dużo mniejsze niż IC50 dla popularnych inhibitorów COX2 takich jak Rofecoxib czy Celecoxib. Ustalono, że za hamowanie aktywności cyklooksygenazy odpowiada komponent apoproteinowy fikocyjaniny (21).

3.3. Działanie przeciwwirusowe

Właściwości antywirusowe są przypisywane wyizolowanemu z *A. platensis* siarczanowanemu polisacharydowi zwanemu spirulanem wapnia (Ca-SP). Składa się on z ramnozy, 3-O-metyloramnozy, 2,3-di-O-metyloramnozy, 3-O-metyloksylozy, kwasów uronowych, np. kwasu glukuronowego, grupy siarczanowej i wapnia oraz za-

wiera dwa typy powtarzających się jednostek dwucukrów: O-ramnozylo-akofriozy i O-heksauronozylo-ramnozy (kwas aldobiuronowy) (22,23).

Wykazano, że związek ten ma zdolność hamowania replikacji wirusów otoczkowych m.in. herpeswirusa typu 1 (HSV-1), wirusa cytomegalii (HCMV), wirusa odry (MEV), wirusa świnki (MuV), wirusa grypy A (FLUAV) i HIV-1, natomiast wobec wirusów bezotoczkowych (wirus polio, wirus Cocksackie) jest nieaktywny. Wykazano, że Ca-SP selektywnie blokuje penetrację wirusa do wnętrza komórki, a obecność struktury – chelatowanego przez grupy siarczanowe jonu wapnia jest niezbędna, by związek ten wykazywał aktywność przeciwwirusową (24).

W badaniach przeprowadzonych przez Hernández-Corona i wsp. wykazano, że przygotowany na gorąco wyciąg wodny z *A. maxima* hamuje infekcje wywołane przez wirusy: HSV-1, HSV-2, HCMV i wirusa choroby Aujeszky'ego (PRV). ED₅₀ (dawka powodująca zablokowanie infekcji w 50% przypadków) dla badanych wirusów wynosiła – HSV-1: 0,333 mg/ml, HSV-2: 0,069 mg/ml, HCMV: 0,142 mg/ml, PRV: 0,103 mg/ml. Infekcja wirusem opryszczki hamowana była poprzez blokowanie adsorpcji i penetracji wirusa do komórek linii Vero, bez bezpośredniego efektu wirusobójczego (25). Ten sam efekt uzyskali Hayashi i wsp. w przypadku *A. platensis*, z tym, że mechanizmy zaobserwowane w obu eksperymentach różnią się od siebie – *A. platenis* hamowała penetrację wirusa, lecz nie oddziaływała na jego adsorpcję do komórek HeLa. Ponadto ekstrakt z *A. maxima* nie wykazywał aktywności wobec innych wirusów otoczkowych, takich jak wirus świnki czy wirus pryszczycy (VSV) (26). Wykazano, że za właściwości antywirusowe *Arthrospira* odpowiedzialne są cząsteczki wysokopolarne. Planowane są dalsze eksperymenty w celu identyfikacji tych związków (25).

Rechter i wsp. przeprowadzili analizy frakcji polisacharydowych izolowanych z *A. platensis*. Frakcje zawierające wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe substancje o budowie zbliżonej do Ca-SP wykazywały właściwości antywirusowe przeciwko takim wirusom jak: HCMV, HSV-1, HSV-6, HIV-1. W przypadku wirusa Epsteina-Barr (EBV) i wirusa grypy A (A/WSN/33) aktywność ta była słaba lub nie występowała wcale (27).

W Afryce zakażeni wirusem HIV i chorzy na AIDS mogą stanowić nawet 40% populacji danego kraju. Wyjątkiem jest Czad, gdzie HIV/AIDS dotyczy 2,6-3,6% populacji. Zjawisko to tłumaczone jest spożywaniem przez ludność zamieszkującą te tereny biomasy *Arthrospira*. W licznie przeprowadzonych eksperymentach potwierdzono, że ekstrakty z tej cyjanobakterii mogą hamować namnażanie się wirusa HIV (28).

Wykazano, że wodny ekstrakt z *A. platensis* hamuje replikację wirusa HIV-1 w limfocytach T, komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) i komórkach Langerhansa (LC). Wirus był inaktywowany podczas inkubacji z ekstraktem przed dodaniem go do hodowli limfocytów T. Właściwość tę wykazywały frakcje zarówno zawierające polisacharydy, jak i ich pozbawione (29). Hayashi i wsp. odkryli, że Ca-SP ma zdolność hamowania replikacji wirusa HIV. W przeciwieństwie do innych sulfonowanych polisacharydów związek ten nie wzmacnia indukowanego przez wiru-

sa tworzenia przez limfocyty T zespólni (syncytium) oraz wykazuje niską aktywność przeciwwzkrzepową (30).

Wyniki eksperymentów przeprowadzonych *in vitro* są obiecujące. Ekstrakty z *Arthrospira* zawierające m.in. Ca-SP mogą być stosowane jako uzupełnienie leczenia wielu infekcji wirusowych. Stwierdzenie rzeczywistej przydatności preparatów z *Arthrospira* wymaga jednak przeprowadzania szeregu badań przedklinicznych i klinicznych (14).

3.4. Hamowanie kancerogenezy

Na przeciwnowotworowe działanie *Arthrospira* składają się właściwości antyoksydacyjne, stymulacja układu immunologicznego oraz stymulacja i regulacja procesów naprawy DNA przez polisacharydy (14). W badaniach Mishima i wsp. wykazano, że Ca-SP z *Arthrospira platensis* ogranicza metastazę komórek mysiego czerniaka B16-BL6 w płucach. Związek ten hamuje przenikanie komórek nowotworowych przez błonę podstawną nabłonka oddechowego poprzez zapobieganie ich adhezji do lamininy i hamowanie aktywności heparanazy (31). Enzym ten powoduje degradację proteoglikanów heparanosiarczanowych budujących błonę podstawną i macierz międzykomórkową (32).

Badania przeprowadzone w Indiach przez Mathew i wsp. polegały na podawaniu 44 ochotnikom spośród osób żujących tytoń 1g preparatu z *Arthrospira fusiformis* przez rok. W 45% przypadków leukoplakia (uznawana za stan przedrakowy) występująca w jamie ustnej uległa regresji. W przypadku grupy, której podawano placebo wielkość ta wynosiła 7%. Ponieważ poziom β -karotenu w surowicy nie podniósł się, najprawdopodobniej inne substancje są odpowiedzialne za chemoprewencyjne właściwości *Arthrospira* (33).

Leczenie nowotworu worków policzkowych u chomików ekstraktem z *Arthrospira*, β -karotenem oraz kantaksantyną wykazało najwyższą skuteczność w przypadku zastosowania ekstraktu z *Arthrospira* (u 30% zwierząt nastąpiła całkowita regresja guza, a u pozostałych 70% regresja była częściowa). Czysty β -karoten spowodował cofnięcie się zmian nowotworowych u 20% chomików, co sugeruje możliwość synergistycznego działania składników *Arthrospira* w tym procesie. W innych badaniach wykazano cytostatyczną i cytotoksyczną aktywność fikocyjaniny wobec raka płasko-komórkowego u chomików i ludzi (14).

W badaniach przeprowadzonych w roku 2000 fikocyjanina C uzyskana z *A. platensis* hamowała wzrost ludzkich komórek białaczkowych K562. Sześciodniowa hodowla tych komórek w obecności różnych stężeń c-fikocyjaniny spowodowała zatrzymanie dużej części komórek w fazie G1 – procent ten był szczególnie wysoki w przypadku zastosowania stężeń 40 i 80 mg/l. Nie obserwowano komórek apoptotycznych, co sugeruje inny mechanizm hamowania wzrostu, który może polegać na zmianie ekspresji genów kodujących białko c-myc (14,34).

Z przykładów tych wynika, że preparaty z *Arthrospira* mogą być stosowane w chemoprewencji oraz jako uzupełnienie terapii przeciwnowotworowej.

3.5. Działanie przeciwbakteryjne

W eksperymentach przeprowadzonych przez Lamia i wsp. wykazano, że wydzielane na zewnątrz komórki metabolity wtórne *A. platensis* mają działanie przeciwbakteryjne wobec *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus* oraz *Pseudomonas aeruginosa*. Aktywne metabolity są najprawdopodobniej kompleksami białkowymi (35).

Ozdemir i wsp. badali antybakteryjne właściwości różnych ekstraktów *A. platensis*. Do badań wykorzystano cztery gatunki bakterii Gram-dodatnich, sześć gatunków bakterii Gram-ujemnych. Najwyższą aktywność antybakteryjną wykazywał ekstrakt metanolowy (36).

3.6. Zapobieganie hiperlipidemii i stłuszczeniu wątroby

W licznych badaniach z udziałem zarówno zwierząt, jak i ludzi wykazano, że uzupełnienie diety preparatami z *Arthrospira* obniża zawartość we krwi przyczyniających się do powstawania miażdżycy lipoprotein o niskiej gęstości – LDL („zły cholesterol”) oraz triglicerydów.

Podawanie szczurom biomasy *Arthrospira* w ilości 5, 10 i 15% diety spowodowało znaczący spadek poziomu triglicerydów we krwi. Zaobserwowano wzrost aktywności lipazy lipoproteinowej, co sugeruje, że preparaty z *Arthrospira* mogą wpływać bezpośrednio na metabolizm triglicerydów. W innych badaniach prowadzonych na szczurach wykazano m. in. zwiększenie poziomu lipoprotein o wysokiej gęstości – HDL („dobry cholesterol”) oraz polepszenie stosunku HDL/LDL (14).

W jednym z eksperymentów z udziałem ludzi przebadano 30 mężczyzn z łagodną hiperlipidemią i łagodnym nadciśnieniem: grupa A otrzymywała 4,2 g biomasy *Arthrospira* dziennie przez osiem tygodni, a osoby z grupy B – tę samą ilość preparatu przez cztery tygodnie. W grupie A i B zaobserwowano znaczące obniżenie się poziomu LDL, z tym, że w grupie B po odstawieniu preparatu poziom ten wracał do wyjściowej wartości. Inne badania dotyczyły 30 osób cierpiących na chorobę niedokrwienną serca, u których poziom całkowitego cholesterolu wynosił powyżej 250 g/dl. Utworzono trzy grupy – przez trzy miesiące osobom z pierwszej grupy podawano 2 g preparatu z *Arthrospira* dziennie, drugiej – 4 g dziennie; grupa trzecia była grupą kontrolną. U osób spożywających *Arthrospira* obniżył się poziom LDL i triglicerydów, natomiast poziom HDL wzrósł, a efekt ten był silniejszy w przypadku osób, którym podawano 4 g preparatu (14).

W eksperymentach Blé-Castillo i wsp. wykazano, że podawanie myszom biomasy *A. maxima* dwa tygodnie przed wywołaniem u nich stłuszczenia wątroby wywołało 40% spadek całkowitej ilości lipidów i 50% spadek ilości triglicerydów w wątrobie w porównaniu do zwierząt, które nie otrzymywały preparatu z tej cyjanobakterii. Obniżeniu o połowę uległ również poziom triglicerydów we krwi, a zawartość HDL wzrosła o 45% (37).

Uzupełnienie diety preparatami z *Arthrospira* może korzystnie wpłynąć na regulację poziomu cholesterolu oraz wspomóc leczenie hiperlipidemii i stłuszczenia wątroby.

3.7. Inne właściwości

Oprócz wymienionych właściwości, preparaty z *Arthrospira* chronią nerki przed uszkodzeniami powodowanymi przez rtęć i różnego rodzaju leki (38), promują wzrost bakterii mlekowych *in vitro* (39), chronią przed efektami promieniowania jonizującego, przyczyniają się do spadku masy ciała u osób otyłych, redukują nadciśnienie tętnicze oraz obniżają poziom glukozy we krwi (14). W badaniach dotyczących Ca-SP wykazano, że związek ten oprócz właściwości przeciwwirusowych i przeciwnowotworowych ma zdolność indukowania syntezy tkankowego aktywatora plazminogenu na poziomie translacji (40) oraz wzmacnia stopień inhibicji trombiny przez heparynowy kofaktor II (41). Niekorzystną właściwością Ca-SP jest spowalnianie procesu naprawy uszkodzonego śródbłonna (endotelium) naczyń krwionośnych poprzez hamowanie proliferacji komórek tego nabłonka. Związek ten upośledza odpowiedź komórek endotelium na czynnik wzrostu fibroblastów 2 (FGF-2) (42).

3.8. Czy cyjanobakterie z rodzaju *Arthrospira* mają zdolność wytwarzania toksyn?

W 2002 r. pojawiło się pierwsze doniesienie o hepatotoksyczności preparatów z *Arthrospira*. W Japonii 52-letni człowiek trafił do szpitala z uszkodzeniem wątroby, które najprawdopodobniej spowodowane było spożywaniem *Arthrospira* (43). Analiza HPLC-ELISA wykazała obecność mikrocystyny w preparatach *Arthrospira*. Najwyższa odnotowana zawartość wynosiła 2,12 µg/g (44). Nie zbadano jednak, czy preparaty nie zawierały metabolitów lub fragmentów komórek innych gatunków (45).

W badaniach przeprowadzonych przez Salazar i wsp. wykluczono toksyczność *Arthrospira maxima* (46), natomiast Christiansen i wsp. wykazali u jednego z czterech badanych szczepów *Arthrospira* obecność genów warunkujących nierybosomalną syntezę cyklicznych peptydów, należących do szeregu metabolitów wtórnych (w tym toksyn) u bakterii i niższych eukariontów. Zaobserwowano jednak, że geny te częściej występują u szczepów *Spirulina* niż *Arthrospira* (47). Ballot i wsp. wykryli

w monokulturze *A. fusiformis* pochodzącej z jeziora Sonachi w Kenii mikrocytynę i anatoksynę-a (45).

Doniesienia te skłoniły Mussagy i wsp. do zbadania, czy szczepy *A. fusiformis* mogą pod wpływem zmieniających się czynników środowiska wytwarzać toksyny. Do badań wykorzystano dwa szczepy pochodzące z Mozambiku i szczep wyizolowany z jeziora Nakuru w Kenii. Cyjanobakterie hodowano przy różnym zasoleniu i natężeniu światła. W żadnej z hodowli badanych szczepów nie wykryto mikrocytyn, nadularyn ani anatoksyn. W dodatkowych eksperymentach wykazano, że u szczepów z Mozambiku nie występuje gen *mcyE* zaangażowany w syntezę syntetazy mikrocytyny. Zaobserwowano, że w przypadku innych gatunków cyjanobakterii szczepy wytwarzające toksyny często koegzystują ze szczepami nietoksycznymi i różnią się od nich tym, że mają geny warunkujące biosyntezę toksyn. Zjawisko to może tłumaczyć różnice w wynikach otrzymanych przez Ballot i wsp. oraz Mussagy i wsp. Jednak dotychczas nie wykryto genu *mcyE* u *A. fusiformis* (48).

Wykrycie toksyn w preparatach i hodowlach laboratoryjnych czy otwartych zbiornikach, w których hodowana jest *Arthrospira* wynika najprawdopodobniej z zanieczyszczenia hodowli innymi gatunkami cyjanobakterii lub ich metabolitami. Dlatego istotne są szczegółowe badania każdej partii biomasy *Arthrospira*, która zostaje wprowadzona do sprzedaży. W badaniach przeprowadzonych przez Ballot i wsp. oraz Mussagy i wsp. nie wyklucza się, że w przypadku *A. fusiformis* mogą występować szczepy, które wytwarzają toksyny. Należy, zatem dokładnie przebadać każdy szczep wykorzystywany w hodowlach komercyjnych pod kątem zdolności do wytwarzania toksyn.

4. Wykorzystanie cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira* w oczyszczaniu ścieków i usuwaniu metali ciężkich

Tradycyjne metody usuwania metali ciężkich ze ścieków takie jak: strącanie wapnem, wymiana jonowa, ewaporacja, adsorpcja na węglu aktywnym czy filtracja nie są wystarczająco wydajne oraz wiążą się z wysokimi kosztami, szczególnie gdy jony metali obecne są w bardzo niskim stężeniu, to znaczy poniżej 100 mg/l (49,50). Ponadto powstaje problem z zagospodarowaniem nagromadzonych odpadów (13). W oczyszczaniu ścieków przy użyciu mikroorganizmów wykorzystuje się dwa zjawiska: biosorpcję – pasywne pobieranie metali przez żywą lub martwą biomasę i bioakumulację – aktywną sorpcję metali przez organizmy żywe (49). Wykorzystanie tych mechanizmów umożliwia skuteczne usuwanie metali ciężkich nawet w przypadku niskiego ich stężenia i jest mniej szkodliwe dla środowiska niż metody chemiczne (13,49). Jako biosorbenty stosuje się m. in. bakterie, drożdże, grzyby, algi oraz rośliny (13,51). Użycie biosorbentów mających powinowactwo do pojedynczych metali pozwala na ich odzysk i ponowne wykorzystanie, a także na regenerację biomasy (13).

Cyjanobakterie z rodzaju *Arthrospira*, jak się okazało, są bardzo dobrymi biosorbentami ze względu na swoją dużą powierzchnię właściwą komórki, wysokie powinowactwo grup funkcyjnych na powierzchni komórki do różnych jonów, odporność na wysokie stężenia metali, łatwość i niskie koszty hodowli oraz możliwość odzysku metali. Mogą one być stosowane zarówno w oczyszczaniu ścieków przemysłowych, jak i naturalnych zbiorników wodnych skażonych metalami ciężkimi (13,51).

Badanie akumulacji różnych metali ciężkich w komórkach cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira* jest nie tylko istotne ze względu na perspektywę wykorzystania tych organizmów w oczyszczaniu ścieków, ale również konieczne z uwagi na coraz większą dostępność preparatów z *Arthrospira* (52).

Przedstawiciele rodzaju *Arthrospira* posiadają cechy, które umożliwiają uproszczenie rozwiązań technologicznych stosowanych w oczyszczaniu ścieków. Są to organizmy fotosyntetyzujące, mające zdolność asymilacji CO₂, co eliminuje konieczność dodawania organicznego źródła węgla. Można je hodować w otwartych zbiornikach, a składającą się z długich trychomów biomasę łatwo oddzielić od roztworu poprzez filtracje (13,53). Ponadto przeniesienie technologii ze skali laboratoryjnej w techniczną nie powinno przysparzać wielu trudności (13).

Komórki cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira* wykazują zdolność chelatowania metali ciężkich takich jak kadm, miedź czy rtęć. Procesy życiowe tych organizmów prowadzą do alkalizacji środowiska zewnętrznego, co ułatwia strącanie metali ciężkich w postaci wodorotlenków na powierzchni komórki. Towarzyszące zjawiska takie jak wymiana jonowa, adsorpcja i bioakumulacja, wynikające z aktywności metabolicznej komórek, dodatkowo zwiększają wydajność biouzuwania. W wiązaniu metali na powierzchni komórki biorą udział grupy aminowe, grupy karboksylowe, grupy tiolowe oraz niezmetylowane pektyny. Kationy, które wejdą w kontakt z powierzchnią komórki, zostają w ciągu kilku sekund związane z ujemnie naładowanymi grupami na powierzchni ściany komórkowej. Kolejnym etapem jest ich translokacja przez ścianę komórki. Ten ostatni proces jest wolniejszy i uzależniony od metabolizmu. Transport jonów niezbędnych dla organizmu oraz jonów obcych przypominających je rozmiarami i ładunkiem zachodzi przez specjalne kanały w błonie komórkowej (13).

4.1. Usuwanie kadmu (Cd)

W badaniach Costa i França dotyczących mechanizmu sorpcji jonów kadmu przez *A. maxima* wykazano, że ilość akumulowanego przez biomasę metalu wynosiła 45,4% całkowitego Cd dodanego do pożywki. 11,1% akumulowanego kadmu jest związane przez zewnętrzną powierzchnię komórki. Nie zanotowano obecności jonów kadmu w warstwie peptydoglikanu ani we wnętrzu komórki, co wskazuje na to, że w akumulacji 88,8% metalu bierze udział błona zewnętrzna. Składa się ona z fosfolipidów, lipopolisacharydów oraz lipoprotein, których fosforanowe i amino-

kwasowe reszty biorą udział w wiązaniu jonów kadmu. Wykazano ponadto, że akumulacja Cd rosła wraz ze wzrostem stężenia metalu do 40,0 mg/l roztworu, a przy stężeniu 50,0 mg/l wyraźnie spadła. Prawdopodobnym wyjaśnieniem tego zjawiska jest zablokowanie porów błony zewnętrznej biorących udział w transporcie jonów metali przez wcześniej utworzone agregaty tych jonów z lipidami błony. Maksymalna pojemność sorpcyjna komórek żywych wynosiła 47,63 mg Cd/g, a komórek martwych – 37,00 mg Cd/g biomasy. Cyjanobakterie pobierały kadm w początkowych etapach wzrostu, a następnie stopniowo uwalniały go do pożywki. Wykazano również, że hodowanie *A. maxima* w pożywce zawierającej Cd w stężeniu 1,2 mg/l negatywnie wpłynęło na wzrost komórek i zmniejszyło ich produktywność (52).

Ważnym elementem wykorzystania mikroorganizmów w utylizacji ścieków jest immobilizacja komórek. Ułatwia ona oddzielenie biomasy od wody osadowej, zapobiega przechodzeniu mikroorganizmów do roztworu, przez co zwiększa ich gęstość w reaktorze oraz poprawia wytrzymałość i trwałość biomasy (54). W eksperymencie przeprowadzonym w 2003 r. przez Costa i França do unieruchomienia populacji *A. maxima* użyto glony o dużym (*Sargassum* sp.) i słabym (*Ulva* sp.) powinowactwie do Cd. Zastosowanie glonów z rodzaju *Sargassum* spowodowało immobilizację 59% komórek *A. maxima*. W przypadku *Ulva* sp. wielkość ta wynosiła 85%. Tworzenie się biofilmu *A. maxima* na *Sargassum* sp. spowodowało uwolnienie z komórek glonów alginianu – związku istotnego w akumulacji metali ciężkich, co obniżyło zdolność tych organizmów do wiązania kadmu. Zjawisko to nie miało miejsca w przypadku zastosowania *Ulva* sp. Immobilizacja *A. maxima* za pomocą zielenicy *Ulva* sp. przyczyniła się do zwiększonego usuwania Cd z roztworu przez cyjanobakterie (55).

4.2. Usuwanie chromu (Cr)

Chrom na VI stopniu utlenienia jest wysoce toksyczny i przyczynia się do powstawania nowotworów płuc i jamy nosowej. Chrom na III stopniu utlenienia jest mniej toksyczny (56). W wiązaniu Cr (III) istotną rolę odgrywają grupy karboksylowe i fosforanowe (49). W eksperymentach przeprowadzonych przez Madrid i wsp. wykazano, że wahania temperatury (0-60°C) i czasu inkubacji (2-60 min) miały niewielki wpływ na przyswajanie jonów Cr(III) i Cr(VI) (57).

Ścinki skór powstające w procesie wytwarzania produktów skórzanych są utylizowane metodą moką polegającą na hydrolizie ługiem sodowym. Powstający hydrolizat jest wysoce toksyczny – zawiera związki organiczne oraz jony metali ciężkich, głównie Cr(III) w stężeniu 300-15 000 ppm. Zastosowanie *Arthrospira* sp. jako biosorbenta w oczyszczaniu hydrolizatu znacznie obniżyło stężenie poszczególnych jonów o ok. 85-100%. Otrzymany po wstępnym oczyszczaniu roztwór może później być wykorzystany jako nawóz ze względu na obecność pierwiastków stosowanych w nawożeniu: azot, potas, bor, magnez, wapń oraz substancji organicznych. Stężenie chromu po oczyszczeniu hydrolizatu wynosi 50 ppm (wcześniej 375 ppm) i w ta-

kiej ilości metal ten korzystnie wpływa na rozwój roślin. W testach przeprowadzonych z użyciem oczyszczonego hydrolizatu wykazano 72% wzrost efektywności kiełkowania roślin, podczas gdy wielkość ta w przypadku surowego hydrolizatu wynosiła 0%, a w przypadku wody – 68%. Na podstawie wyników autorzy wskazują, że oczyszczanie hydrolizatu za pomocą biomasy *Arthrospira* pozwoliło na otrzymanie roztworu, który z powodzeniem może być stosowany w hodowli roślin m.in. jako źródło chromu (51). Obecność chromu w tkankach roślinnych jest wskazana ze względów żywieniowych, gdyż bierze on udział w metabolizmie cukrów, przez co jest ważnym składnikiem diety cukrzyków (13,58).

4.3. Usuwanie ołowiu (Pb)

W badaniach przeprowadzonych przez Gong i wsp. udowodniono, że *A. maxima* posiada wysoką zdolność biosorpcji ołowiu z roztworów wodnych. Komórki cyjanobakterii wstępnie potraktowano 0,2 M roztworem CaCl_2 , który poprawił stabilność biomasy i jej zdolność wiązania ołowiu (z 84 do 92%). Zanotowano wyraźny wpływ pH na biosorpcję ołowiu. Przy pH poniżej 2 była ona niska, co prawdopodobnie spowodowane było zablokowaniem przez jony H^+ miejsc wiążących kationy. Maksimum biosorpcji zostało osiągnięte przy pH równym 5,5. Na podstawie danych uzyskanych za pomocą spektroskopii w podczerwieni wskazuje się, że w biosorpcji ołowiu biorą udział najprawdopodobniej grupy hydroksylowe i aminowe. Skuteczną desorpcję metalu uzyskano stosując 0,1 M roztwory kwasu azotowego, EDTA i kwasu solnego (51).

4.4. Usuwanie innych metali

Przeprowadzono eksperymenty, w których wykazano przydatność biomasy różnych gatunków z rodzaju *Arthrospira* do usuwania z roztworów takich metali jak rtęć (51), cynk (59), antymon (57) i miedź (49).

Badania nad usuwaniem metali ciężkich przez *Arthrospira* są jeszcze w fazie laboratoryjnej. Są one prowadzone m. in. w Instytucie Inżynierii Chemicznej i Urządzeń Ciepłych Politechniki Wrocławskiej. Obiecujące są wyniki eksperymentów, w których żywą biomasę *Arthrospira* zastosowano do oczyszczenia ścieków pochodzących z rafinerii i hut, w których wytapia się miedź. Ścieki zawierają mieszaninę metali śladowych w różnych stężeniach – w przypadku kadmu i rtęci są one zwykle wyższe niż dopuszczalne w Polsce normy. Ścieki zawierają również duże ilości azotu amonowego ($\text{NH}_4\text{-N}$). Stężenie poszczególnych metali śladowych po oczyszczeniu ścieków z wykorzystaniem biomasy *Arthrospira* spełniało polskie normy. Atutem tej metody jest brak konieczności dodawania związków odżywczych w procesie utylizacji, gdyż ścieki zapewniają cyjanobakteriom wszystkie substancje konieczne do fotoau-

totroficznego wzrostu. Do wzrostu badanego szczepu *Arthrospira* optymalna jest temperatura około 35°C, ale w przypadku rafinerii i hut uzyskanie takiej temperatury nie jest problemem, gdyż placówki te wytwarzają nadmiar ciepła. Kolejnym etapem będą badania pilotażowe, które pozwolą określić rzeczywistą przydatność cyjanobakterii *Arthrospira* w oczyszczaniu ścieków przemysłowych (60).

4.5. Usuwanie związków nieorganicznych ze ścieków przez *Arthrospira* spp.

Gatunki rodzaju *Arthrospira*, jak się okazało, były skuteczne w usuwaniu ze ścieków substancji biogenych, w szczególności związków azotu i fosforu. Azot pozyskany z roztworu zużywany jest przez te organizmy do wzrostu, natomiast fosfor wykorzystywany jest jedynie w niewielkiej części (głównie w fazie wzrostu logarytmicznego). Podwyższone (na skutek zachodzenia fotosyntezy) pH powoduje chemiczną precypitację pozostałej części fosforu – proces ten dominuje w fazie wzrostu stacjonarnej populacji (61). Ogbonna i wsp. badali przydatność *A. platensis* do oczyszczania ścieków zawierających 10 000 ppm octanu, 1000 ppm propionianu, 700 ppm azotanu, 400 ppm amoniaku i 100 ppm fosforanu. Tylko azotany i fosforany były skutecznie usuwane, poziom kwasów organicznych nie uległ zmianie. Jednocześnie badano wpływ różnych stężeń amoniaku na wzrost cyjanobakterii *Arthrospira*. Stężenie 200 mg/l całkowicie hamowało wzrost cyjanobakterii, jednakże w przypadku niższych stężeń rzędu 50 mg/l związek ten był dość dobrze usuwany z roztworu (62).

Produkcja ścieków pochodzących z hodowli zwierząt znacznie przekracza możliwości ich odpowiedniego zagospodarowania. Z racji wysokiej zawartości składników biogenych łatwo przyswajalnych przez rośliny (głównie azot, fosfor, magnez i mangan) są one wykorzystywane jako nawóz. Wylewanie ich w nadmiarze na pola uprawne powoduje nasycenie gleby składnikami nawozowymi, w efekcie czego gleba traci zdolność ich zatrzymywania, w skrajnych przypadkach jest skażona. Ścieki przedostają się do wód powierzchniowych i głębinowych, powodując ich poważne zanieczyszczenie (56).

Produktywność hodowli trzody chlewnej rośnie z roku na rok w różnych częściach świata. Tym samym rośnie zagrożenie związane z zanieczyszczeniem środowiska przez ścieki pochodzące z chlewni, szczególnie w rejonach, gdzie hodowcy nie przestrzegają zasad ich bezpiecznego stosowania jako nawozów. Gnojowica zawiera 5,4-6,3 kg N t⁻¹ i 2,2-3,1 kg P t⁻¹ odpadów i charakteryzuje się wysokim wskaźnikiem biochemicznego zapotrzebowania tlenu (BZT). Zastosowanie *Arthrospira* sp. do utylizacji ścieków pochodzących z hodowli zwierząt ma wiele zalet:

- komórki *Arthrospira* mogą wykorzystywać do wzrostu zawarte w ściekach substancje biogenne,
- nieograniczone źródło azotu pozwala na otrzymanie biomasy o maksymalnej zawartości aminokwasów (60-70% suchej masy),

- zdolność *Arthrospira* do flokulacji ułatwia prowadzenie hodowli,
- zdolność wzrostu w wysokim pH ogranicza zanieczyszczenie biomasy innymi mikroorganizmami; niektóre szczepy są odporne na wysokie stężenia $\text{NH}_4\text{-N}$ rzędu 130 mg/l (63),
- biomasa uzyskana po utylizacji może być później użyta jako pokarm dla zwierząt, nawóz lub do produkcji różnych substancji chemicznych, np. polisacharydów, karotenoidów, steroidów, witamin czy lipidów (61).

Badania dotyczące usuwania substancji biogenych ze ścieków z chlewni przez *Arthrospira* przeprowadzono do tej pory na poziomie laboratoryjnym oraz w działających kilka lat placówkach pilotażowych w warunkach subtropikalnych i tropikalnych (64).

W przeprowadzonych w 2003 r. (w pilotażowej placówce znajdującej się w stanie Veracruz w Meksyku) eksperymentach przez Olguín i wsp. wykazano, że *Arthrospira maxima* usuwała azot amonowy w 84-96%, a fosforany w 72-85% w zależności od pory roku i głębokości zbiornika, w którym hodowano biomasę (63).

5. *A. platensis* jako pożywienie w czasie wypraw kosmicznych

Projekt MELISSA (Micro Ecological Life Support System Alternative) jest realizowany od 1988 r. przez ośrodki badawcze w Europie i Kanadzie pod kierownictwem Europejskiej Agencji Kosmicznej (ESA, ang. *European Space Agency*) (65).

MELISSA to sztuczny ekosystem, którego zadaniem jest podtrzymywanie życia kosmonautów podczas długotrwałych lotów kosmicznych. Wykorzystuje on różne gatunki mikroorganizmów, które hodowane są w połączonych ze sobą bioreaktorach. Jego celem jest usunięcie CO_2 z atmosfery, oczyszczanie ścieków, odzysk wody i wytworzenie pożywienia oraz tlenu (66).

Cyjanobakterie z gatunku *A. platensis* należą do grupy organizmów wykorzystywanych w pętli MELISSA, gdyż posiadają wiele cech, które czynią je idealnymi kandydatami do systemu podtrzymywania życia. Najważniejszymi z nich są: wysoka wartość odżywcza oraz zdolność absorpcji CO_2 i produkcji O_2 . Hodowla tej cyjanobakterii jest łatwa i bardzo produktywna. Cała biomasa *Arthrospira* może być spożywana, a brak celulozy i niska zawartość kwasów nukleinowych sprawiają, że substancje odżywcze zawarte w komórkach tych cyjanobakterii są łatwo przyswajalne (66). Istotne są również terapeutyczne właściwości *Arthrospira* – spożywanie biomasy może w pewnym stopniu przeciwdziałać szkodliwym wpływom warunków panujących w przestrzeni kosmicznej, np. mutagennym efektem promieniowania kosmicznego (67).

System MELISSA składa się z pięciu kompartmentów. W kompartmentie I zachodzi fermentacja termofilna w warunkach beztlenowych w celu degradacji odpadów, do których należą głównie organiczne substancje pochodzące od załogi i niejadalne

części roślin stanowiących pożywienie. W efekcie fermentacji powstaje mieszanina lotnych kwasów tłuszczowych, NH_3 , H_2 , CO_2 oraz minerałów i niewielkiego procenta trudno przetwarzalnego materiału. Proces ten przeprowadzają różne gatunki mikroorganizmów wyizolowane z flory jelitowej człowieka. Wytworzone kwasy tłuszczowe trafiają do kompartmentu II, gdzie są przetwarzane na biomasę przy udziale fotosyntetyzujących bakterii z gatunku *Rhodospirillum rubrum*. W kompartmentcie III znajduje się kokultura bakterii *Nitrosomonas europaea* i *Nitrobacter*. Bakterie z rodzaju *Nitrosomonas* utleniają amoniak do azotynu, który jest utleniany przez *Nitrobacter winogradsky* do azotanu. Nitryfikacja pozwala na otrzymanie źródeł azotu, które będą lepiej przyswajalne przez organizmy znajdujące się w kolejnych kompartmentach: IVa, w którym znajduje się kultura *A. platensis* i IVb, gdzie znajdują się hodowla roślin wyższych. W obu z nich zachodzi wydzielanie tlenu, a także produkcja jadalnej biomasy z wykorzystaniem światła jako źródła energii oraz CO_2 wydychanego przez załogę i pochodzącego z pozostałych kompartmentów jako źródła węgla (66).

Badania związane z systemem MELISSA prowadzone są na różnych poziomach przez wiele zespołów badawczych. Pilotażowy bioreaktor, w którym hodowana jest *A. platensis* to fotobioreaktor typu air-lift z obiegiem zewnętrznym o objętości 77 dm^3 . W skład oprzyrządowania wchodzi urządzenia do pomiaru pH, temperatury, rozpuszczonego tlenu, zawartości CO_2 , ilości biomasy i natężenia oświetlenia. Umocowane na zewnątrz halogenowe lampy w ilości 350 oświetlają 71% całkowitej objętości bioreaktora (65,68).

Placówka pilotażowa znajduje się w Universitat Autònoma de Barcelona. Eksperymenty będą również prowadzone w stacji Concordia na Antarktydzie, gdzie planowane jest wdrożenie systemu oczyszczania ścieków opartego na technologii wykorzystywanej w kompartmentach I i III (69). Otrzymane dotychczas wyniki dotyczące działania poszczególnych kompartmentów są obiecujące i pozwalają na rozpoczęcie kolejnej fazy testów, w której badane będzie działanie połączonych ze sobą kompartmentów tworzących pętlę systemu MELISSA (70).

Warunki panujące w przestrzeni kosmicznej stwarzają szereg problemów, które nie występują w przypadku hodowli *Arthrospira* w laboratoriach tradycyjnych. Należą do nich m.in. mikrograwitacja i zwiększone promieniowanie jonizujące. Zjawiska te zmniejszają wydajność organizmów fotosyntetyzujących oraz mogą wykazywać działanie mutagenne, co może ujemnie wpłynąć na jakość pożywienia otrzymywanego z *Arthrospira*, a nawet indukować wytwarzanie związków toksycznych dla ludzi. Dlatego prowadzone są badania nad wpływem mikrograwitacji i promieniowania jonizującego na fizjologię *Arthrospira*. Niezbędne jest sekwencjonowanie genomu tego organizmu, by możliwe było śledzenie ewentualnych zmian w materiale genetycznym i wykrywanie ewentualnych mutacji (65).

6. Inne zastosowania

Biomasa *Arthrospira* jest stosowana przez hodowców jako dodatek do pożywienia dla drobiu, ryb i skorupiaków (71). Prowadzone są badania nad wykorzystaniem cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira* do uzyskiwania naturalnych barwników takich jak chlorofil *a* czy fikocyjanina. Powszechne wykorzystanie w tym celu zielenic z rodzaju *Chlorella* i *Scenedesmus* wiąże się z wysokimi kosztami suszenia i ekstrakcji. Ponadto organizmy te zawierają w swojej ścianie celulozę, co utrudnia proces pozyskiwania barwników. Problemy te nie pojawiają się w przypadku *Arthrospira* (72,73).

7. Podsumowanie

W obliczu narastającego problemu głodu w niektórych obszarach kuli ziemskiej cyjanobakterie z rodzaju *Arthrospira* mogą stać się w przyszłości jednym z ważniejszych składników diety ludzkiej. Wysoka zawartość substancji odżywczych czyni ten organizm jednym z najlepszych źródeł białka, kwasów tłuszczowych i innych substancji wśród produktów nie pozyskiwanych od zwierząt. Hodowla *Arthrospira* jest łatwa i stosunkowo tania. W regionach tropikalnych i subtropikalnych, gdzie problem głodu jest najbardziej powszechny, może ona być prowadzona w małej skali nawet przez poszczególne rodziny. Codzienne spożywanie odpowiedniej ilości biomasy *Arthrospira* pozwala na uzupełnienie deficytu białek i innych ważnych dla prawidłowego funkcjonowania organizmu substancji. Ponadto lecznicze właściwości *Arthrospira* przyczyniają się do lepszej odporności organizmu na wirusy, bakterie czy pasożyty, a ponadto mogą zapobiegać rozwojowi pewnych rodzajów nowotworów. Szczegółowe badania, które są prowadzone w coraz szerszym zakresie, pozwolą na ocenę rzeczywistej przydatności cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira* do zwalczania niektórych schorzeń, co może zaowocować stosowaniem preparatów z tej cyjanobakterii w terapiach przeciwwirusowych i przeciwnowotworowych. Zdolność preparatów *Arthrospira* do obniżania zawartości cholesterolu może przyczynić się do rozwiązania kolejnego problemu ludzkości – otyłości. Uzupełnienie diety biomasą *Arthrospira* może ułatwić walkę z nadwagą i zmniejszyć ryzyko chorób związanych z otyłością. Regularne spożywanie preparatów z tej cyjanobakterii zapewnia lepsze funkcjonowanie organizmu, co jest istotne w przypadku każdego człowieka.

Obiecujące są również wyniki zastosowania biomasy *Arthrospira* w oczyszczaniu ścieków zawierających metale ciężkie i substancje biogenne. Możliwe jest, oczywiście po odpowiednim zoptymalizowaniu procesu, oczyszczanie ścieków i jednocześnie hodowanie cyjanobakterii w celach spożywczych. Warunkiem jest jednak akceptacja społeczeństwa dla pożywienia otrzymywanego w ten sposób.

Prowadzone są dalsze badania nad różnymi możliwościami wykorzystania *Arthrospira* i być może zostaną poznane nowe właściwości tej cyjanobakterii.

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

Literatura

1. Sánchez M., Bernal-Castillo J., Roza C., Rodríguez I., (2003), *Universitas Scientiarum* 8 (1), http://www.javeriana.edu.co/ciencias/universitas/vol8n1/j_bernal.htm.
2. Ciferri O., (1983), *Microbiol. Rev.*, 47 (4), 551-578.
3. <http://www.naturalways.com/spirulina-analysis.htm>.
4. http://www.antenna.ch/en/documents/AspectNut_UK.pdf.
5. <http://www.spirulinasource.com/earthfoodch2b.html>.
6. Watanabe F., Katsura H., Takenaka S., Fujita T., Abe K., Tamura Y., Nakatsuka T., Nakano Y., (1999), *J. Agric. Food Chem.*, 47(11), 4736-4741.
7. Watanabe F., Miyamoto E., Nakano Y., (2001), *J. Agric. Food Chem.*, 49(11), 5685-5688.
8. Herrmann W., Geisel J., (2002), *Clin. Chim. Acta*, 326, 47-59.
9. http://www.vegetarian.pl/download/WITAMINA_B12.html.
10. Puyfoulhoux G., Rouanet J-M., Besançon P., Baroux B., Baccou J-C., Caporiccio B., (2001), *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1625-1629.
11. Pervushkin S. V., Voronin A. V., Kurkin V. A., Sokhina A. A., Shatalaev I. F., (2001), *Chemistry of Natural Compounds*, 37(5), 476-481.
12. <http://www.spirulina.com/SPBNutrition.html>.
13. Chojnacka K., Noworyta A., (2001), *Chemik* 54 (4), 87-93.
14. Belay A., (2002), *JANA*, 5 (2), 27-49.
15. Yang H. N., Lee E. H., Kim H. M., (1997), *Life Sci.*, 6(13), 1237-1244.
16. Miranda M. S., Cintra R. G., Barros S. M., Mancini-Filho J., (1998), *J. Med. Biol. Res.*, 31, 1075-1079.
17. Bhat V. B., Madyastha K. M., (2001), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 285, 262-266.
18. Piñero Estrada J. E., Bermejo Bescós P., Villar del Fresno A. M., (2001), *Il Farmaco*, 56, 497-500.
19. Bhat V. B., Madyastha K. M., (2000), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 275, 20-25.
20. Rimbau V., Camins A., Romay C., Gonzalez R., Pallas M., (1999), *Neurosci. Lett.*, 276, 75-78.
21. Reddy C. M., Bhat V. B., Kiranmai G., Reddy M. N., Reddanna P., Madyastha K. M., (2000), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 3, 599-603.
22. Lee J. B., Hayashi T., Hayashi K., Sankawa U., Maeda M., Nemoto T., Nakanishi H., (1998), *J. Nat. Prod.*, 61, 1101-1104.
23. Lee J. B., Hayashi T., Hayashi K., Sankawa U., (2000), *J. Nat. Prod.*, 63, 136-138.
24. Hayashi T., Hayashi K., Maeda M., Kojima I., (1996), *J. Nat. Prod.*, 59(1), 83-87.
25. Hernández-Corona A., Nieves I., Meckes M., Chamorro G., Barron B. L., (2002), *Antiviral Res.*, 56, 279-285.
26. Hayashi K., Hayashi T., Morita N., (1993), *Phytother. Res.*, 7, 76-80.
27. Rechter S., König T., Auerochs S., Thulke S., Walter H., Dörnenburg H., Walter C., Marschall M., (2006), *Antiviral Res.*, 72, 197-206.
28. Teas J., Hebert J. R., Fitton J. H., Zimba P. V., (2004), *Med. Hypotheses*, 62, 507-510.
29. Ayehunie S., Belay A., Baba T. W., Ruprecht R. M., (1998), *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.*, 18 (1), 7-12.
30. Hayashi K., Hayashi T., Kojima I., (1996), *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 12(15), 1463-1471.
31. Mishima T., Murata J., Toyoshima M., Fujii H., Nakajima M., Hayashi T., Kato T., Saiki I., (1998), *Clin. Exp. Metastasis*, 16, 541-550.
32. Tang W., Nakamura Y., Tsujimoto M., Sato M., Wang X., Kurozumi K., Nakahara M., Nakao K., Nakamura M., Mori I., Kakudo K., (2002), *Mod. Pathol.*, 15(6), 593-598.
33. Mathew B., Sankaranarayanan R., Nair P. P., Varghese C., Somanathan T., Amma B. P., Amma N. S., Nair M. K., (1995), *Nutr. Cancer.*, 24(2), 197-202.
34. Liu Y., Xu L., Cheng N., Lin L., Zhang C., (2000), *J. Appl. Phycol.*, 12 (2), 125-130.

35. Lamia T., Hatem B. Q., Brouers M., Chriaa J., Challouf R., (2005), *International Symposium on Cyanobacteria for Health, Science and Development*, (May 3-6), Embiez Island, Francja, 15-16.
36. Ozdemir G., Karabay N. U., Dalay M. C., Pazarbasi B., (2004), *Phytother. Res.*, 18, 754-757.
37. Ble-Castillo J. L., Rodriguez-Hernandez A., Miranda-Zamora R., Juarez-Oropeza M. A., Diaz-Zagoya J. C., (2002), *Life Sci.*, 70 (22), 2665-2673.
38. Fukino H., Takagi Y., Yamane Y., (1990), *Eisei Kagaku*, 36, 5.
39. Parada J. L., Zulpa de Caire G., Zaccaro de Mule M. C., Storni de Cano M. M., (1998), *Int. J. Food Microbiol.*, 45, 225-228.
40. Hayakawa Y., Hayashi T., Hayashi K., Ozawa T., Niiya K., Sakuragawa N., (1997), *Biochim. Biophys. Acta*, 1355(3), 241-247.
41. Hayakawa Y., Hayashi T., Lee J. B., Ozawa T., Sakuragawa N., (2000), *J. Biol. Chem.*, 275(15), 11379-11382.
42. Kaji T., Fujiwara Y., Inomata Y., Hamada C., Yamamoto C., Shimada S., Lee J. B., Hayashi T., (2002), *Life Sci.*, 70(16), 1841-1848.
43. Iwasa M., Yamamoto M., Tanaka Y., Kaito M., Adachi Y., (2002), *Am. J. Gastroenterol.*, 97, 3212-3213.
44. Gilroy D. J., Kauffman K. W., Hall R. A., Huang X., Chu F. S., (2000), *Environ. Health Perspect.*, 108, 435-439.
45. Ballot A., Krienitz L., Kotut K., Wiegand C., Pflugmacher S., (2005), *Harmful Algae*, 4, 139-150.
46. Salazar M., Martínez E., Madrigal E., Ruiz L. E., Chamorro G. A., (1998), *J. Ethnopharmacol.*, 62, 235-241.
47. Christiansen G., Dittmann E., Via Ordorika L., Rippka R., Herdman M., Borner T., (2001), *Arch. Microbiol.*, 176 (6), 452-458.
48. Mussagy A., Annadotter H., Cronberg G., (2006), *Toxicon*, 1027-1034.
49. Chojnacka K., Chojnacki A., Górecka H., (2005), *Chemosphere*, 59 (1), 75-84.
50. Rangsayatorn N., Pokethitiyook P., Upatham E. S., Lanza G. R., (2004), *Environ Int.*, 30(1), 57-63.
51. Gong R., Ding Y., Liu H., Chen Q., Liu Z., (2005), *Chemosphere*, 58, 125-130.
52. Costa A. C. A., França F. P., (1998), *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 14(4), 579-581.
53. Mosulishvili L., Belokobylsky A., Khizanishvili A., Kirkesali E., Frontasyeva M., Aksenova N., (2004), *Joint Institute for Nuclear Research Preprint D14-2004-35*, Dubna.
54. Klimiuk E., Łebkowska M., (2003), *Biotechnologia w ochronie środowiska*, 145-148. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.
55. Costa A. C. A., França F. P., (2003), *Mar. Biotechnol.*, 5, 149-156.
56. Dubel K., (2001), *Ochrona i kształtowanie środowiska*, 62-78, Fundacja Centrum Edukacji Ekologicznej Wsi, Krosno.
57. Madrid Y., Barrio-Cordoba M. E., Cámara C., (1998), *Analyst*, 123, 1593-1598.
58. Mazur K., Filipek-Mazur B., (2001), *Produkcja i wartość nawozowa kompostów z terenu miasta Krakowa*, Materiały z Konferencji Naukowej „Produkcja i wykorzystanie kompostów z terenu miasta Krakowa”, (22.03.), Kraków.
59. Nalimova A. A., Popova V. V., Tsoglin L. N., Pronina N. A., (2005), *Russ. J. Plant Physiol.*, 52 (2), 229-234.
60. Chojnacka K., Chojnacki A., Górecka H., (2004), *Hydrometallurgy*, 73 (1-2), 147-153.
61. Lodi A., Binaghi L., Solisio C., Converti A., del Borghi M., (2003), *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 656-660.
62. Ogbonna J. C., Yoshizawa H., Tanaka H., (2000), *J. Appl. Phycol.*, 12, 277-284.
63. Olguin E. J., Galicia S., Mercado G., Pérez T., (2003), *J. Appl. Phycol.*, 15, 249-257.
64. Olguin E. J., (2003), *Biotechnol. Adv.*, 22 (1), 81-91.
65. <http://ecls.esa.int/ecls/?p=melissa>.
66. Hendrickx L., Wever H., Hermans V., Mastroleo F., Morin N., Wilmotte A., Janssen P., Mergeay M., (2006), *Res. Microbiol.*, 157, 77-86.
67. Lehto K. M., Lehto H. J., Kanervo E. A., (2006), *Res. Microbiol.*, 157, 69-76.
68. Godia F., Albiol J., Montesinos J. L., Perez J., Creus N., Cabello F., Mengual X., Montras A., Lasseur C., (2002), *J. Biotechnol.*, 99 (3), 319-330.

69. <http://ecls.esa.int/ecls/?p=ttpantarctica>.
70. Godia F., Albiol J., Perez J., Creus N., Cabello F., Montras A., Masot A., Lasseur C., (2004), *Adv. Space Res.*, 34, 1483-1493.
71. Vonshak A., (1997), *Spirulina Platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology*, Ed. Vonshak A., 205-212, Taylor & Francis, Wielka Brytania.
72. Danesi E. D. G., Rangel-Yagui C. O., Carvalho J. C. M., Sato S., (2004), *Biomass and Bioenergy*, 26, 329-335.
73. 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.
74. Sindyikengera S., Xia W., (2006), *J. Zhejiang Univ. Sci. B.*, 7(2), 90-98.