

MICROBIOLOGIA ȘI BIOTEHNOLOGIA

MODIFICAREA CONȚINUTULUI UNOR COMPUȘI BIOLOGICI ACTIVI LA *SPIRULINA PLATENSIS* ÎN CONDIȚII DE STRES DE ILUMINARE INDUS

Cepoi Liliana, Rudi Ludmila, Chiriac Tatiana, Djur Svetlana, Miscu Vera,
Codreanu Svetlana, Ghelbet Viorica, Nartea Ecaterina, Rudic Valeriu

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie

Rezumat

Articolul prezintă rezultatele cercetărilor orientate spre elucidarea efectelor stresului creat prin introducerea condițiilor de fotoperiodism la spirulina, cultivată pe mediu cu adaos de acetat de zinc în calitate de protector și stimulator biosintetic. Stresul de iluminare a fost indus la cultura de spirulină pe durata fazei de creștere exponențială a ciclului vital prin reducerea perioadei luminoase la 4 ore din 24 ore. Parametrii monitorizați au fost: nivelul acumulării de biomasă, conținutul de proteine, ficobiline, glucide, lipide și β - caroten. S-a demonstrat că reducerea perioadei de lumina la 4 ore în zi constituie un stres pronunțat pentru cultura de spirulină. Efectul stresului se reflectă în reducerea cantității de biomasă și creșterea conținutului de lipide și glucide. Acetatul de zinc din stimulator al acumulării de ficobiline și β - caroten în condiții de iluminare continuă se transformă în inhibitor în condiții de stres de iluminare.

Cuvinte cheie: *Spirulina platensis*, stres indus, regim de iluminare, acetat de zinc, conținut biochimic.

Depus la redacție 30.07.2018

Adresa pentru corespondență: Rudi Ludmila, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, str. Academiei 1, MD-2028 Chișinău, Republica Moldova; e-mail: rudiludmila@gmail.com

Introducere

Cianobacteriile reprezintă una dintre cele mai vechi și cele mai de succes forme de viață pe Pământ. Lunga istorie evolutivă și modul de viață fotoautotrof le-a permis să colonizeze diverse habitate. În prezent sunt cel mai important grup de organisme din punct de vedere numeric de pe planetă [9]. Apariția și dezvoltarea lor a fost unul din principalii factori, care a dus la trecerea la modul de viață oxic [10].

Evoluția cianobacteriilor a avut loc în condițiile unor modificări permanente ale mediului ambiant. Fluctuațiile de temperatură, intensitate a luminii, salinitate, componență a mediului sunt surse de stres pentru diferite specii de cianobacterii. Pe durata evoluției aceste organisme și-au dezvoltat mecanisme eficiente, care asigură supraviețuirea lor în condițiile variației principalilor parametri fizici.

Lumina este sursa de energie pentru organismele fotosintetizatoare. De aceea, atât intensitatea luminii, cât și calitatea ei determină intensitatea tuturor proceselor vitale. Cantitatea de biomasă, dar și calitatea ei sunt influențate de acești parametri.

Lumina de culoare verde și de intensitate de la 1200 lx asigură o acumulare accelerată de biomasă la spirulină, comparativ cu lumina roșie, albă, și în special albastră de aceeași intensitate [11].

Lumina de intensitate foarte înaltă provoacă efecte de inhibare a proceselor biologice la cianobacterii, inclusiv la spirulină. Efectul dat poate fi diminuat prin mărirea esențială a cantității de carbon anorganic accesibil. În acest caz, inhibiția survine mult mai târziu, iar revenirea culturii de spirulină la starea normală are loc mai repede și cu urmări minime [15].

Scăderea intensității luminii de la 5 la 2 klux la spirulină este asociată cu o creștere simțitoare a cantității de clorofilă (cu aproximativ 30%) [4].

Influența iluminării asupra componentelor biochimice ale algelor fotosintetizante este pe larg controlată de procesul de fotoadaptare, când celulele algale suferă schimbări biochimice, fiziologice, biofizice și structurale pentru a intensifica procesul de fotosinteză și creștere [7].

O tendință comună a răspunsului celular la diminuarea intensității luminii este sporirea cantității pigmentilor fotosintetici: clorofilelor, ficobilinelor, carotenoizilor primari. Intensificarea iluminării induce diminuarea cantitativă a pigmentilor implicați în procesul de fotosinteză și sporirea cantității carotenoizilor secundari cu rol fotoprotector (β -carotenu, zeaxantina). Intensitatea înaltă a luminii duce la mărirea cantității de polizaharide în cianobacterii. La cultivarea în bazine deschise a spirulinei, sinteza carbohidraților este mult mai înaltă în zile cu soare. Numeroase studii atestă o dependență invers proporțională a conținutului de lipide, în special a acizilor grași polinesaturați, de intensitatea luminii [1, 4, 5, 14].

Efectele luminii asupra organismelor vii sunt determinate nu numai de parametrii fizici ai acesteia, ci și de durata de expunere, adică de prezența fenomenului de fotoperiodism. Variațiile circadiene cu perioada de aproximativ 24 ore sunt caracteristice practic pentru toate procesele fiziologice a majorității organismelor cunoscute, inclusiv cele mai vechi, cum sunt cianobacteriile.

Spirulina (Arthrospira) platensis – reprezentant tipic al cianobacteriilor - rămâne a fi unul dintre cele mai solicitate obiecte atât în plan de producere ficologică, cât și al cercetărilor fundamentale. În natură spirulina este adaptată la condiții de fotoperiodism, iar situația în care perioadele de lumină și cele de întuneric alternează este normală pentru habitatele naturale. În experiențele noastre a fost utilizată o tulpină de spirulină adaptată la condiții industriale, creată pentru producere de biomasă și alte produse valoroase [13]. În condiții industriale pentru această tulpină se aplică regimul de iluminare continuă iar condițiile de fotoperiodism pot induce o stare de stres la această cultură. În același timp unele microelemente pot interveni în starea de stres prin ameliorarea, ori din contra, prin agravarea situației.

Zincul este un element esențial pentru toate organismele. Este partea activă a peste 300 de enzime implicate în cele mai importante procese vitale. Metabolismul proteic și cel al acizilor nucleici depinde de zinc. Diviziunea, creșterea și funcționarea normală a celulelor este determinată de cantități suficiente de zinc. Zincul are proprietăți antioxidante, care poate proteja celulele în condiții de stres, inclusiv cel de iluminare [8]. În același timp, a fost stabilit, că zincul poate fi și un stimulator biosintetic, care produce o majorare a anumitor componente în biomasa de spirulină [12].

Scopul lucrării a fost de a evidenția efectele stresului creat prin introducerea condițiilor de fotoperiodism la spirulina, cultivată pe mediu cu adaos de acetat de zinc în calitate de protector și stimulator biosintetic.

Material și metode

Obiectul de studiu. Tulpina cianobacteriei *Spirulina platensis* CNMN-CB-11[13].

Procesul și condițiile de cultivare. Pentru cultivarea spirulinei a fost utilizat mediul nutritiv mineral cu următoarea componență: macroelemente (în g/l): NaNO_3 -2,5; NaHCO_3 -8,0; NaCl -1,0; K_2SO_4 -0,6; Na_2HPO_4 -0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,2; CaCl_2 -0,024; 1ml/l soluție de microelemente ce conține (mg/l(mediu): H_3BO_3 -2,86; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -1,81; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -0,08; MoO_3 -0,015); FeEDTA -1ml/l. Suplimentar, mediul de cultivare (atât în seria experimentală, cât și în cea martor) a conținut și acetatul de Zn(II) în concentrație de 15,0 mg/l. Pe durata cultivării au fost respectați următorii parametri de proces: cantitatea de cultură start (inoculum) – 0,4-0,45g/l BAU; temperatura de 28-32°C, pH-ul optim al mediului 8-10, iluminarea (pe perioada de creștere a culturii la lumină) de ~ 37-55 μM fotoni/ m^2/s . Cultura a fost agitată zilnic, timp de 2 ore pe un agitator universal de laborator tip WU-4 cu frecvența oscilațiilor de 2500 hz. Durata ciclului de cultivare de 7 zile. Probele de spirulină au fost colectate zilnic cu interval de 24 ore.

Condițiile de stres de iluminare. În ziua a 3-a (după 48 ore) a ciclului de cultivare, care corespunde sfârșitului lag fazei și începutului fazei de creștere exponențială, cultura de spirulină a fost supusă stresului de iluminare prin reducerea perioadei luminoase la 4 ore din 24 ore. Astfel regimul de iluminare a fost cu fotoperiodicitatea de 4 ore lumină/20 ore întuneric. Acest regim a fost respectat până în ziua a 7-a de cultivare.

Metodele de determinare a conținutului biochimic al biomasei de spirulină.

Conținutul de proteine în biomasă, a fost determinat spectrofotometric prin metoda Lowry cu utilizarea reagentului Folin-Ciocalteu [6]. Conținutul de glucide a fost determinat în baza deshidratării hexozelor în prezența acidului sulfuric concentrat, urmat de condensarea acestora cu reagentul antron [16]. Lipidele au fost determinate spectrofotometric cu utilizarea reagentului fosfo-vanilinic în extractul cloroformic [3]. Cantitatea de ficobiline a fost determinată în extractul hidric obținut din biomasa de spirulină [2]. β – carotenul a fost extras în alcool etilic de 96%, iar absorbanta măsurată la 450nm. Toate secvențele experimentale au fost efectuate în trei repetări, iar rezultatele au fost prelucrate statistic utilizând facilitățile Microsoft Excel 2010.

Rezultate și discuții

Ipoteza de lucru pentru cercetările, rezultatele cărora sunt expuse în acest articol constă în următoarele: în condiții de stres de iluminare cu reducerea perioadei luminoase la doar 4 ore din 24, cultura de spirulină poate reacționa prin reorientarea activității biosintetice cu scopul de menținere a viabilității celulelor. Prezența stimulatoarelor chimici în mediul de cultivare, care se implică activ în sinteza componentelor structurale și funcționale poate modifica răspunsul culturii de spirulină la stresul indus de modificarea condițiilor de cultivare, în cazul dat a condițiilor de iluminare. În studiul nostru, în calitate de stimulator chimic cu implicare în activitatea biosintetică a spirulinei a fost utilizat acetatul de zinc. Acest compus, conține zincul în calitate de bioelement, iar în calitate de ligand – acetatul, pentru ambele componente fiind cunoscut rolul lor important în diverse procese biochimice derulate la nivel de celulă.

Rezultatele obținute la inducerea stresului de iluminare pe durata fazei de creștere exponențială a ciclului de dezvoltare a spirulinei au fost comparate cu rezultatele obținute la cultivarea spirulinei în condiții optime cu regimul de iluminare continuu în lipsa sau în prezența acetatului de zinc.

În condițiile regimului de iluminare continuă, spirulina, cultivată în prezența acetatului de zinc, în primele zile ale fazei de creștere exponențială a acumulat biomasă mai lent comparativ cu martorul (fig. 1A). În ziua a 5-a a fazei de creștere exponențială, conținutul de biomasă în probele de spirulina crescută în prezența acetatului de zinc a fost cu 23% mai mare comparativ cu martorul, în ziua a 6-a, la sfârșitul fazei exponențiale, conținutul de biomasă aliniindu-se practic la valorile conținutului de biomasă din proba martor.

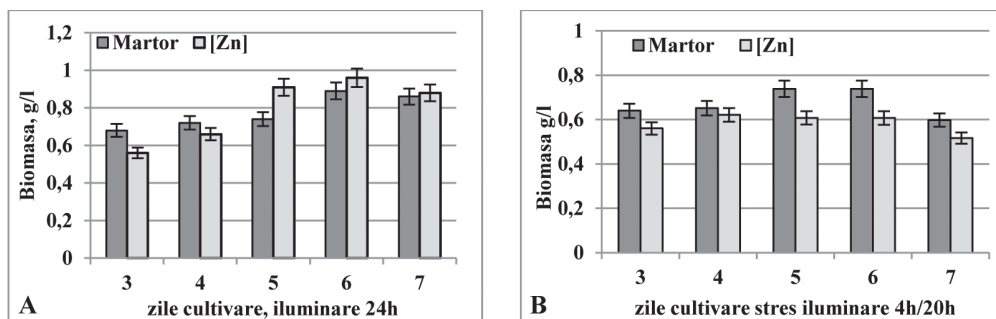


Figura 1. Productivitatea spirulinei pe durata fazei de creștere exponențială la cultivare în prezența acetatului de zinc: A – în regim de iluminare continuă și B – în regim de iluminare periodică 4h/20h.

În condiții de stres de iluminare, indus pe durata fazei de creștere exponențială, cultura de spirulină a continuat să acumuleze biomasă, conținutul maximal al acesteia de 0,738-0,740 g/L fiind stabilit în zilele a 5-a și a 6-a de cultivare (fig. 1B). În varianta experimentală de suplimentare a mediului de cultivare cu acetat de zinc a fost stabilită o reținere a creșterii culturii de spirulină pe durata fazei exponențiale. În această fază a ciclului său vital, spirulina a acumulat cu 18% mai puțin biomasă comparativ cu martorul, iar conținutul de biomasă nu s-a modificat pe durata fazei exponențiale. Este de menționat, că începutul fazei staționare s-a remarcat prin reducerea cu 20% a conținutului de biomasă în martor și cu 15% în varianta experimentală.

Prin urmare, spirulina cultivată în prezența stimulatorului chimic – acetatul de zinc este mai puțin rezistentă la reducerea perioadei luminoase, comparativ cu martorul.

Procesul de biosinteză și respectiv, de acumulare a proteinelor nu a fost perturbat semnificativ de insuficiența iluminării culturii de spirulina (fig. 2A, 2B).

Conținutul proteinelor în martor s-a menținut în limita valorică de 58-60% pe durata fazei de creștere exponențială și s-a redus nesemnificativ spre începutul fazei staționare. În condiții optime de iluminare, acetatul de zinc nu a modificat sinteza proteinelor de către spirulină pe durata fazei de creștere exponențială. În condițiile unui regim periodic de iluminare s-a observat o reducere cu 43% a conținutului de proteine în biomasa de spirulină cultivată în prezența acetatului de zinc la sfârșitul fazei de creștere exponențială.

În variantele experimentale cu regimul de iluminare continuă și cu aplicarea acetatului de zinc s-a determinat majorarea cu 40-48% a conținutului de ficobiline pe durata fazei de creștere exponențială (fig. 3A), demonstrând implicarea pozitivă a stimulatorului chimic în stimularea procesului de sinteză a acestor compuși biologic activi în biomasa spirulinei.

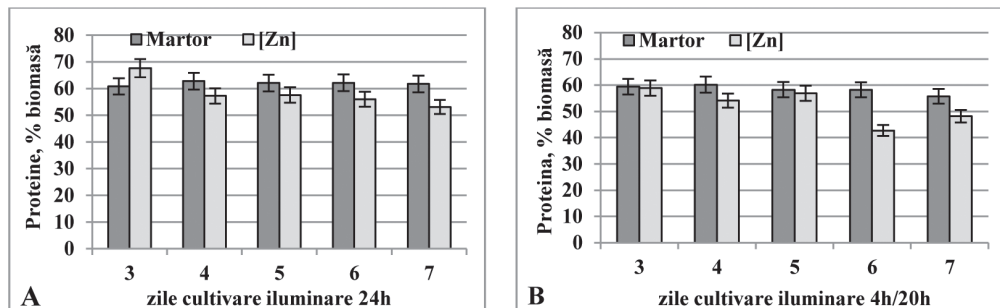


Figura 2. Modificarea conținutului de proteine în biomasa de spirulină pe durata fazei de creștere exponențială la cultivare: A – în regim de iluminare continuă și B – în regim de iluminare periodică 4h/20h.

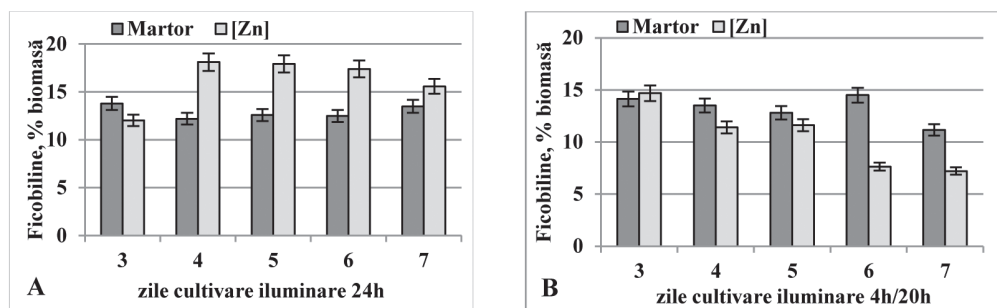


Figura 3. Modificarea conținutului de ficobiline în biomasa de spirulină pe durata fazei de creștere exponențială la cultivare: A - în regim de iluminare continuă și B – în regim de iluminare periodică 4h/20h.

În regim de iluminare periodică, în varianta martor, conținutul de ficobiline nu s-a modificat substanțial pe durata fazei de creștere exponențială, valorile ne fiind diferite de cele obținute în condiții de iluminare continuă (fig. 3B). În variantele experimentale cu spirulina cultivată în prezența acetatului de zinc și cu regimul de iluminare redus la începutul fazei de creștere exponențială, conținutul total de ficobiline determinate în biomasa spirulinei a fost cu 15% mai mic comparativ cu martorul. La sfârșitul fazei de creștere exponențială, conținutul ficobilinelor în biomasă a scăzut cu 48%, iar la începutul fazei staționare – s-a redus cu 54%.

Prin urmare, odată cu reducerea perioadei de iluminare la 4 ore din 24 ore, acetatul de zinc din mediul de cultivare inhibă sinteza ficobilinelor în biomasa spirulinei.

Conținutul de glucide nu s-a modificat esențial pe durata fazei de creștere exponențială în biomasa de spirulină cultivată în condiții de iluminare continuă (variantele martor), înregistrând-se chiar o slabă tendință de micșorare a lor (fig. 4A).

În varianta cu aplicarea acetatului de zinc, la sfârșitul fazei exponențiale a fost

stabilită o creștere cu 14% a conținutului de glucide în biomasa de spirulină, comparativ cu începutul perioadei exponențiale. Astfel, conținutul de glucide, rezultat la sfârșitul cultivării, a fost cu 64% mai mare comparativ cu martorul și cu 44% mai mare comparativ cu începutul perioadei exponențiale.

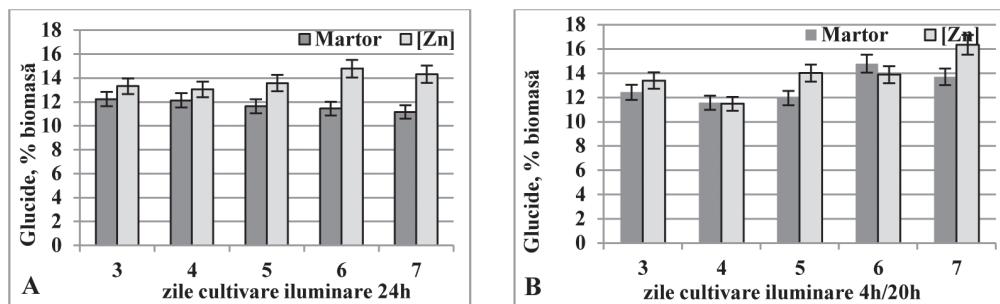


Figura 4. Modificarea conținutului de glucide în biomasa de spirulină pe durata fazei de creștere exponențială la cultivare: A – în regim de iluminare continuă și B – în regim de iluminare periodică 4h/20h.

Pentru cianobacteria *Spirulina platensis* este specifică acumularea glucidelor în condiții de stres. În regim de iluminare periodică, în varianta martor, conținutul de glucide a crescut pe durata exponențială, fiind cu 23% mai mare la sfârșitul perioadei exponențiale (fig. 4B). În varianta cu aplicarea acetatului de zinc, conținutul de glucide în biomasa la sfârșitul fazei exponențiale a fost cu 22% mai majorat comparativ cu perioada inițială și cu 20% comparativ cu probele martor.

Prin urmare, acetatul de zinc, în condiții de iluminare redusă, își intensifică efectul său de stimulare a sintezei glucidelor de către *Spirulina platensis*.

Conținutul de lipide pe durata creșterii exponențiale s-a modificat nesemnificativ în biomasa de spirulină cultivată în condiții optimale, începutul fazei de creștere staționară ne fiind însoțit de reducerea drastică a cantității lor (fig. 5A).

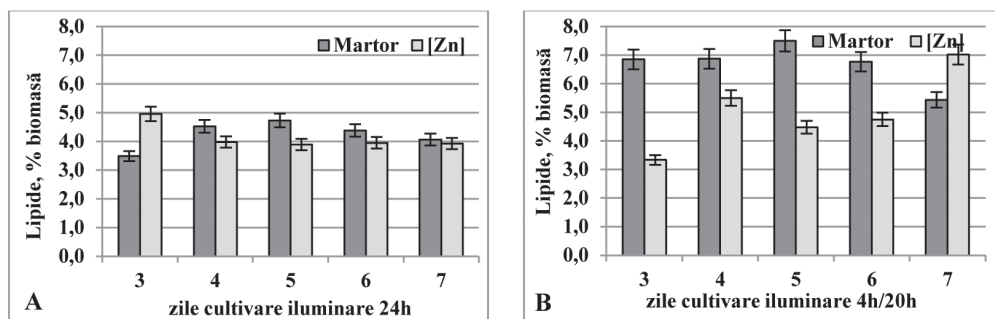


Figura 5. Modificarea conținutului de lipide în biomasa de spirulină pe durata fazei de creștere exponențială la cultivare: A – în regim de iluminare continuă și B – în regim de iluminare periodică 4h/20h.

În varianta experimentală cu introducerea în mediul de cultivare a acetatului de zinc, în regim de iluminare continuă, conținutul lipidelor în biomasa a fost mai mic față de probele martor. În mod similar, acetatul de zinc a redus capacitatea de sinteză a lipidelor la spirulina supusă stresului de iluminare pe durata fazei de creștere exponențială (fig. 5B).

În condiții de stres de iluminare, în biomasa spirulinei conținutul de lipide a crescut cu 50% comparativ cu spirulina cultivată în regim de iluminare continuă. În primele 24 ore de stres indus de iluminare, conținutul lipidelor a crescut practic de două ori. La mijlocul fazei de creștere exponențială care corespunde zilei a 5-a de cultivare, cantitatea de lipide a crescut nesemnificativ. La începutul fazei de creștere staționară, conținutul de lipide în biomasa spirulinei a fost cu 20% mai mic față de începutul fazei de creștere exponențială. Astfel, reducerea perioadei luminoase la cultivarea spirulinei induce sinteza lipidelor la această cultură.

În varianta experimentală cu regimul de iluminare continuă, în experiențele cu aplicarea acetatului de zinc, conținutul lipidelor nu s-a modificat semnificativ. În condiții de stres de iluminare, în biomasa spirulinei cultivată în prezența acetatului de zinc, primele 24 ore de stres au indus reducerea cu 33% a conținutului lipidelor în biomasă comparativ cu aceeași variantă obținută în condiții optime de creștere. Pe durata fazei de creștere exponențială, în cultura de spirulină supusă stresului de iluminare, conținutul lipidelor a crescut. Astfel, în ziua a 7-a, începutul fazei de creștere staționară, conținutul lipidelor în biomasă a constituit 7% ceea ce este de două ori mai mult comparativ cu conținutul lipidelor determinat în biomasa de spirulină la începutul fazei de creștere exponențială.

Prin urmare, condițiile de iluminare determină nivelul de acumulare a lipidelor în biomasa de spirulină la creșterea culturii în prezența acetatului de zinc. Reducerea drastică a perioadei de iluminare a culturii de spirulină induce sinteza acestor constituenți ai biomasei și în cazul cultivării în prezența stimulatoarelor chimici, în cazul dat a acetatului de zinc.

În condiții optime de cultivare în regim de iluminare continuă, conținutul de β -caroten în biomasa de spirulină a scăzut cu 12% pe durata fazei de creștere exponențială a culturii (fig. 6A). Acetatul de zinc, în aceste condiții experimentale a stimulat cu 35% acumularea β -carotenului în biomasa spirulinei în a 5-a zi de cultivare.

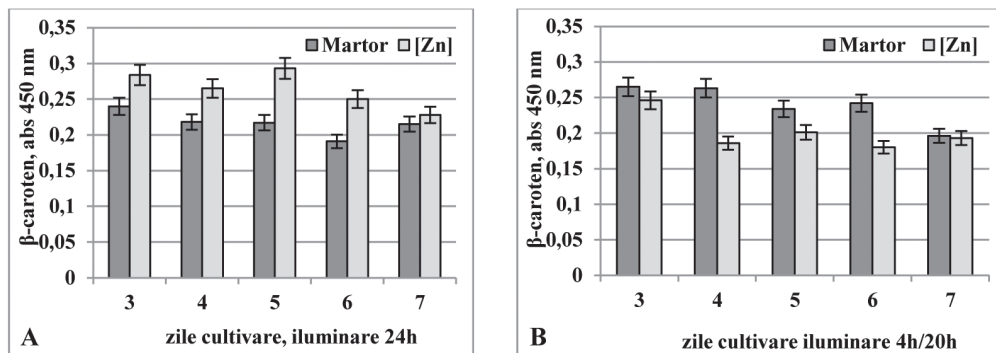


Figura 6. Modificarea conținutului de β -caroten în biomasa de spirulină pe durata fazei de creștere exponențială la cultivare: A – în regim de iluminare continuă și B – în regim de iluminare periodică 4h/20h.

Conținutul de β -caroten în biomasa spirulinei supusă stresului de iluminare s-a diminuat pe durata fazei de creștere exponențială (fig. 6B). În cazul martorului, scăderea conținutului de β -caroten în biomasă a fost un proces lent astfel, că la sfârșitul perioadei exponențiale valoarea lui s-a redus cu 27%.

În varianta experimentală cu regimul de stres de iluminare, în experiențele cu aplicarea acetatului de zinc, cultura de spirulină aflată în faza de creștere exponențială a ciclului vital, a redus cu 23% conținutul de β - caroten după 48 ore de cultivare în condiții de iluminare redusă. În următoarele zile, conținutul de β - caroten în biomasă nu s-a modificat și spre sfârșitul fazei de creștere exponențială, începutul fazei de creștere staționară, acesta a fost practic identic celui din probele martor. Prin urmare, în condiții de iluminare insuficientă, acetatul de zinc nu se manifestă ca stimulator al carotenogenezei.

Concluzii

Condițiile de iluminare continuă asigură o acumulare sporită de biomasă de spirulină, comparativ cu condițiile de stres de iluminare. Acetatul de zinc se manifestă ca stimulator al productivității spirulinei la iluminare continuă, în timp ce în condiții de stres de iluminare acesta are un rol de inhibare a acumulării de biomasă.

Conținutul de proteine în biomasa de spirulină nu diferă semnificativ în condiții de iluminare continuă și de iluminare redusă, dar se observă o ușoară tendință de descreștere pe durata ciclului vital. Acetatul de zinc în condiții de stres de iluminare la sfârșitul fazei de creștere exponențială se manifestă ca inhibitor al acumulării de proteine în biomasă.

În lipsa acetatului de zinc condițiile de stres de iluminare nu modifică semnificativ conținutul de ficobiline. Acetatul de zinc este un stimulator activ al acumulării de ficobiline în condiții de iluminare continuă și un inhibitor în condiții de stres de iluminare. Cel mai pronunțat efect de inhibiție în condiții de stres se observă la trecerea culturii în faza staționară.

Condițiile de stres de iluminare duc la creșterea conținutului de glucide și lipide în biomasa de spirulină. Sub influența acetatului de zinc are loc o reducere a conținutului de lipide în condiții de stres pe durata fazei de creștere exponențială, iar la ziua a 7-a se observă din contra, o stimulare a acumulării de lipide și glucide.

În condiții de iluminare continuă acetatul de zinc este un stimulator al acumulării β - carotenului, în timp ce în condiții de stres de iluminare, acțiunea substanței este inversă, provocând reducerea cantității de pigment, în special la ziua 4-6.

Astfel, reducerea perioadei de lumina la 4 ore în zi constituie un stres pronunțat pentru cultura de spirulină. Efectul stresului se reflectă în reducerea cantității de biomasă și creșterea conținutului de lipide și glucide. Acetatul de zinc din stimulator al acumulării de ficobiline și β - caroten în condiții de iluminare continuă se transformă în inhibitor în condiții de stres de iluminare.

Bibliografie:

1. Amary E. et al. Structural and functional alterations of cyanobacterial phycobilisomes induced by high-light Stress. //Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics. 2012. 1817 (2): 319–327.
2. Boussiba S., Richmond A. C-phycoyanin as a storage protein in the blue-green alga *Spirulina platensis*. //Arch. Microbiol. 1980,125:143-147.
3. Christopher S. et al. Colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo-phospho-vanillin reaction. //American Journal of Clinical Pathology. 1970, 53(1): 89–91
4. Danesi E. D. G. et al. Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. //Biomass and Bioenergy. 2004, 26 (4): 329–35.

5. González-Fernández C., Mercedes B. Linking microalgae and cyanobacteria culture conditions and key-enzymes for carbohydrate accumulation. //Biotechnology Advances. 2012, Elsevier. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.07.003.
6. Lowry O., Rosebrough N., Farr A. Protein measurement with the Folin phenol reagent. //J. Biol. Chem. 1951, 193(1):265.
7. Nishiyama Y. et al. Protein synthesis is the primary target of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. //Physiologia Plantarum. 2011, Wiley //Blackwell (10.1111). doi:10.1111/j.1399-3054.2011.01457.x.
8. Osredkar J., Natasa S. Copper and zinc, biological role and significance of copper/zinc imbalance. //J Clin Toxicol. 2011, s3:1–18.
9. Pade N., Hagemann M. Salt acclimation of cyanobacteria and their application in biotechnology. //Life. 2015, 5 (1): 25–49.
10. Rantamaki S. et al. Oxygen produced by cyanobacteria in simulated archaean conditions partly oxidizes ferrous iron but mostly escapes—conclusions about early evolution. //Photosynthesis Research. 2016, 130 (1–3): 103–111.
11. Ravelonandro P. H. et al. Influence of light quality and intensity in the cultivation of *Spirulina platensis* from Toliara (Madagascar) in a closed system. //Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 2008, 83 (6): 842–848.
12. Rudic V. ș.a. Ficobiotehnologie-cercetări fundamentale și realizări practice. Chișinău, 2007. 365 p.
13. Rudic V. Tulpină de algă *Spirulina platensis*(Nordst) Geitl în calitate de sursă de substanțe biologice active. Brevet de invenție MD 4123. 29-02-2012
14. Singh S. C. et al. Role of lipids and fatty acids in stress tolerance in cyanobacteria. //Acta Protozoologica. 2002, 41: 297–308.
15. Soletto D. et al. Effects of carbon dioxide feeding rate and light intensity on the fed-batch pulse-feeding cultivation of *Spirulina platensis* in helical photobioreactor. //Biochemical Engineering Journal. 2008 39 (2): 369–375
16. Yemm E.W., Willis A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. //Biochem J. 1954, 57(3): 508–514.