

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej



Magda Furmaniak

**Jadalne cyjanobakterie z rodzaju *Arthrospira* - genetyka,
fizjologia i bezpieczeństwo stosowania jako produkt
pochodzenia naturalnego**

**Praca doktorska wykonana pod
kierunkiem dr hab. Krzysztofa Walerona
w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego**

Gdańsk 2018

*Chciałabym podziękować Małgorzacie i Krzysztofowi Waleron
za wsparcie merytoryczne i pomoc w realizacji badań.*

*Pracownikom Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej
za życzliwość i ciepłe przyjęcie w zespole.*

Moim rodzicom i siostrze, za wiarę we mnie i motywację do działania.

*Szczególnie dziękuję mojemu mężowi Mikołajowi,
bez Twojego nieopisanego wsparcia nie udało by mi się ukończyć tej pracy.*

Badania w ramach tej pracy doktorskiej były częścią czterech projektów bilateralnych:

1. Program naukowej i technicznej współpracy pomiędzy Rzeczpospolitą Polska i Walonia (Belgia) 2013-2014, 2014-2016, 2017-2019:

- ARTHRO-GEN: „Wykorzystanie technik Sekwencjonowania Nowej Generacji (NGS sequencing) w opracowaniu metod inżynierii genetycznej jadalnych cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira*” 2013-2014.
- ARTHRO-RNA „Analiza funkcjonalna genomu jadalnej sinicy z rodzaju *Arthrospira* pod kątem charakterystyki ekspresji elementów genetycznych istotnych dla transferu genów oraz odpowiedzi na stres środowiskowy” 2014-2016.
- ARTHROBIOME: „Różnorodność i funkcja mikrobiomu *Arthrospira* oraz jego wykorzystanie w komercyjnych hodowlach tej cyjanobakterii” 2017-2019.

2. Polsko – Flandryjski wspólny projekt badawczy w ramach porozumienia o współpracy naukowej między PAB i FWO na lata 2016-2018:

„Fizjologia, biologia komórki i biotechnologia jadalnych cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira*”.

Sekwencjonowanie genomów *Arthrospira* sfinansowane było w ramach:

Projektu sekwencjonowania genomów finansowanego przez ESF (European Science Foundation) w ramach warsztatów "Generation and Analysis of Next Generation Sequencing (NGS) Data" Uniwersytet w Gencie 2012, Lider: Dr Małgorzata Waleron - „How can genomes help us to design genetic engineering tools for *Arthrospira* strains (Cyanobacteria)?”,

oraz

z dotacji projakościowej finansowanej przez przez Ministerstwo Nauki i Edukacji Wyższej Rzeczpospolitej Polskiej (KNOW) 2012 – 2016 - dec. MNiSW-DS-6002-4693-23/WA/12.

SPIS TREŚCI

1.	CELE PRACY	1
2.	STRESZCZENIE	2
3.	STOSOWANE SKRÓTY	8
4.	WSTĘP	10
4.1.	Charakterystyka cyjanobakterii z rodzaju <i>Arthrospira</i>	10
4.1.1.	Ogólna charakterystyka cyjanobakterii	10
4.1.2.	Morfologia i ultrastruktura komórek <i>Arthrospira</i>	12
4.1.3.	Systematyka	13
4.1.4.	Genetyka rodzaju <i>Arthrospira</i>	14
4.1.4.1.	DNA genomowe oraz plazmidowe	14
4.1.4.2.	Genomy <i>Arthrospira</i>	15
4.1.4.3.	Filogenetyka	15
4.1.4.4.	Transkryptomika	17
4.1.5.	Występowanie i warunki hodowli	18
4.1.5.1.	Występowanie	18
4.1.5.2.	Optymalne warunki wzrostu	19
4.1.5.3.	Hodowla w warunkach laboratoryjnych	19
4.1.5.4.	Hodowla na skalę przemysłową	20
4.1.6.	Zastosowanie w biotechnologii i przemyśle	22
4.1.6.1.	Skład biochemiczny i właściwości odżywcze	22
4.1.6.2.	Właściwości terapeutyczne	24
4.1.6.3.	<i>Arthrospira</i> w opinii organizacji prozdrowotnych	26
4.1.6.4.	Projekt MELiSSA	26
4.1.6.5.	Inne zastosowania	27
4.2.	Bakteryjne systemy obrony przed egzogennym DNA	28
4.2.1.	Systemy restrykcyjno-modyfikacyjne	28
4.2.1.1.	Mechanizm działania systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych	29
4.2.1.2.	Klasyfikacja systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych	30
4.2.2.	Systemy CRISPR/Cas	31
4.2.2.1.	Struktura CRISPR/Cas	31
4.2.2.2.	Mechanizm działania CRISPR	33
4.2.2.3.	Klasyfikacja i nomenklatura	33
4.2.2.4.	Zastosowanie w biotechnologii	34
4.3.	<i>Arthrospira</i> jako produkt pochodzenia naturalnego	34
4.3.1.	Produkt leczniczy a suplement diety	35
4.4.	Probiotyki	36

4.5.	Rodzaj <i>Bacillus</i> i jego zastosowanie	37
4.5.1.	Ogólna charakterystyka rodzaju <i>Bacillus</i>	37
4.5.2.	<i>Bacillus</i> jako probiotyk	37
4.6.	Rodzaj <i>Halomonas</i> i jego zastosowanie	38
5.	MATERIAŁY	40
5.1.	Szczepy <i>Arthrospira</i>	40
5.2.	Suplementy diety zawierające biomasę <i>Arthrospira</i> wykorzystane w badaniach	41
5.3.	Referencyjne szczepy bakteryjne użyte w badaniach	41
5.4.	Podłoża mikrobiologiczne	41
5.4.1.	Pożywki do hodowli sinic	41
5.4.1.1.	Podłoża płynne	41
5.4.1.2.	Podłoża stałe	42
5.4.2.	Podłoża do izolacji i hodowli bakterii symbiotycznych z preparatów z biomasą <i>Arthrospira</i>	42
5.4.2.1.	Podłoża płynne	42
5.4.2.2.	Podłoża stałe	43
5.4.3.	Podłoża mikrobiologiczne wykorzystywane do hodowli bakterii i grzybów oraz testów biochemicznych	44
5.5.	Bufory i roztwory używane do izolacji DNA genomowego	48
5.6.	Testy i odczynniki wykorzystane do identyfikacji bakterii	49
5.7.	Odczynniki do barwienia metodą Grama	49
5.8.	Odczynniki wykorzystane do reakcji amplifikacji DNA	50
5.9.	Startery zaprojektowane do amplifikacji fragmentów genów	51
5.10.	Startery użyte do amplifikacji fragmentów genów	52
5.11.	Odczynniki do reakcji trawienia genomowego DNA <i>Arthrospira</i>	53
5.12.	Odczynniki do rozdzielania elektroforetycznego	53
5.13.	Odczynniki użyte w celu potwierdzenia obecności środków konserwujących w suplementach diety <i>Arthrospira</i>	54
5.14.	Odczynniki i podłoża użyte w badaniu właściwości przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych	55
5.15.	Używana aparatura	55
5.16.	Genomy użyte w analizach porównawczych <i>in silico</i>	55
6.	METODY	57
6.1.	Przygotowanie pożywek mikrobiologicznych	57
6.1.1.	Przygotowanie pożywki Zarrouk	57
6.1.2.	Przygotowanie ekstraktu z <i>Arthrospira</i>	57

6.2.	Izolacja bakterii symbiotycznych z preparatów komercyjnych z biomasą <i>Arthrospira</i> (Spirulina)	57
6.3.	Hodowla mikroorganizmów	58
6.3.1.	Hodowla cyjanobakterii z rodzaju <i>Arthrospira</i>	58
6.3.2.	Hodowla bakterii symbiotycznych <i>Arthrospira</i> wyizolowanych z suplementów diety Spirulina	58
6.3.3.	Hodowla referencyjnych szczepów bakterii i grzybów	59
6.4.	Izolacja genomowego DNA	59
6.4.1.	Izolacja genomowego DNA zmodyfikowaną metodą CTAB	59
6.5.	Analiza <i>in silico</i> genomów <i>Arthrospira</i>	60
6.5.1.	Sekwencjonowanie genomów <i>Arthrospira</i>	60
6.5.2.	Identyfikacja bakteryjnych systemów obronnych przed egzogennym DNA w genomach <i>Arthrospira</i>	62
6.5.2.1.	Identyfikacja systemów R-M typu I	62
6.5.2.2.	Identyfikacja systemów R-M typu II	62
6.5.2.3.	Identyfikacja systemów CRISPR/Cas	62
6.5.2.4.	Analiza odczytów sekwenatora w celu potwierdzenia wątpliwych wyników <i>in silico</i>	63
6.5.2.5.	Analiza porównawcza liczby loci CRISPR oraz obecności genów CRISPR/Cas u cyjanobakterii nitkowatych (<i>Oscillatoriales</i> – Subsection III)	63
6.5.2.6.	Analizy filogenetyczne	63
6.5.3.	Identyfikacja klastrów biosyntezy metabolitów wtórnych w genomach <i>Arthrospira</i>	64
6.5.4.	Identyfikacja sekwencji fagowych w genomach <i>Arthrospira</i>	64
6.6.	Eksperymentalne potwierdzenie obecności w genomach oraz funkcjonalności bakteryjnych systemów obrony przed obcym DNA	64
6.6.1.	Amplifikacja fragmentów genów z użyciem DNA <i>Arthrospira</i> jako matrycy w reakcji PCR	64
6.6.2.	Trawienie genomowego DNA <i>Arthrospira</i> enzymami restrykcyjnymi dostępnymi komercyjnie	65
6.7.	Amplifikacja fragmentów genów z użyciem DNA szczepów bakteryjnych wyizolowanych z suplementów diety <i>Arthrospira</i> oraz suchej biomasy jako matrycy w reakcji PCR	67
6.8.	Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym	67
6.8.1.	Rozdział elektroforetyczny genomowego DNA wyizolowanego z komórek <i>Arthrospira</i> , bakterii wyizolowanych z suplementów diety <i>Arthrospira</i> oraz z suchej biomasy <i>Arthrospira</i>	67
6.8.2.	Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji reakcji PCR	68
6.8.3.	Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji trawienia genomowego DNA enzymami restrykcyjnymi	68
6.9.	Analiza ekspresji genów R-M typu II oraz CRISPR/Cas w warunkach stresowych	69
6.10.	Badanie czystości mikrobiologicznej preparatów zawierających biomasę <i>Arthrospira</i>	70

6.10.1.	Określenie liczby CFU w 1 ml lub 1 g preparatu	70
6.10.2.	Wykrywanie obecności pałeczek <i>Escherichia coli</i> w preparacie	70
6.10.3.	Wykrywanie obecności pałeczek <i>Salmonella</i> w preparacie	71
6.10.4.	Wykrywanie obecności <i>Staphylococcus aureus</i> w preparacie	71
6.10.5.	Wykrywanie obecności bakterii Gram-ujemnych tolerujących żółć	71
6.10.6.	Identyfikacja gatunkowa bakterii, określonych jako zanieczyszczenie w badanych preparatach	71
6.10.6.1.	Test na obecność koagulazy	71
6.10.6.2.	Identyfikacja bakterii z rodzaju <i>Staphylococcus</i>	71
6.11.	Badanie obecności środków konserwujących w tabletkach z biomasą <i>Arthrospira</i> firmy Febico (Tajwan)	72
6.11.1.	Przygotowanie zawiesin roboczych	72
6.11.2.	Kontrola efektywności neutralizatora	73
6.11.3.	Ocena skuteczności zakonserwowania preparatu <i>Arthrospira</i>	73
6.12.	Badanie właściwości przeciwbakteryjnych oraz przeciwgrzybiczych ekstraktów wodnych i metanolowych z suchej biomasy <i>Arthrospira</i>	74
6.12.1.	Przygotowanie ekstraktów metanolowych z suchej biomasy <i>Arthrospira</i>	74
6.12.2.	Przygotowanie ekstraktów wodnych z suchej biomasy <i>Arthrospira</i>	74
6.12.3.	Badanie właściwości przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych biomasy <i>Arthrospira</i>	75
6.12.4.	Badanie właściwości bakteriobójczych	75
6.12.5.	Badanie właściwości przeciwgrzybiczych	75
6.13.	Charakterystyka i identyfikacja gatunkowa izolatów bakteryjnych z preparatów <i>Arthrospira</i>	76
6.13.1.	Charakterystyka morfologiczna	76
6.13.2.	Charakterystyka biochemiczna i fizjologiczna	76
6.13.3.	Sekwencjonowanie fragmentu 16S rRNA	77
6.13.4.	Analiza filogenetyczna	77
6.14.	Izolacja bakterii symbiotycznych z hodowli <i>Arthrospira</i> poddanych naświetlaniu promieniowaniem gamma	77
6.14.1.	Naświetlanie hodowli <i>Arthrospira</i> promieniowaniem gamma	77
6.14.2.	Izolacja bakterii symbiotycznych z hodowli <i>Arthrospira</i> poddanych irradacji	78
7.	WYNIKI	79
7.1.	Wyniki pomiaru absorbancji DNA genomowego wyizolowanego z komórek szczepów <i>Arthrospira</i>	79
7.2.	Analiza <i>in silico</i> genomów <i>Arthrospira</i>	80
7.2.1.	Sekwencjonowanie genomów <i>Arthrospira</i>	80
7.2.2.	Identyfikacja systemów R-M typu I w genomach <i>Arthrospira</i>	81

7.2.3.	Identyfikacja systemów R-M typu II w genomach <i>Arthrospira</i>	83
7.2.4.	Identyfikacja systemów CRISPR/Cas w genomach <i>Arthrospira</i>	87
7.2.4.1.	Określenie liczby loci CRISPR	87
7.2.4.2.	Identyfikacja genów związanych z systemami CRISPR/Cas	88
7.2.4.3.	Organizacja operonów CRISPR/Cas w genomach <i>Arthrospira</i> oraz określenie ich przynależności do poszczególnych typów	90
7.2.5.	Analiza porównawcza sekwencji genów CRISPR/Cas oraz liczby loci CRISPR u <i>Oscillatoriales</i> (Subsection III)	95
7.2.6.	Analiza filogenetyczna na podstawie sekwencji genów kodujących systemy RM oraz CRISPR/Cas	97
7.2.7.	Identyfikacja klastrów genów kodujących biosyntezę metabolitów wtórnych w genomach <i>Arthrospira</i>	99
7.2.8.	Identyfikacja regionów fagowych w genomach <i>Arthrospira</i>	101
7.3.	Identyfikacja regionów fagowych w genomach <i>Arthrospira</i>	103
7.4.	Amplifikacja regionów kodujących systemy RM oraz białek związanych z systemami CRISPR/Cas	104
7.5.	Eksperymentalne potwierdzenie funkcjonalności zidentyfikowanych metylotransferaz w komórkach <i>Arthrospira</i>	104
7.6.	Klasyfikacja szczepów <i>Arthrospira</i> stanowiących biomasę komercyjnych preparatów wyprodukowanych w Mongolii i Indiach	105
7.7.	Badanie czystości mikrobiologicznej preparatów zawierających biomasę <i>Arthrospira</i>	106
7.7.1.	Liczba CFU w 1 g preparatów z biomasą <i>Arthrospira</i>	106
7.7.2.	Określenie obecności poszczególnych bakterii w preparatach zawierających biomasę <i>Arthrospira</i>	107
7.7.3.	Identyfikacja bakterii z rodzaju <i>Staphylococcus</i>	107
7.8.	Badanie obecności środków konserwujących w tabletkach z biomasą <i>Arthrospira</i> firmy Febico (Tajwan)	108
7.8.1.	Ocena skuteczności zakonserwowania produktu	108
7.9.	Bakterie symbiotyczne wyizolowane z suchej i mokrej biomasy <i>Arthrospira</i>	110
7.9.1.	Charakterystyka i identyfikacja bakterii symbiotycznych wyizolowanych z suchej biomasy <i>Arthrospira</i> pochodzącej z preparatów Spirulina dostępnych na polskim rynku	110
7.9.2.	Analiza filogenetyczna szczepów wyizolowanych z suchej biomasy <i>Arthrospira</i>	111
7.9.3.	Bakterie symbiotyczne wyizolowane z mokrej biomasy <i>Arthrospira</i> poddanej działaniu promieniowania gamma	114
7.10.	Badanie właściwości przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych ekstraktów metanolowych i wodnych z suchej biomasy <i>Arthrospira</i>	115
7.10.1.	Ekstrakty metanolowe i wodne	116
7.10.2.	Właściwości przeciwbakteryjne ekstraktów z suchej biomasy <i>Arthrospira</i>	116

7.10.3.	Właściwości przeciwgrzybicze ekstraktów z suchej biomasy <i>Arthrospira</i>	116
8.	DYSKUSJA	117
9.	PODSUMOWANIE I WYNIKI KOŃCOWE	130
10.	BIBLIOGRAFIA	131
	<i>ANEKS 1</i>	149
	<i>ANEKS 2</i>	161
	<i>ANEKS 3</i>	182
	<i>ANEKS 4</i>	184
	<i>ANEKS 5</i>	187

1. CELE PRACY.

- Analiza genomów *Arthrospira* pod kątem identyfikacji i charakterystyki specyficznych struktur bakteryjnych systemów ochrony przed egzogennymi kwasami nukleinowymi – systemów restrykcyjno-modyfikacyjnymi (R-M) i systemów CRISPR/Cas.
- Analiza porównawcza i określenie stopnia konserwacji struktur systemów R-M i CRISPR/Cas *Arthrospira* na tle cyjanobakterii z rzędu *Oscillatoriales*.
- Potwierdzenie obecności zidentyfikowanych *in silico* genów potencjalnie kodujących systemy R-M i struktury CRISPR/Cas metodą PCR oraz określenie aktywności potencjalnych metylotransferaz metodą trawienia genomowego DNA wybranymi enzymami restrykcyjnymi.
- Analiza zmian ekspresji genów związanych z systemami obrony przed egzogennym DNA w komórkach szczepu *Arthrospira* sp. PCC 8005 poddanego działaniu promieniowania gamma.
- Badanie czystości mikrobiologicznej preparatów zawierających suszoną biomasę *Arthrospira* dostępnych na Polskim rynku zgodnie z standardami Farmakopei Polskiej X.
- Izolacja, identyfikacja i charakterystyka morfologiczna, biochemiczna i genetyczna szczepów bakterii ko-egzystujących z *Arthrospira*.
- Izolacja, identyfikacja i charakterystyka szczepów bakterii z hodowli *Arthrospira* poddanych działaniu promieniowania gamma.

2. STRESZCZENIE.

Cyjanobakterie z rodzaju *Arthrospira* to jadalne, fotosyntetyzujące i nitkowate mikroorganizmy, naturalnie występujące w alkalicznych zbiornikach w regionach tropikalnych i subtropikalnych. Uzyskanie i utrzymanie hodowli akсенicznych *Arthrospira* jest bardzo trudne, a w niektórych przypadkach wręcz niemożliwe. Dotychczasowy podział filogenetyczny rodzaju *Arthrospira* opiera się na różnicach w sekwencji 16S rRNA i wyodrębnia trzy klastry ITS: I, II i III.

Korzyści płynące ze spożywania biomasy *Arthrospira* znane były już antycznej cywilizacji Azteków, a do tej pory jest ona składnikiem tradycyjnej potrawy „dihé” spożywanej przez plemię Kanembu zamieszkującej okolice jeziora Czad.

Obecnie suszona biomasa *Arthrospira*, ze względu na szereg wartości odżywczych i terapeutycznych, wykazanych prze naukowców w ponad 50-letnim okresie badań nad tym organizmem, sprzedawana jest na całym świecie pod komercyjną nazwą „Spirulina”. Dodatkowo, cyjanobakterie z rodzaju *Arthrospira* znajdują zastosowanie w procesie bioremediacji, przy produkcji paliw alternatywnych oraz stanowią jeden z komponentów w sztucznym ekosystemie opracowywanym na potrzeby długotrwałych misji kosmicznych takich jak wyprawa na Marsa (Projekt MELiSSA).

Preparaty „Spirulina” dostępne zarówno na polskim jak i europejskim rynku sklasyfikowane są jako suplementy diety. Wymogi co do kontroli jakości i czystości suplementów nie są adekwatne, co może budzić zastrzeżenia co do bezpieczeństwa ich stosowania przez konsumentów.

Celem tej pracy była analiza genomiczna *Arthrospira* koncentrująca się na: identyfikacji i charakterystyce systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych (R-M), CRISPR/Cas, regionów fagowych oraz klastrów biosyntezy metabolitów wtórnych. Następnym krokiem było potwierdzenie eksperymentalnie obecności w chromosomie zidentyfikowanych *in silico* determinant genetycznych wybranych systemów R-M, genów *cas* oraz RAMP. Za cel postawiono również określenie aktywności scharakteryzowanych metylotransferaz.

W drugiej części pracy zaplanowano analizę czystości mikrobiologicznej siedmiu komercyjnych preparatów *Arthrospira* dostępnych w Polsce, a pochodzących z różnych regionów świata oraz badanie mikroorganizmów towarzyszących *Arthrospira* w hodowlach wielkoskalowych i laboratoryjnych. W tym celu wykonano izolację bakterii występujących w biomase *Arthrospira*, a następnie przeprowadzono ich charakterystykę biochemiczną i genetyczną.

W ramach niniejszej pracy zsekwencjonowano genomy pięciu szczepów *Arthrospira*, w tym szczepu wyizolowanego z syberyjskiego jeziora. Dzięki temu możliwe było wykonanie analiz genomicznych na genomach trzynastu szczepów *Arthrospira* reprezentujących wszystkie opisane dotychczas genotypy. W efekcie przeprowadzonych analiz genomicznych *Arthrospira* zidentyfikowano dziewięć kompletnych systemów R-M oraz dwie samotne metylotransferazy. Dodatkowo określono liczbę potwierdzonych i przypuszczalnych loci CRISPR (1-21) w puli genomów *Arthrospira* oraz w genomach cyjanobakterii z rzędu *Oscillatoriales* (Subsection III), dostępnych w publicznych bazach danych. Zidentyfikowano i scharakteryzowano geny związane z systemami CRISPR/Cas: *cas1.1*, *cas1.2*, *cas1.3*, *cas2.1*, *cas2.2*, *cmr4*, *cmr6*, *csm1*, *csm2*, *csm3*, *csm4*, *csm5*, *csx3* i *csx10*, a także określono ich obecność i orientację w poszczególnych genomach. Dodatkowo wykazano ich unikalność na tle rzędu *Oscillatoriales*.

Wykorzystując reakcje PCR potwierdzono obecność zidentyfikowanych *in silico* genów kodujących systemy R-M typu II (*AsuII*, *AvaI*, *SacII*, *NheI*, *HindIII*), *cas* (*cas1.1* i *cas2.1*) oraz genów kodujących białka RAMP (*cmr6*, *csm3*, *csm4*, *csm5*). Potwierdzona została również obecność i aktywność w komórkach *Arthrospira* wszystkich zidentyfikowanych *in silico* metylotransferaz. W pracy stwierdzono istotne zmiany w poziomach ekspresji genów analizowanych systemów R-M typu II oraz CRISPR/Cas w sekwencjach transkryptomów uzyskanych dla szczepu *Arthrospira* sp. PCC 8005 poddanego działaniu promieniowania gamma. Stwierdzono również, iż wszystkie genomy *Arthrospira* zawierają podobne regiony fagowe oraz klastry biosyntezy metabolitów wtórnych.

Wyniki przeprowadzonych analiz filogenomicznych pozwoliły na potwierdzenie dychotomii rodzaju *Arthrospira*, co wcześniej sugerowane było przez Baurain *et al.* (2002), w kontraście do obecnie stosowanego podziału jedynie na podstawie sekwencji ITS. Wyodrębnienie na podstawie przeprowadzonych badań dwóch kładów (I i II) potwierdza hipotezę o występowaniu zaledwie dwóch gatunków *Arthrospira* w naturze, w przeciwieństwie do około 20 gatunków zaproponowanych z pomocą analiz morfologicznych.

Kolejna część pracy dotyczyła badania czystości mikrobiologicznej komercyjnych preparatów *Arthrospira*. W efekcie prowadzonych prac wykazano przekroczenie norm czystości mikrobiologicznej ustalonych dla produktów leczniczych jak i żywności. Dodatkowo określono, iż w trakcie procesu obróbki technologicznej, ekstrakty metanolowe i wodne uzyskane z biomasy *Arthrospira* tracą zdolność hamowania wzrostu bakterii oraz grzybów.

W efekcie prowadzonych badań wyizolowano i scharakteryzowano 45 izolatów bakteryjnych z siedmiu preparatów *Arthrospira*. Analiza sekwencji 16S rRNA określiła przynależność 22 izolatów do rodzajów *Halomonas*, 11 do rodzaju *Bacillus*, 6 do rodzaju *Roseinatronobacter* oraz 1 do rodzaju *Rhodobaca*. W przypadku 6 izolatów określono podobieństwo do niehodowalnych bakterii. Ponadto wyizolowano również 46 izolatów bakteryjnych z hodowli *Arthrospira* poddanych działaniu promieniowania gamma w dawkach 900-5000 Gy.

Badanie czystości mikrobiologicznej siedmiu komercyjnych preparatów z suszoną biomasą *Arthrospira* potwierdza konieczność kontroli jakości suplementów diety, ze względu na bezpieczeństwo konsumentów. Dodatkowo, wyniki analizy metagenomu preparatów komercyjnych z suszoną biomasą *Arthrospira* obrazują jak bogate jest konsorcjum bakteryjne ko-egzystujące z tymi organizmami. Dane literaturowe sugerują, że rodzaje *Bacillus* i *Halomonas*, zidentyfikowane w konsorcjum utworzonym przez *Arthrospira* i towarzyszące mu bakterie heterotroficzne, mogą posiadać szereg właściwości prozdrowotnych oraz ochronnych. Może to sugerować, że za część właściwości *Arthrospira* odpowiadać mogą bakterie z nią ko-egzystujące, co powinno być obiektem dalszych badań.

ABSTRACT

Cyanobacteria from the genus *Arthrospira* are edible, photosynthetic, and filamentous microorganisms. Their natural occurrence is settled in alkaline tanks in tropical and subtropical regions of the world. Obtaining and sustaining axenic cultures of *Arthrospira* is very difficult, in some cases even impossible. Current phylogenetic division of *Arthrospira* genus is based on differences in 16S rRNA sequence and distinguishes three ITS clusters: I, II and III.

The beneficial effect of *Arthrospira* biomass consumption has been discovered by ancient Aztec civilization. Until now, *Arthrospira* biomass is a component of traditional dish called „dihé” consumed by Kanembu tribe, that inhabits Chad lake surroundings in Africa.

Nowadays, because of its nutritional effects dried *Arthrospira* biomass is being sold all over the world under commercial name ‘Spirulina’. Additionally, *Arthrospira* is being used in bioremediation and alternative fuel production, and is one of the component of artificial ecosystem maintained for long-time space expeditions on Mars (MELiSSA Project).

‘Spirulina’ products available on Polish and European market are classified as diet supplements. Quality and purity standards for this type of products are inadequate, what questions their consumption safety.

The prime aim of this study was genomic analysis of *Arthrospira*, focused on: identification and characteristics of restriction-modification systems (R-M), CRISPR/Cas systems, prophage regions and secondary metabolite biosynthesis clusters. Secondly, experimental confirmation of presence of *in silico* identified genetic determinants of R-M systems, *cas* and RAMP genes. One of the aims of this was also to evaluate identified methyltransferases activity in *Arthrospira* cells.

In the second part of this work, analysis of microbiological purity of seven commercial *Arthrospira* products available at Polish market, but originating from different parts of the world, and analysis of *Arthrospira* co-existing bacteria has been planned. To achieve that, isolation and biochemical and genetic characterization of bacteria present in *Arthrospira* biomass has been performed.

In this study, five genomes of *Arthrospira* species, including one from Siberian lake, has been sequenced. Due to genome sequencing, genomic analysis on thirteen *Arthrospira* species representing all known genotypes was possible. As a result of performed genomic analyses of *Arthrospira* genus, nine complete R-M systems and two solitary methyltransferases have been identified. Additionally, number of confirmed and questionable CRISPR loci (1-21)

in *Arthrospira* and publicly available *Oscillatoriales* (Subsection III) genomes has been evaluated. Genes associated with CRISPR/Cas systems (*cas1.1*, *cas1.2*, *cas1.3*, *cas2.1*, *cas2.2*, *cmr4*, *cmr6*, *csm1*, *csm2*, *csm3*, *csm4*, *csm5*, *csx3*, and *csx10*) have been identified, characterized, and their presence and orientation in *Arthrospira* genomes have been established. Additionally, their uniqueness within the *Oscillatoriales* order have been shown.

With the use of PCR reactions, presence of *in silico* identified genes encoding type II R-M systems (*AsuII*, *AvaI*, *SacII*, *NheI*, *HindIII*), *cas* genes (*cas1.1* and *cas 2.1*), and genes encoding RAMP proteins (*cmr6*, *csm3*, *csm4*, *csm5*) have been confirmed. Experiments performed in this study also proved the activity of identified methyltransferases in *Arthrospira* cells. What is more, compelling expression fold changes of analysed R-M and CRISPR/Cas systems genes in transcriptome sequences from *Arthrospira* sp. PCC 8005 cells treated with gamma-irradiation have been shown. It has also been settled that, all *Arthrospira* genomes contain similar prophage regions and secondary metabolite biosynthesis clusters.

Obtained genomic analyses results allowed to confirm *Arthrospira* genus dichotomy, what has been earlier suggested by Baurain *et al.* (2002), in contrast to currently used diversification based on ITS sequence only. Based on performed analyses distinction of two clades (I and II) might suggest occurrence of rather only two *Arthrospira* species in nature than almost 20 species proposed on the basis of earlier morphological analyses.

In the second part of this study, microbiological purity of seven commercial *Arthrospira* products have been examined. Analyses showed, that majority of the products do not comply purity standards for therapeutic products and food. Additionally, the results suggested that probably due to technological processing, methanol and water extracts from *Arthrospira* dry biomass lose their antibacterial and antifungal properties.

As a result of conducted studies, 45 bacterial isolates from seven *Arthrospira* commercial products have been isolated and characterized. The 16S rRNA sequence analysis revealed that 22 isolates belong to *Halomonas* genus, 11 to *Bacillus* genus, 6 to *Roseinatronobacter* and 1 to *Rhodobaca* genus. 6 isolate's 16S rRNA sequence show highest similarity to uncultured bacteria. What is more, 46 isolates from *Arthrospira* cultures that underwent gamma-irradiation in 900-5000 Gy doses have been isolated.

The microbiological purity assay of seven commercial, dried biomass *Arthrospira* products confirmed the need for more rigorous quality control of diet supplements, due to consumer's safety. Additionally, metagenome analysis of commercial *Arthrospira* products reveal richness of bacterial consortium that consists of *Arthrospira* cells and co-existing

heterotrophic bacteria that might possess therapeutic and protective properties. Obtained results might suggest that for some *Arthrospira* attributes are responsible the co-existing bacteria, what should be an object of further studies.

3. STOSOWANE SKRÓTY.

ACP	białkowy nośnik grup acylowych (ang. <i>Acyl Carrier Protein</i>)
ANI	średnia identyczność nukleotydowa (ang. <i>Average Nucleotide Identity</i>)
ARDRA	analiza restrykcyjna amplifikowanych fragmentów DNA rybosomalnego (ang. <i>Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis</i>)
BSA	albumina krwi bydlęcej (ang. <i>Bovine Serum Albumin</i>).
Ca-SP	spirulan wapnia (ang. <i>Calcium Spirulan</i>)
CAS	geny związane z systemami CRISPR (ang. <i>CRISPR-associated genes</i>)
CFU	jednostki tworzące kolonie (ang. <i>Colony Forming Units</i>)
CRISPR	bakteryjny system obrony przed egzogennym DNA (ang. <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>)
Dam	adeninowa metylaza DNA (ang. <i>DNA adenine methylase</i>)
Dcm	cytozynowa metylaza DNA (ang. <i>DNA cytosine methylase</i>)
DR	sekwencje bezpośrednio powtarzalne (ang. <i>Direct Repeats</i>)
EDTA	kwas etylenodwuaminocztworowy
ESA	Europejska Agencja Kosmiczna (ang. <i>European Space Agency</i>)
FAO	Agencja ds. Żywności i Agrokultury Zjednoczonych Narodów (ang. <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
FDA	Agencja Żywności i Leków (ang. <i>Food and Drug Administration</i>)
GLA	kwas gamma-linolenowy (ang. <i>Gamma Linolenic Acid</i>)
GRAS	powszechnie uznawane za bezpieczne (ang. <i>Generally Recognized As Safe</i>)
Gy	jednostka miary promieniowania jonizującego (ang. <i>Gray</i>)
ITS	region pomiędzy genami 16S rRNA i 23S rRNA (ang. <i>Internal Transcribed Spacer</i>)
MELiSSA	Mikro-ekologiczny, alternatywny, system podtrzymywania życia (ang. <i>Micro-Ecological Life Support System Alternative</i>)
MGE	ruchome elementy genetyczne (ang. <i>Mobile Genetic Elements</i>)
M-L	maksymalne podobieństwo (ang. <i>Maximum-Likelihood</i>)
MLSA	analiza co najmniej kilku genów metabolizmu podstawowego (ang. <i>Multilocus Sequence Analysis</i>)
Mpz	mega par zasad (azotowych), 1 000 000 pz
NGS	Sekwencjonowanie Nowej Generacji (ang. <i>New Generation Sequencing</i>)
LAB	bakterie kwasu mlekowego (ang. <i>Lactic Acid Bacteria</i>)
ORF	otwarta ramka odczytu (ang. <i>Open Reading Frames</i>)
OTU	najmniejsza jednostka taksonomiczna (ang. <i>Operational Taxonomic Unit</i>)

PAM	ang. <i>Protospacer Adjacent Motifs</i>
PCC	Kolekcja Kultur Cyjanobakterii w Instytucie Pasteura (ang. <i>Pasteur Culture Collection</i>)
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy DNA (ang. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pZ	par zasad (azotowych)
qRT-PCR	ang. <i>quantitative reverse-transcriptase real-time PCR</i>
RFLP	polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang. <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
RIP	regulowana proteoliza międzybłonowa (ang. <i>Regulated Intramembrane Proteolysis</i>)
RiPP	syntetyzowane rybosomalnie i modyfikowane post-translacyjnie peptydy (ang. <i>Ribosomally synthesized and Post-translationally modified Peptides</i>)
R-M	system restrykcyjno-modyfikacyjny (ang. <i>Restriction-Modification</i>)
rpm	obroty na minutę (ang. <i>revolutions per minute</i>)
RpoS	czynn timer sigma odpowiedzi na stres (ang. <i>RNA polymerase sigma factor</i>)
ssDNA	forma jednoniciowa DNA (ang. <i>single-stranded DNA</i>)
TAMC	ogólna liczba drobnoustrojów tlenowych (ang. <i>Total Aerobic Microbial Count</i>)
SSR	krótkie powtórzenia sekwencji (ang. <i>Short Sequence Repeat</i>)
USP	Farmakopea Stanów Zjednoczonych (ang. <i>United States Pharmacopeia</i>)
UV-B	promieniowanie ultrafioletowe B
UV-C	promieniowanie ultrafioletowe C
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (ang. <i>World Health Organization</i>)

4. WSTĘP.

4.1. Charakterystyka cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira*.

4.1.1. Ogólna charakterystyka cyjanobakterii.

Cyjanobakterie, potocznie nazywane sinicami, to organizmy zdolne do przeprowadzania fotosyntezy oksygenowej oraz syntetyzujące chlorofil *a*. Zielono-niebieskie zabarwienie komórek jest spowodowane obecnością barwników – chlorofilu oraz fikocyjaniny, stąd pochodzi potoczna angielska nazwa cyjanobakterii *blue-green algae*.

Sinice to najbardziej rozpowszechniona grupa fotoautotrofów na ziemi, a przy tym najbardziej zróżnicowana. Cyjanobakterie mają długą historię ewolucji. Naukowcy szacują ich pojawienie się na ziemi na około 3,5 miliona lat temu, o czym świadczą skamieliny znalezione między innymi w zachodniej Australii (Whitton & Potts, 2000). Teoria endosymbiozy natomiast zakłada, że w wyniku wchłonięcia komórki cyjanobakteryjnej do komórki eukariotycznej powstał plastyd, którego funkcją jest przeprowadzanie fotosyntezy w komórkach roślinnych (Raven & Allen, 2003).

Cyjanobakterie pod względem morfologicznym można podzielić na jednokomórkowe oraz nitkowate (ang. *filamentous*). Jednokomórkowe sinice występują jako pojedyncze komórki oraz jako agregaty pokryte warstwą śluzu lub otoczką. Natomiast cyjanobakterie nitkowate mogą tworzyć charakterystyczne łańcuchy komórkowe ułożone w jednym lub wielu rzędach oraz tzw. trichomy. Trichomy to postacie, w których komórki cyjanobakterii oddzieloną są między sobą cienkimi przegrodami, a całość otoczona jest wspólną ścianą komórkową. Filament to trichom pokryty śluzową otoczką (pochewką) (Castenholz & Waterbury, 1989). Cyjanobakterie posiadają również wyspecjalizowane komórki zwane heterocytami, które odpowiadają za wiązanie azotu atmosferycznego ze środowiska. Powstają one przy niedoborze azotu w środowisku, a za proces wiązania azotu odpowiedzialny jest enzym – nitrogenaza (Schlegel *et al.*, 2000). Aktywność nitrogenaz jest uwarunkowana obecnością tlenu – tlen działa hamująco na jej biosyntezę oraz wpływa na jej strukturę (Estevez-Ferreira *et al.*, 2017). Do wiązania azotu zdolne są wszystkie cyjanobakterie nitkowate za wyjątkiem rzędu *Oscillatoriales*. W warunkach braku substancji odżywczych w otoczeniu, z komórek wegetatywnych powstają wyspecjalizowane komórki zwane akinetami (inaczej spory spoczynkowe), które wypełnione są substancjami zapasowymi (między innymi glikogenem i lipidami) (Castenholz & Waterbury, 1989). Wegetatywne rozmnażanie cyjanobakterii możliwe jest dzięki komórkom o nazwie hormogonia, które są również zdolne do poruszania się (Whitton & Potts, 2000).

Cyjanobakterie to to bakterie Gram-ujemne, których ściana komórkowa składa się z błony zewnętrznej oraz peptydoglikanu. Grubość ściany komórkowej waha się od 1 do nawet 200 nm, a niektóre rodzaje cyjanobakterii nie posiadają jej wcale (Halfen & Castenholz, 1971).

Cyjanobakterie to bardzo zróżnicowana klasa organizmów ze względu na zapotrzebowanie na tlen, optymalne natężenie światła, tolerancje H_2S w środowisku, optymalną temperaturę wzrostu, wrażliwość na promieniowanie UV-B oraz UV-C, dostępność mikro i makroelementów, tolerancji zasolenia, optymalnego pH, zdolności do wiązania azotu cząsteczkowego, tworzenia heterocyst i innych. Za poszczególne cechy odpowiadają wyspecjalizowane elementy komórkowe oraz produkowane enzymy (Whitton & Potts, 2000).

Sinice ze względu na swój pionierski charakter charakteryzują się wysoką tolerancją na czynniki środowiskowe co pozwala im na przetrwanie w ekstremalnych warunkach. Spotyka się je w tropikalnych regionach Afryki jak i na Antarktydzie. Zazwyczaj występują w środowisku wodnym, zarówno w wodach słodkich jak i słonych, ale mogą również bytować na skałach oraz w glebie (Miklaszewska *et al.*, 2008).

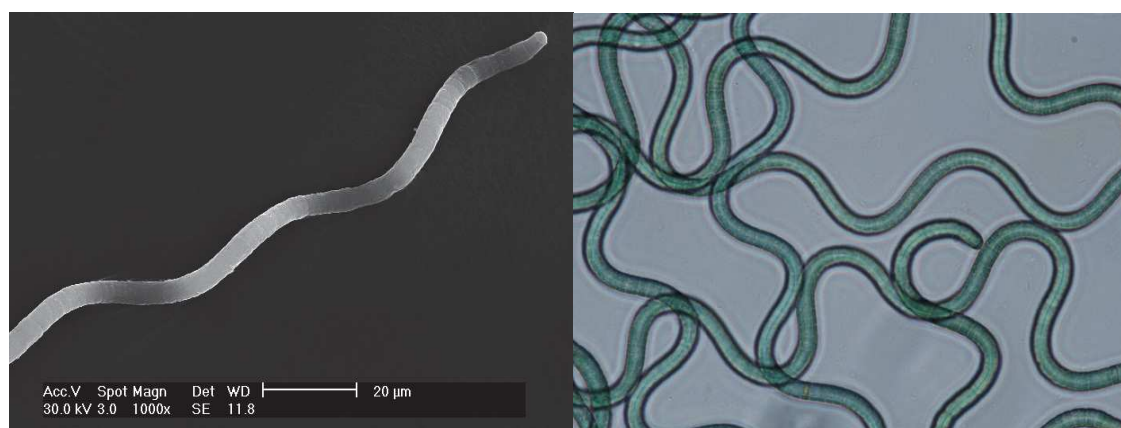
Negatywne skojarzenia z sinicami związane są z masowymi zakwitami gatunków zdolnych do wytwarzania różnego rodzaju toksyn na zbiornikach wodnych uniemożliwiające np. kąpiele w morzu latem. Do toksyn produkowanych przez cyjanobakterie niebezpiecznych dla ludzi oraz zwierząt hodowlanych należą między innymi: mikrocystyny, anatoksyny, nodularyny, saksitoksyny, cylindrospermopsyny, które mają działanie hepato-, cyto- i neurotoksyczne (Cheung *et al.*, 2012).

Mimo, iż wiele gatunków cyjanobakterii produkuje toksyny i może wpływać niekorzystnie na zdrowie ludzi, szereg innych właściwości sinic jest wykorzystywany w przemyśle biotechnologicznym. Przede wszystkim, cyjanobakterie są bogatym źródłem substancji bioaktywnych, które wykazują właściwości przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze oraz antynowotworowe. Obecnie opracowano różne technologie do produkcji metabolitów wtórnych z sinic, takich jak: witaminy, enzymy, toksyny, farmaceutyki oraz egzopolisacharydy, a niektóre z nich mogą służyć jako pożywienie. Dodatkowo, niektóre szczepy cyjanobakterii są zdolne do akumulacji polihydroksyalkanianów (PHA) – biodegradowalnych polimerów, będących alternatywą dla plastików nie ulegających rozkładowi. Zaobserwowano również obecność konsorcjów cyjanobakteryjnych w regionach zanieczyszczonych ropą naftową. Owe konsorcja są zdolne do niwelowania zanieczyszczeń ropopochodnych, poprzez zaopatrywanie bakterii rozkładających ropę w tlen, azot oraz

niezbędne składniki organiczne. Obecnie skomercjalizowano również technologię otrzymywania wodoru z cyjanobakterii jako źródło alternatywnej energii (Abed *et al.*, 2008).

4.1.2. Morfologia i ultrastruktura komórek *Arthrospira*.

Cyjanobakterie z rodzaju *Arthrospira* należą do sinic nitkowatych i cechuje je charakterystyczna organizacja wielokomórkowego cylindrycznego trychomu w otwartej, lewo- i prawoskrętnej helisie na całej długości. W mikroskopii świetlnej można zaobserwować pojedyncze, wolno pływające i zdolne do ruchu filamenty (*ang. gliding motility*). *Arthrospira* nie ma heterocytów, a filamenty są zbudowane z komórek wegetatywnych oddzielonych cienkimi przegrodami, które występują co 2-3 μm . Trichomy pokryte są pochwą i posiadają delikatne zwężenia w miejscu przegród między komórkami wegetatywnymi. Wierzchołki trychomu (tzw. czapeczka) mogą być delikatnie wysmuklone, zaokrąglone lub szpiczaste. Szerokość trychomu *Arthrospira* waha się między 6 a 12 μm , skok helisy między 12 a 72 μm , natomiast średnica helisy między 30 a 70 μm (Tomaselli *et al.*, 1997).



Fotografia 1. Po lewej zdjęcie z skaningowego mikroskopu elektronowego filamentu szczepu *Arthrospira* sp. PCC 9901, powiększenie 1000x; po prawej zdjęcie filamentów *Arthrospira* sp. PCC 9001 z mikroskopu świetlnego, powiększenie 400x.

Warunki środowiskowe są niezwykle ważnym czynnikiem wpływającym na geometrię helisy. Po wpływie warunków środowiskowych filamenty mogą przejść z formy helikalnej do prostej. Początkowe obserwacje sugerowały, iż utracenie morfologicznej struktury helikalnej na rzecz prostej, jest formą degeneracji i ponowna rewertacja do formy helikalnej nie jest możliwa (Tomaselli *et al.*, 1997). Inne badania wykazywały również, że filamenty przechodzą do formy helikalnej jako swoista obrona przed niesprzyjającymi warunkami środowiskowymi (np. zbyt dużym natężeniem światła). Późniejsze badania

wykazały, że przejście z formy prostej do helikalnej jest możliwe i zachodzi spontanicznie (Wang & Zhao, 2005).

Jako organizmy prokariotyczne, *Arthrospira* posiada budowę bakteryjną pod względem ultrastruktury. Śluzowa otoczka (pochewka) ma strukturę włóknisto-siatkową i grubość około 0,5 μm , składa się z wielocukrów. Ściana komórkowa jest zbudowana z czterech warstw. Równoległe do osi trychomu układa się najbardziej zewnętrzna warstwa ściany komórkowej (warstwa czwarta), będąca analogiem błony zewnętrznej. Białkowe włókna tworzą warstwę trzecią, a warstwę drugą stanowi peptydoglikan. Peptydoglikan wraz z warstwą pierwszą (fibrylarną) tworzą przegrodę oddzielającą poszczególne komórki od siebie.

W komórkach *Arthrospira* znajdują się również fikobilisomy, agregaty fikobiliprotein, które przylegają do ułożonych w koncentryczne zwoje tylakoidów. Fikobiliproteiny u *Arthrospira* to fikocyjanina oraz allofikocyjanina, a ich funkcją jest absorpcja energii fal świetlnych, które nie zostały pochłonięte przez inne barwniki (Padyana *et al.*, 2001).

Podobnie jak u innych wodnych organizmów prokariotycznych, w komórkach *Arthrospira* znajdują się wakuole gazowe, które zapewniają im pływalność. Wakuole gazowe są rozproszone w komórkach *Arthrospira*, a zbudowane są z walcowatych pęcherzyków gazowych zakończonych stożkami. Występowanie wakuol gazowych jest uwarunkowane warunkami hodowli, w wyniku mutacji może być również utracone (Castenholz *et al.*, 2001). Dwa główne białka wakuol gazowych to GvpA oraz GvpC, którego cechą charakterystyczną jest konserwowany motyw reszty 33 aminokwasowej tworzącej powtórzenia tandemowe (Walsby, 1994). W swoich badaniach Miklaszewska *et al.* (2012) zaproponowała strukturę operonu *gvp*: *gvpA1-gvpC1-gvpA2-gvpC2-gvpA3-gvpC3-gvpN*, która została określona w pięciu szczepach *Arthrospira*.

Ponadto w komórkach *Arthrospira* mogą występować ziarna cyjanoficyny, ciała poliglukanu, ciała cylindryczne, karboksosomy, mezosomy oraz poli- β -hydroksymaślan. Warto podkreślić również duży wpływ warunków środowiskowych na występowanie organelli i inkluzji komórkowych u *Arthrospira* (Van Eykelenburg, 1980).

4.1.3. Systematyka.

Ze względu na zdolność do przeprowadzania fotosyntezy, cyjanobakterie zaliczane były do glonów. Dopiero w latach 60-tych XX wieku zaproponowano przeklasyfikowanie i zaliczenie ich do *Procaryota*. Stainer (1977) oraz Gibbons&Murray (1978) zaproponowali,

aby nomenklaturę cyjanobakterii wzorować na Międzynarodowym Kodzie Nomenklaturowym Bakterii (ICNB) co do tej pory wywołuje dyskusje wśród fykologów.

Początkowo taksonomia *Arthrospira* opierała się na analizie cech morfologicznych, a także ekologii i pochodzeniu geograficznym poszczególnych szczepów. Gatunki opisywano za pomocą Międzynarodowego Kodu Nomenklaturowego dla alg, grzybów i roślin (ang. *International Nomenclature Code*, ICN). W swoich badaniach Komarek (1990) opisał 38 gatunków *Arthrospira* na podstawie ich morfologii, jednak taki opis może być mylący i nieprecyzyjny, ponieważ czynniki fizyczne jak i chemiczne mogą mieć wpływ na morfologię komórek *Arthrospira* (Jeeji Bai and Seshadri, 1980; Jeeji Bai 1985; Muhling *et al.*, 2006). Do tej pory ani rodzaj *Arthrospira* ani żaden jego reprezentant nie zostały opisane zgodnie z zasadami Międzynarodowego Kodu Nomenklaturowego Prokariotów (ang. *International Code of Nomenclature of Prokaryotes*, ICNP). Bergey's Manual of Bacteriology 2001, który przedstawia obszerny klucz do identyfikacji bakterii, określa tylko przynależność *Arthrospira* do *Cyanobacteria/SubsectionIII/Incertae Sedis* z uwzględnieniem jednego szczepu referencyjnego – *Arthrospira platensis* PCC 7345. Obecna systematyka *Arthrospira* przedstawiona jest następująco: Domena: *Bacteria*, Gromada X: *Cyanobacteria*, Klasa I: *Cyanobacteria/SubsectionIII/Incertae Sedis* (Castenholz *et al.*, 2015).

4.1.4. Genetyka rodzaju *Arthrospira*.

4.1.4.1. DNA genomowe oraz plazmidowe.

Genom *Arthrospira* jest zorganizowany w pojedynczy, kolisty chromosom, a komórki zawierają od 0.6 do 1% DNA w suchej biomacie. Wartość ta jest zdecydowanie niższa od średniej zawartości DNA w suchej masie u innych bakterii i drożdży, która waha się między 4 a 10%. Niska zawartość DNA w komórce skutkuje mało wydajną ekstrakcją tego kwasu, ale jest korzystna ze względu na jadalny charakter *Arthrospira*. Biomasa *Arthrospira* zawiera również wysoką zawartość polisacharydów i polifenoli, które dodatkowo utrudniają ekstrakcję kwasów nukleinowych z komórek (De Philipis and Vicenzini, 1998; Morin *et al.* 2010b). W roku 1993 Song *et al.* opublikowali pracę, w której opisują izolację plazmidu z komórek *Arthrospira*. Do tej pory jest to jedyna praca wykazująca obecność plazmidu u *Arthrospira*. Wyniki tej pracy nie zostały jednak potwierdzone przez żadną inną grupę badawczą, dlatego zakłada się, iż *Arthrospira* nie posiadają DNA plazmidowego.

4.1.4.2. Genomy *Arthrospira*.

Do grudnia 2018 zsekwencjonowano oraz opublikowano osiem genomów *Arthrospira*: *Arthrospira* sp. PCC 8005 (ADDH000000000), *Arthrospira platensis* NIES-39 (AP011615), *Arthrospira platensis* C1 (AFXD000000000), *Arthrospira maxima* CS-328 (ABYK000000000.1), *Arthrospira platensis* str. Paraca (ACSK000000000), *Arthrospira platensis* YZ (CP013008), *Arthrospira* sp. TJSD091 (LAYT000000000) oraz *Arthrospira* sp. TJSD092 (CP028914) (Fujisawa *et al.*, 2010; Janssen *et al.* 2010; Carrieri *et al.*, 2011; Cheevadhanarak *et al.*, 2012; Lefort *et al.*, 2014; Dong *et al.*, 2015). Wielkość genomu *Arthrospira* waha się między 4,9 a 6,8 Mbp. Analizy genomowe wykazały dużą zawartość (~20%) sekwencji repetytywnych w genomach *Arthrospira*, między innymi: intronów grupy II, sekwencji fago-podobnych, elementów insercyjnych oraz CRISPR (ang. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Dodatkowo wykazano dużą ilość determinant genetycznych systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych (R-M), które wraz z systemami CRISPR/Cas stanowią skuteczną barierę dla efektywnej transformacji komórek *Arthrospira* (Fujisawa *et al.*, 2010; Janssen *et al.* 2010; Cheevadhanarak *et al.*, 2012; Lefort *et al.*, 2014). Zhao *et al.* (2006) zidentyfikował trzydzieści genów potencjalnie kodujących systemy R-M (głównie typu I) oraz określił profile ekspresji genów metylotransferaz z użyciem techniki RT-PCR u „*Spirulina*” (*Arthrospira*). System R-M *ApII* został zidentyfikowany w genomie *Arthrospira platensis* NIES-39, który wykazuje aktywność endonukleolityczną specyficzną dla sekwencji 5'-CTGCAG-3', oraz którego prototypem jest enzym *PstI* (Shiraishi & Tabuse, 2013).

4.1.4.3. Filogenetyka.

W pierwszych badaniach taksonomicznych opartych na morfologii z 1932 roku *Arthrospira* i *Spirulina* zostały połączone we wspólny rodzaj – *Spirulina* (Geitler, 1932). Nazwa *Spirulina* została wybrana ze względu na to, iż organizmy z tej grupy zostały opisane kilka lat wcześniej niż *Arthrospira* (Vonshak, 1997). Późniejsze badania wykazały, że *Arthrospira* i *Spirulina* to dwa odrębne rodzaje i różnią się pod względem genetycznym, ultrastruktury, a także chemotaksonomicznym (Herdman *et al.*, 1979; Gugliemi *et al.*, 1993; Nelissen *et al.*, 1994; Cohen & Vonshak, 1991).

W badaniu przeprowadzonym przez Manen i Falquet (2002) wykazano, że najbliższym spokrewnionym z rodzajem *Arthrospira* jest rodzaj *Planktothrix*, a co ważniejsze, że nie jest on spokrewniony z rodzajem *Spirulina*. W 2013 roku Shih *et al.* przedstawili wyniki analiz genomowych, w których najbliższym spokrewnionym z *Arthrospira* okazał się rodzaj *Lyngbya*, jednak należy zaznaczyć, że *Planktothrix* nie był uwzględniony w analizie. Pomimo

przedstawianych dowodów naukowych, iż *Arthrospira* i *Spirulina* to dwa odrębne rodzaje, nazwy te są wciąż stosowane wymiennie. Powodem jest fakt, że komercyjne produkty zawierające biomasę *Arthrospira* są sprzedawane pod nazwą „Spirulina”. W piśmiennictwie naukowym stosowanie obydwu nazw zamiennie wciąż jest problemem.

Ścisłe podobieństwo w morfologii filamentów oraz genetyczna jednorodność nie ułatwiają taksonomii *Arthrospira*. Jak już wspomniano wyżej, zaobserwowano spontaniczne zmiany w średnicy i orientacji trichomów pod wpływem warunków środowiskowych, co może utrudniać identyfikację gatunkową *Arthrospira* (Desikachary & Jeeji Bai, 1996; Muhling *et al.*, 2005; Wang & Zhao 2005).

Do niedawna taksonomia molekularna opierała się głównie na analizie fragmentu genu kodującego mniejszą podjednostkę rybosomalną (16S rRNA). Jednak obecnie, zaleca się stosowanie analiz genomicznych, takich jak hybrydyzacja DNA-DNA wykonana *in silico* dla sekwencji genomów i średnia identyczność nukleotydowa (ang. *Average Nucleotide Identity*, ANI) lub co najmniej kilku genów metabolizmu podstawowego, czyli analiza MLSA (ang. *Multilocus Sequence Analysis*).

W przypadku niezwykle homogennego rodzaju *Arthrospira* gen kodujący 16S rRNA okazał się zbyt konserwowany ewolucyjnie, gdyż wykazuje on podobieństwo na poziomie 99,7% pomiędzy szczepami (Scheldeman *et al.*, 1999). Znacznie większa zmienność występuje w sekwencjach obszaru niekodującego w operonie rybosomalnym ITS (Internal Transcribed Spacer), dlatego też jest powszechnie wykorzystywany do badania zróżnicowania genetycznego blisko spokrewnionych szczepów bakterii takich jak *Arthrospira*. Jest to niefunkcjonalny region, zlokalizowany między strukturalnymi genami 16S rRNA i 23S rRNA kodującymi odpowiednio mniejszą i większą podjednostkę rybosomalną. Dodatkowo jest łatwy w amplifikacji, ze względu na obecność kilku kopii operonu rRNA w genomie (Boyer *et al.*, 2001; Taton *et al.*, 2003). W oparciu o analizę sekwencji ITS oraz ARDRA (analiza restrykcyjna amplifikowanych fragmentów DNA rybosomalnego, ang. *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*), 54 szczepy *Arthrospira*, pochodzące z czterech kontynentów, zostały podzielone na dwa klastry (I, II) oraz pięć subklastrów (I.A, I.B, II.A, II.B, II.A/II.B) (Scheldeman *et al.*, 1999; Baurain *et al.*, 2002). Dodatkowo opracowano specyficzne startery umożliwiające klasyfikację szczepów *Arthrospira* do poszczególnych klastrów. W 2013 roku Comte *et al.* opisała kolejny wariant ITS dla *Arthrospira*, określony jako klaster III.

Poza regionem ITS, w badaniach filogenetycznych *Arthrospira* wykorzystywany jest również wysoce zmienny region w operonie c-fikocyjaniny, składający się z międzygenowego regionu (IGS) oraz fragmentów sąsiadujących genów *cpcB* oraz *cpcA*

(*cpcBA*-IGS). W 2002 roku Manen i Falquet, na podstawie analizy sekwencji *cpcBA* dwudziestu trzech szczepów *Arthrospira*, wyodrębnili tylko dwa warianty w tym locus. Należy jednak podkreślić, że część szczepów pokrywała się ze sobą, a zgodność pomiędzy liniami genetycznymi na podstawie różnych markerów nie mogła zostać określona. Dadheech *et al.* (2010) w swoich badaniach wykorzystali zarówno sekwencje *cpcBA*-IGS jak i ITS w analizie trzydziestu jeden nowo zidentyfikowanych szczepów *Arthrospira* pochodzących z Afryki, Indii oraz Północnej Ameryki. Szczepy te poddano analizie porównawczej z użyciem pięćdziesięciu czterech znanych szczepów *Arthrospira* badanych przez inne grupy. Analizy filogenetyczne zestawiono z danymi morfologicznymi i w wyniku analizy wielofazowej wydzielono dwa klastry. Obserwacje te pozostają w zgodzie z doniesieniami Baurain *et al.* (2002) oraz Manen i Falquet (1999). Dodatkowo autorzy zaobserwowali zależność pomiędzy pochodzeniem geograficznym danego szczepu a jego przynależnością do jednego z dwóch klastrow. Szczepy pochodzące z Ameryki Południowej i Północnej (Meksyk, USA, Peru), grupowały się razem i tworzyły klaster I, natomiast szczepy należące do klastra II pochodziły z Afryki i Azji (Czad, Kenia, Chiny, Indie) (Dadheech *et al.*, 2010).

Grupa badawcza dr hab. Krzysztofa Walerona przeprowadziła szereg analiz w celu scharakteryzowania genetycznego 31 szczepów *Arthrospira*, sześciu prób środowiskowych oraz czterech prób pochodzących z komercyjnych upraw *Arthrospira*, w których uczestniczyłam w czasie studiów doktoranckich (wyniki nieopublikowane). W badaniach zastosowano analizę MLSA (ang. *Multilocus Sequence Analysis*), z użyciem sekwencji siedmiu markerów molekularnych: locus *gyrB*, klastra genów kodujących wakuole gazowe (*gvpA*, *gvpC*), niekodującego regionu międzygenowego operonu fikocyjaniny (*cpcBA*, *cpcAH*) oraz operonu cyklu dobowego (*kaiBA*, *kaiBC*). Analiza z użyciem wielu markerów genetycznych wykazała, że wydzielony przez Comte *et al.* (2013) klaster ITS III, na poziomie genetycznym jest bardzo zbliżony do klastra ITS I. Wyniki były spójne z tym co zaproponowali wcześniej Baurain *et al.* (2002), że rodzaj *Arthrospira* podzielony jest na dwa kłady (I i II) z wydzielonymi subklastami.

4.1.4.4. Transkryptomika.

W literaturze znajdziemy kilka doniesień na temat zmian w ekspresji różnych genów *Arthrospira* poddanej działaniu stresu. Pierwsze doniesienie pochodzi z 2008 roku, gdzie Jeamton *et al.* badali zmiany w ekspresji na poziomie genów desaturazy kwasów tłuszczowych (*desC*, *desA*, *desC*) oraz hehydratazy hydroksymirystylionowej [acylo-nośnik-białko] (*fabZ*) szczepu *A. platensis* C1 w warunkach stresu temperaturowego i świetlnego

(hodowla w 22 °C w ciemności). Analiza wykazała, że stabilność mRNA pozwala na zachowanie składu błon komórkowych i kompozycji kwasów tłuszczowych.

Huili *et al.* (2012) zbadali zmianę ekspresji 38 genów w warunkach stresu temperaturowego (15 °C, 35 °C, 45 °C) u *A. platensis* YZ, z czego 26 wykazało nadekspresję między innymi geny kodujące polipeptyd łączący fikobilisomy czy podjednostkę alfa fikocyjaniny. Natomiast, również Huili *et al.* w 2013 roku przeprowadzili analizę zmiany ekspresji 29 genów pod wpływem różnych stężeń chlorku sodu w środowisku (0,02 M, 0,5 M i 1,0 M NaCl) u *A. platensis* YZ. W warunkach podwyższonego stężenia chlorku sodu zaobserwowano nadekspresję między innymi: genu kodującego syntetazę glutationonową, zapewniającą stabilność środowiska wewnątrzkomórkowego w warunkach stresowych oraz 3-oksoacyloreduktazę [acylo-nośnik-białko], która prawdopodobnie wspomaga fotosyntezę w podwyższonych stężeniach chlorku sodu w środowisku. W obu badaniach zaobserwowano pewną niezgodność pomiędzy poziomami transkrypcji i translacji w niektórych genach. Zasugerowano, że ich rola nie jest związana z bezpośrednią odpowiedzią na stres, a dokładniej mogą pełnić funkcję regulatorową. Na różnice w poziomie transkrypcji i translacji ma wpływ wiele czynników i można je tłumaczyć między innymi degradacją mRNA (Huili *et al.*, 2012).

Badri *et al.* (2015) zbadali wpływ promieniowania gamma w dawkach 90-6400Gy na zmianę w poziomie ekspresji genów *Arthrospira* sp. PCC 8005 w kontekście wykorzystania tego szczepu jako komponent w sztucznym ekosystemie MELISSA (Wstęp 4.1.6.2.) Zaobserwowano nadekspresję genów związanych z szlakami sygnalizacyjnymi, systemów naprawy ssDNA (ang. *single-stranded DNA*), mobilnymi elementami genetycznymi MGE (ang. *Mobile Genetic Elements*) oraz grupy konserwowanych białek, prawdopodobnie związanych z odpornością na promieniowanie jonizujące. Co ciekawe, w komórkach nie zaobserwowano zmiany ekspresji genów kodujących standardowe systemy walki z wolnymi rodnikami oraz naprawy DNA jak dysmutaza nadtlenkowa czy białko RecA.

4.1.5. Występowanie i warunki hodowli.

4.1.5.1. Występowanie.

Arthrospira występuje głównie w alkalicznych, słonych wodach. Izolowana jest również z gleby, piasków, bagien oraz wód słodkich. Najczęściej występuje w klimacie tropikalnym i subtropikalnym. Jej obecność odnotowano w takich krajach jak: Czad, Kenia, Etiopia, Indie, Pakistan, Tajlandia, Rosja, Chiny, Meksyk, Peru i USA. To właśnie w Meksyku Aztekowie wylawiali z jeziora Texcoco maty *Arthrospira*, suszyli je i spożywali

nazywając to pożywienie Tecuitlatl (Ciferri, 1983; Vonshak & Richmond, 1988). Geograficzne rozmieszczenie naturalnego występowania *Arthrospira* oraz miejsc masowej produkcji przedstawione są na Rycinie 1.



Rycina 1. Geograficzne rozmieszczenie naturalnego występowania *Arthrospira* oraz miejsc, gdzie biomasa produkowana jest na skalę masową.

4.1.5.2. Optymalne warunki wzrostu.

Optymalna temperatura wzrostu *Arthrospira* jest ściśle uwarunkowana jej występowaniem. Wacha się między 30 a 38 °C. Jednak izolowane są również szczepy z regionów, gdzie temperatura wynosi kilka stopni, a ich optimum wzrostu wynosi około 24 °C (m.in. szczepy wyizolowane z regionów syberyjskich) (Ciferri, 1983; Vonshak & Tomaselli, 2000). Natężenie światła optymalne dla wzrostu *Arthrospira* to 12-120 μmol fotonów $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, czyli 10-15% całkowitego natężenia promieniowania słonecznego (Furmaniak *et al.*, 2017). *Arthrospira* jest przede wszystkim fotoautotroficzna, jednak może również odżywiać się heterotroficznie, co czyni z niej miksotrofa. Wydajność wzrostu w warunkach laboratoryjnych zwiększa dodatek 0,1% glukozy do pożywki (Ciferri, 1983). *Arthrospira* jako organizm alkalofilny zdolna jest do wzrostu w pH 8-10, co jest korzystne ze względu na zahamowanie wzrostu bakterii patogennych przy wysokich wartościach pH.

4.1.5.3. Hodowla w warunkach laboratoryjnych.

W warunkach laboratoryjnych hodowle *Arthrospira* prowadzi się w stałej oraz płynnej pożywce Zarrouk (*Materiały* 2.4.2.). Jest to pożywka bogata w sole mineralne oraz mikro- i makroelementy. Hodowle na podłożu stałym prowadzi się w jednorazowych, plastikowych szalkach Petriego. Natomiast hodowle w pożywce płynnej prowadzi się w probówkach,

kolbach, butelkach, a także plastikowych pojemnikach do hodowli tkankowych czy też akwariach (Fotografia 2). Najlepiej przystosowanymi pomieszczeniami do hodowli *Arthrospira* (odpowiednia temperatura, naświetlenie, fotoperiod lub jego brak) są fitotrony, a warunki w nich panujące są pod ścisłą kontrolą.



Fotografia 2. Zdjęcie hodowli *Arthrospira* w warunkach laboratoryjnych.

Bardzo trudnym, a wręcz niemożliwym do wykonania w pracy z *Arthrospira* zadaniem, jest otrzymanie szczepów aksenicznych i utrzymanie ich w tym stanie w trakcie długotrwałych hodowli. Badania dowodzą, że wzrost bakterii wraz z cyjanobakteriami występuje naturalnie. Cyjanobakterie dostarczają do konsorcjum tlen, który jest głównym akceptorem elektronów u bakterii heterotroficznych, podczas gdy bakterie wspomagają fotoautotroficzny wzrost cyjanobakterii dostarczając im dwutlenek węgla oraz m. in. białka, węglowodany i kationy metali (Subashchandrabose *et al.*, 2011).

Pierwszy protokół do otrzymania aksenicznych szczepów *Arthrospira* zaproponował Choi *et al.* (2008) badając wpływ płukania biomasy i działania pięciu różnych antybiotyków na bakterie zanieczyszczające hodowlę. Sena *et al.* (2009) przedstawili metodologię do usuwania bakterii z hodowli *Arthrospira* używając filtracji, płukania KOH, oraz ampicyliny, penicyliny, cefoksytyny i meropenemu.

Shiraishi (2015) opublikował pracę, w której sugeruje, że bakterie koegzystujące z *Arthrospira* nie są związane bezpośrednio z ich komórkami, ale z agregatami przez nie produkowanych egzopolisacharydów. Na podstawie swoich badań opracował metodę uzyskiwania szczepów aksenicznych *Arthrospira* z użyciem metod filtracji.

Jednak w praktyce, hodowle o zredukowanej liczbie bakterii towarzyszących *Arthrospira* zamierają, a kultury wykorzystywane do masowej produkcji biomasy nie są akseniczne.

4.1.5.4. Hodowla na skalę przemysłową.

Wielkoskalowa hodowla *Arthrospira* przeprowadzana jest w otwartych lub zamkniętych systemach, w zależności od przeznaczenia biomasy. W przypadku systemów otwartych są to płytkie zbiorniki (12-15 cm głębokości) zaopatrzone w mieszadła łopatkowe i wyeksponowane na promieniowanie słoneczne (Fotografia 3). Mieszadła łopatkowe instalowane są w celu zapewnienia ciągłego dostępu do światła wszystkim komórkom oraz rozprowadzania substancji odżywczych (Borowitzka, 1999; Chaumont, 1993). Hodowla w zbiornikach otwartych najbardziej opłacalna jest w regionach tropikalnych, gdzie odpowiednie warunki temperaturowe i naświetlenia panują przez cały rok.



Fotografia 3. Hodowla biomasy *Arthrospira* w systemie otwartym.

Hodowla w systemie zamkniętym prowadzona jest w reaktorach rurowych, kolumnowych czy płytowych przepuszczających światło przez swoją powierzchnię, a mieszanie hodowli odbywa się za pomocą wprowadzanego strumienia wody, powietrza lub mechanicznych pomp (Chaumont, 1993) (Fotografia 4).



Fotografia 4. Zdjęcia bioreaktorów do hodowli biomasy *Arthrospira* w systemie zamkniętym: po lewej reaktor kolumnowy, po prawej reaktor płytowy.

Do masowych hodowli *Arthrospira* dodaje się wodorowęglanu sodu w celu zapewnienia źródła węgla oraz utrzymania pH optymalnego dla wzrostu. Dodatek mikroelementów uzależniony jest od jakości wody stosowanej do hodowli (Chojnacka *et al.*, 2004).

Pierwsza masowa produkcja *Arthrospira* była prowadzona na jeziorze Texcoco (Meksyk) w 1970 roku. *Arthrospira* występowała tam naturalnie w zbiornikach przeznaczonych do wydobycia węglanu sodu, jednak ze względu na przemysłowy rozwój miasta Meksyk i narastające zanieczyszczenia urbanizacyjne, hodowlę zamknięto po siedmiu latach (Vonshak, 1997; Shimamatsu, 2004). Od 1977 zaczęto produkować biomasę w Azji, gdzie obecnie produkuje się jej najwięcej. Największe farmy są w stanie wyprodukować nawet 500 ton suchej biomasy rocznie. W 2010 światowa produkcja suchej biomasy *Arthrospira* osiągnęła 90 000 ton rocznie i utrzymała się na tym poziomie do ostatniego raportu FAO (2016).

Masowa produkcja biomasy *Arthrospira* wymaga ścisłej kontroli warunków panujących w zbiornikach, poziomu zawartości azotanów i fosforanów oraz zachowania czystości gatunkowej. Bardzo niekorzystne jest zakontaminowanie hodowli innymi gatunkami sinic oraz gatunkami patogennych bakterii. Vardaka *et al.* (2016) zbadali 31 suplementów diety zawierających biomasę *Arthrospira* dostępnych na Greckim rynku pod względem czystości mikrobiologicznej z użyciem pirosekwencjonowania 454. Badanie wykazało obecność 469 różnych bakteryjnych taksonów OTU (najmniejszych jednostek taksonomicznych, and *Operational Taxonomic Unit*), w tym toksycznych cyjanobakterii z rodzaju *Microcystis*, *Anabaenopsis* i *Nostoc*, a także patogenów ludzkich. Opublikowane wyniki unaocznily wagę problemu jakim jest ścisła kontrola jakości produkowanej biomasy.

4.1.6. Zastosowanie w biotechnologii i przemyśle.

4.1.6.1. Skład biochemiczny i właściwości odżywcze.

Pierwsze doniesienia na temat możliwości konsumpcji *Arthrospira* ze względu na jej wartości odżywcze pochodzą już z szesnastego wieku. Podczas kolonizacji Ameryki Środkowej przez kraje europejskie zaobserwowano, iż cywilizacja Azteków wyławia z jeziora Texcoco cyjanobakterie, suszy je na słońcu i konsumuje jako pożywienie zwane „Tecuitlatl”. Niezależnie od tych wydarzeń na kontynencie Afrykańskim również odkryto odżywcze właściwości *Arthrospira*. Do tej pory plemię Kanembu zamieszkujące okolice jeziora Czad, z suszonej biomasy *Arthrospira* przygotowuje placki „Dihé”, tradycyjny posiłek w tamtym regionie. „Dihé” po raz pierwszy opisał francuski fykolog Dangeard w 1940 roku. W latach

60-tych dwudziestego wieku belgijski botanik Leonard wraz z zespołem wykonał pierwszą analizę biochemiczną biomasy *Arthrospira*, co zapoczątkowało rosnące zainteresowanie tym organizmem na całym świecie (Ciferri 1983). Wspomniani już Leonard i Compere (1967) wykazali, że sucha biomasa *Arthrospira* może zawierać nawet 45% białka. Zawartość białka w suchej masie określana jest na poziomie 55-77% (Ciferri, 1987). Dodatkowo biomasa *Arthrospira* zawiera osiem egzo- i dwanaście endogennych aminokwasów. Aminokwasy występujące w największej ilości to leucyna, walina oraz izoleucyna i chociaż zawartość cysteiny i metioniny jest procentowo najmniejsza to wciąż wyższa niż w porównaniu do zbóż czy warzyw. Warto również podkreślić, że poza wysoką zawartością białka w suchej masie, odnotowano również niewielką ilość celulozy w ścianie komórkowej *Arthrospira*, co poprawia strawność biomasy (83-90%) (Miklaszewska *et al.*, 2008).

Określenie zawartości lipidów w komórkach *Arthrospira* jest dość trudne ze względu na różnice w wydajności metod ekstrakcji i zmianach w rzeczywistej zawartości, jednak źródła podają wartości między 1.5 a 12% w suchej masie (Ciferri, 1987). Najważniejszym kwasem tłuszczowym w biomacie *Arthrospira* jest bez wątpienia kwas gamma-linolenowy (GLA), który syntetyzowany jest przez delta-6 desaturazę kwasów tłuszczowych, a jego zawartość może sięgać nawet 40% wszystkich kwasów tłuszczowych (Murata *et al.*, 1996). Kwas gamma linolenowy jest prekursorem leukotrienów i tromboksanów w organizmie ludzkim, a *Arthrospira* jest najlepszym znanym źródłem tego kwasu. Pozostałe lipidy w biomacie *Arthrospira* to: witamina F, kwasy linolenowy i arachidonowy. Co ważne, *Arthrospira* nie zawiera kwasów tłuszczowych o nieparzystej liczbie atomów węgla oraz zawiera niski poziom rozgałęzionych kwasów tłuszczowych, które nie są metabolizowane przez ludzi (Miklaszewska *et al.*, 2008).

Węglowodany znajdujące się w biomacie *Arthrospira* to przede wszystkim ramnoza i glikogen, a ich zawartość waha się między 10 a 15% suchej masy. Fosforan mezoinozytolu jest bardzo dobrym źródłem inozytolu i fosforu organicznego, a jego stężenie w *Arthrospira* sięga 350 do nawet 850 mg/kg biomasy (Falquet and Hurni, 1997). Wspomniane już wcześniej polisacharydy, ekstrahowane z komórek lub z pożywki, na której była hodowana *Arthrospira* wykazują właściwości przeciwnowotworowe, immunomodulacyjne, a także mogą mieć zastosowanie w medycynie regeneracyjnej jako matryca do regeneracji tkanek lub całych organów (Nielsen *et al.*, 2010; de Moraes *et al.*, 2014; Kurd & Samavati, 2015).

Biomasa *Arthrospira* obfita jest również w karotenoidy, które są prekursorami witaminy A u ssaków. Komórki *Arthrospira* zawierają: alfa-karoten, kryptoksantynę, zeaksantynę, ksantofil, echinenon i luteinę, jednak aż 80% spośród wszystkich karotenoidów

stanowi beta-karoten. Preparaty z *Arthrospira* są polecane w przypadku niedoborów witaminy A u ludzi (Falquet & Hurni, 1997; Miklaszewska *et al.* 2008).

Poza karotenoidami, komórki *Arthrospira* zawierają inne barwniki: c-fikocyjaninę, chlorofil i porfiryne. C-fikocyjanina, poza nadawaniem komórkom charakterystycznego zabarwienia ma również szereg innych właściwości: wykazuje działanie antyoksydacyjne, jest pochodną bilirubiny niezbędną do prawidłowego funkcjonowania wątroby, wspomaga wchłanianie żelaza, a także ma potencjalne działania przeciwnowotworowe (Ouhit *et al.*, 2014; Subhashini *et al.*, 2013; Pervushkin *et al.*; 2001). Chlorofil działa pozytywnie na pracę jelit: wspiera ich perystaltykę, normalizując wydzielanie kwasów trawiennych, łagodzi zapalenia i zmniejsza wydzielanie pepsyny. Porfiryne tworzy centrum hemoglobiny, co sugeruje jej funkcje w utrzymywaniu odpowiedniego poziomu czerwonych krwinek w organizmie człowieka (Miklaszewska *et al.*, 2008).

Biomasa *Arthrospira* jest również bogatym źródłem minerałów oraz mikroelementów jak np.: potas, cynk, wapń, fosfor, selen, magnez, mangan, oraz żelazo. Pierwiastki te są absorbowane z pożywki i przekształcane w chelaty. Warto wspomnieć, że żelazo przyjmowane z *Arthrospira* jest dwa razy lepiej przyswajalne niż to pochodzące z mięsa oraz warzyw, ze względu na kompleksy tworzone z fikocyjaniną (Puyfoulhoux *et al.*, 2001).

Dodatkowo, jak już wcześniej wspomniano, zawartość kwasów nukleinowych jest niska w porównaniu z innymi bakteriami. Jest to niekorzystne pod względem badań molekularnych, ale bardzo korzystne ze względu na jadalny charakter *Arthrospira*, ponieważ produktem przemiany puryn jest kwas moczowy, który może powodować m. in. kamienie nerkowe (Ciferri, 1987). Alkalofilny charakter *Arthrospira* jest również istotną cechą, ponieważ wysokie pH hamuje wzrost większości patogenów ludzkich.

4.1.6.2. Właściwości terapeutyczne.

Za większość właściwości terapeutycznych biomasy *Arthrospira* odpowiadają produkowane przez nią bioaktywne związki: c-fikocyjanina, spirulan wapnia (Ca-SP), immulina oraz kwas gamma linolenowy (GLA).

Fikocyjanina jest nietoksycznym kompleksem chromoforu fikocyjanobiliny i białka oraz jak już wspomniano, wchodzi w skład fikobilisomów. Do immunomodulacyjnych właściwości terapeutycznych c-fikocyjaniny należy stymulacja produkcji cytokin prozapalnych, aktywacja makrofagów komórek T oraz B, a także redukcja alergicznych reakcji zapalnych poprzez wyciszanie antygenowo-specyficznych przeciwciał IgE (Chen *et al.*, 2014; Khan *et al.*, 2005; Nemoto-Kawamura *et al.*, 2004). C-fikocyjanina wykazuje

również działanie przeciwbakteryjne oraz zapobiega rozwojowi arteriosklerozy (Sarada *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013). Przede wszystkim jednak, c-fikocyjanina wykazuje właściwości przeciwnowotworowe, do których należą: działanie hamujące angiogenezę nowotworów, hamuje cykl komórkowy, pośredniczy w apoptozie poprzez m. in. aktywację szlaku p53 oraz hamuje proliferację różnych linii komórek nowotworowych (Saini and Sanyal, 2014; Li *et al.*, 2006; Subhashini *et al.*, 2004).

Spirulan wapnia to polisacharydowy kompleks, w którego skład wchodzi ramnoza, ryboza, mannoza, fruktoza, galaktoza, ksyloza, glukoza, kwas glukuronowy, kwas galakturonowy, siarczan oraz wapń (Lee *et al.*, 1998, 2000). Wykazuje on przede wszystkim działanie przeciwwirusowe poprzez selektywne hamowanie wnikania i replikacji wirusów otoczkowych np. wirusa opryszczki typu pierwszego i drugiego (HSV-1, HSV-2), ludzkiego cytomegalowirusa (HCMV), wirusa odry, świnki, grypy typu A oraz wirusa HIV-1 (Henrandez-Corona *et al.*, 2002; Rechter *et al.*, 2006). Dodatkowo udowodniono wpływ spirulanu wapnia na hamowanie inwazji czerniaka B16-BL6, nowotworu jelita grubego oraz fibrosarkomy HT-1080 (Mishima *et al.*, 1998).

Immunulina jest również kompleksem polisacharydowym, który wykazuje silne działanie immunomodulacyjne. Jest od 100 do 1000 razy silniejszym aktywatorem monocytów niż standardowe preparaty stosowane w immunoterapii nowotworów. Dodatkowo zwiększa poziomy TNF-alfa, IFN-gamma oraz IL-6 (interleukiny szóstej) we krwi (Lobner *et al.*, 2008). Immunila również wykazuje silne działanie przeciwko drożdżakom *Candida albicans* oraz toksoidowi tężca (Furmaniak *et al.*, 2017).

Kwas gamma linolenowy (GLA) należy do gamy kwasów omega-6 i jest biosyntetycznym prekursorem prostaglandyn i tromboksanów (Merck Index, 11th ed). Dodatkowo redukuje akumulację cholesterolu w zespole hipolipodemiczno-nefrotycznym (Samules *et al.*, 2000). GLA wykazuje również działanie cytotoksyczne przeciw komórkom linii A459 - ludzkiego nowotworu płuc (Jubie *et al.*, 2015).

Ekstrakty z biomasy *Arthrospira* mają działanie przeciwbakteryjne oraz przeciwgrzybicze. Wodny, propanolowy oraz acetonowy ekstrakt wykazuje aktywność przeciwko *Escherichia coli*, *Salmonella Typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* i *Klebsiella pneumoniae* (Mala *et al.*, 2009). Natomiast ekstrakt butanolowy z sproszkowanej biomasy, jest czynnikiem mającym działanie przeciw *Candida glabrata* (Santhanam *et al.*, 2011).

Arthrospira również wspomaga wzrost bakterii probiotycznych zasiedlających ludzki układ pokarmowy, przez co zwiększa się poziom produkowanej witaminy B6 (Parada *et al.*, 1998; Kordowska-Wiater *et al.*, 2011).

Badania Gemma *et al.* (2002) na szczurach sugerują, że *Arthrospira* wzmacnia poziom ekspresji receptorów beta-adrenergicznych w tkankach mózgu, który ulega obniżeniu wraz z wiekiem i jest związany z demencją u ludzi starszych. Inne badania na zwierzętach pokazują, że *Arthrospira* może chronić neurony w jednym z modeli choroby Parkinsona (Pabon *et al.*, 2012).

4.1.6.3. *Arthrospira* w opinii organizacji prozdrowotnych.

W 1993 roku Światowa Organizacja Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*) ogłosiła, że biomasa *Arthrospira* to z wielu powodów interesujące pożywienie, bogate w żelazo i białko oraz może być podawane dzieciom bez żadnych zastrzeżeń (Furmaniak *et al.*, 2017). W 2002 roku amerykańska Agencja Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA) określiła *Arthrospira* jako GRAS (ang. *Generally Recognized As Safe*) – generalnie postrzeganą jako bezpieczną. Farmakopea Stanów Zjednoczonych (ang. *United States Pharmacopeia*) w 2011 roku przeprowadziła przegląd informacji na temat potencjalnych skutków ubocznych stosowania *Arthrospira* oraz wyników badań klinicznych i badań na zwierzętach. Wynikiem tego przeglądu było przyznanie klasy A bezpieczeństwa szczepom *Spirulina platensis* i *Spirulina maxima* (Marles *et al.*, 2011).

4.1.6.4. Projekt MELiSSA.

Grupa europejskich organizacji, w tym Europejska Agencja Kosmiczna (ESA, ang. *European Space Agency*), zainicjowały projekt MELiSSA (ang. *Micro Ecological Life Support System Alternative*) w 1988, którego celem jest stworzenie sztucznego ekosystemu do podtrzymywania życia kosmonautów podczas długotrwałych lotów kosmicznych np. na Marsa. System ten składa się z czterech kompartmentów składających się z konsorcjów mikrobiologicznych lub konkretnych mikroorganizmów. Mikroorganizmy w poszczególnych kompartmentach hodowane są w specjalnych bioreaktorach, które są ze sobą połączone. Utworzona pętla wykorzystuje do wzrostu ścieki, dwutlenek węgla oraz roślinne resztki produkowane przez załogę i poddaje je recyklingowi. Produkt końcowy jednego kompartmentu jest początkowym następnego. Ostatni (IV) kompartment zakłada wykorzystanie zarówno cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira* (konkretnie szczepu *Arthrospira* sp. PCC 8005) oraz roślin wyższych do usuwania dwutlenku węgla z atmosfery, produkcji

tlenu, oczyszczania ścieków oraz produkcji pożywienia (Furmaniak *et al.*, 2017; Hendrickx, *et al.*, 2006). Poza wszystkimi powyższymi zdolnościami, *Arthrospira* jest również odporna na wysokie dawki promieniowania kosmicznego (promieniowanie gamma), nawet w dawce 6400 Gy. Morin (2010a) zbadał odpowiedź komórkową *Arthrospira* na stres oksydacyjny (ekspozycja na H₂O₂ oraz promieniowanie jonizujące) na poziomie fizjologicznym oraz fotosyntetycznym. Badri *et al.* (2014) w swoich badaniach określili zmianę ekspresji genów szczepu *Arthrospira* sp. PCC 8005 poddanego promieniowaniu gamma w różnych dawkach (900-6400 Gy). Wspomniane badania potwierdzają odporność *Arthrospira* na działanie promieniowania gamma, co czyni ją idealnym kandydatem do projektu MELiSSA.

4.1.6.5. Inne zastosowania.

Badania wykazały, że biomasa *Arthrospira* jest dobrym materiałem do oczyszczania ścieków oraz wód środowiskowych. Komórki *Arthrospira* mają dużą powierzchnię właściwą, a także wysokie powinowactwo do różnych jonów, poza tym są odporne na wysokie stężenia metali ciężkich (Miklaszewska *et al.*, 2008). Oczyszczanie ścieków i odzysk metali z użyciem cyjanobakterii oraz mikroalg jest bardzo korzystny ekonomicznie. Rozróżnia się dwa procesy: biosorpcję oraz bioakumulację. Biosorpcja jest procesem pasywnym metabolicznie, biomasa jest używana jako adsorbent. Bioakumulacja jest procesem aktywnym metabolicznie, wymaga użycia żywej biomasy, jony są częściowo wiązane do powierzchni komórek, a częściowo transportowane do wewnątrz komórki (Chojnacka, 2007). Komórki *Arthrospira* są zdolne do biosorpcji i prawdopodobnie bioakumulacji ołowiu, kadmu, niklu, chromu, a także miedzi, cynku i rtęci (Seker *et al.*, 2008; Chojnacka 2007; Gong *et al.*, 2005; Namilova *et al.*, 2005).

Poza niekwestionowanymi korzyściami przy oczyszczaniu środowisk z metali ciężkich, problem bioakumulacji owych pierwiastków w komórkach może mieć bardzo negatywny wpływ na zdrowie ludzi konsumujących biomasę *Arthrospira*. Bardzo ważna jest kontrola jakości wody oraz odczynników używanych do hodowli *Arthrospira*, aby uniknąć ryzyka akumulacji metali ciężkich w biomasie do celów spożywczych.

W świetle ograniczeń wydobycia paliw kopalnych, wciąż poszukiwane są alternatywy. Fotobiologiczny wodór jest przyjazny środowisku i „czysto-palny”. Już w latach 70-tych dwudziestego wieku, zaczęto uważać wodór produkowany przez m. in. cyjanobakterie jako poważną alternatywę dla paliw kopalnych. *Arthrospira* jest również używana do produkcji wodoru, a enzym – hydrogenaza katalizuje ten proces (Juantorena *et al.*, 2007; Raksajit *et al.*, 2012).

Istnieją również doniesienia o produkcji nanocząsteczek srebra z użyciem komórek *Arthrospira* (Ahmed *et al.*, 2015). Dodatkowo wykorzystuje się biomasę *Arthrospira* do produkcji naturalnych barwników (chlorofilu *a* oraz fikocyjaniny), jako dodatek do pasz zwierzęcych, a także w kosmetologii (Furmaniak *et al.*, 2017).

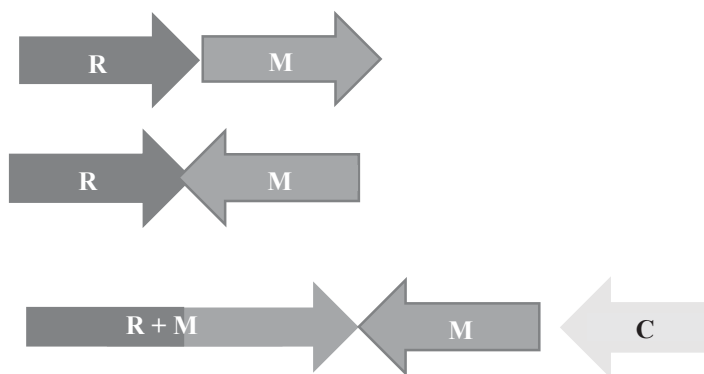
4.2. Bakteryjne systemy obrony przed egzogennym DNA.

4.2.1. Systemy restrykcyjno-modyfikacyjne.

Systemy restrykcyjno-modyfikacyjne (systemy R-M) to systemy obrony przed obcym DNA wnikającym do komórek bakterii i archeonów. System składa się z dwóch enzymów: endonukleazy restrykcyjnej (R) oraz metylotransferazy (M). Pierwszy raz zjawisko restrykcji zostało opisane w 1950 roku, kiedy zaobserwowano ograniczenie w namnażaniu faga lambda w komórkach *E. coli* K-12 (Bertani & Weigle, 1953). Ze względu na zdolność systemów R-M do rozpoznawania „własnego” i „obcego” DNA są one uważane jako pierwotne systemy immunologiczne (Bickle, 2004).

Systemy R-M są szeroko rozpowszechnione u prokariota, do tej pory zidentyfikowano prawie 4000 różnych enzymów u około 300 różnych gatunków bakterii i archeonów. Większość z nich jest izoschizomerami, czyli enzymami, które rozpoznają tę samą sekwencję (miejsce restrykcyjne), ale zostały zidentyfikowane w różnych organizmach. W przeciwieństwie do endonukleaz, metylotransferazy są wysoce konserwowane w genomach, co może sugerować ich wolniejszą ewolucję. Wykazano, że około 90% genomów bakterii i archea posiada co najmniej jeden system R-M, a około 80% więcej niż jeden. Dodatkowo wykazano, że ilość zidentyfikowanych systemów R-M w genomie jest zależna od jego wielkości – im większy genom tym więcej obecnych systemów R-M (Vasu & Nagaraja, 2013).

Systemy R-M, głównie typu II, mają szerokie zastosowanie w biologii molekularnej. Używane są w klonowaniu, a także w metodzie RFLP (ang. *Restriction Fragment Length Polymorphisms*) i pochodnych.



Schemat 1. Przykładowe organizacje operonu systemu R-M; R – endonukleaza, M – metylotransferaza, C – białko regulatorowe.

4.2.1.1. Mechanizm działania systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych.

Systemy R-M składają się z dwóch enzymów, endonukleazy oraz metylotransferazy. W niektórych systemach obecne jest się również białko regulatorowe C. Endonukleaza i metylotransferaza rozpoznają tę samą sekwencję nukleotydową DNA, jednak mechanizm ich działania jest inny.

Funkcją endonukleazy jest unieszkodliwienie egzogennego DNA wnikającego do komórki poprzez jego cięcie w miejscu restrykcyjnym - specyficznej sekwencji nie zmetylowanego DNA o długości zazwyczaj 4-8 par zasad. Cięcie następuje poprzez hydrolizę wiązania fosfodiesterowego w obrębie miejsca restrykcyjnego (Nakoneczna *et al.*, 2006). Katalityczną reakcję endonukleazy restrykcyjnej można podzielić na 6 etapów: i) wiązanie niespecyficzne do DNA; ii) lokalizacja sekwencji docelowej; iii) rozpoznanie i wiązanie do sekwencji docelowej; iv) przyłączenie się do rozpoznanego miejsca i kataliza; v) cięcie; oraz vi) uwolnienie produktu (Pingoud & Jeltsch, 1997). Przybliżony mechanizm działania endonukleazy obrazuje schemat nr 1.

Metylotransferaza ma za zadanie modyfikację miejsca restrykcyjnego przez przyłączenie do reszty adeniny lub cytozyny grupy metylowej. Tak zmodyfikowane DNA chronione jest przed restrykcją. Metylotransferazy można podzielić ze względu na mechanizm ich działania, w zależności czy dodają grupę metylową do atomu węgla (do cytozyny-C5) czy azotu (adeniny-N6 i cytozyny-N4). Kompleks katalityczny wszystkich metylotransferaz składa się z trzech struktur: enzymu, substratu DNA oraz kofaktora AdoMet (S-adenozylometioniny) (Jeltsch & Jurkowska, 2016).

4.2.1.2. Klasyfikacja systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych.

Współczesna klasyfikacja systemów R-M opiera się na: strukturze enzymu, w tym jego podjednostek; rozpoznawanej sekwencji – długości, ciągłości sekwencji, czy jest symetryczna czy asymetryczna; charakterystyki cięcia – w lub poza miejscem restrykcyjnym, czy cięte są sekwencje metylowane czy niemetylowane; wymaganych kofaktorów; i dzieli je na cztery typy (I, II, III, IV) (Roberts *et al.*, 2003).

Typ I systemów R-M składa się z hetero-oligomerycznych kompleksów białkowych, mających funkcje modyfikacyjną oraz restrykcyjną. Składają się one z trzech genów *hsd* (ang. *host specificity for DNA*): *hsdM* – odpowiedzialnego za modyfikację DNA; *hsdR* odpowiedzialny za restrykcję; oraz *hsdS* odpowiedzialny za rozpoznawanie specyficznych sekwencji. Charakteryzuje je cięcie DNA w miejscu oddalonym od 100 do nawet dziesiątek tysięcy par zasad od miejsca przyłączenia (Nakonieczna *et al.*, 2006; Vasu & Nagaraja, 2013).

Typ II systemów R-M posiada niezależne strukturalnie i funkcjonalnie enzymy – metylotransferazę oraz endonukleazę. Jest to najliczniejsza i najlepiej poznana grupa systemów R-M, mają również szerokie zastosowanie w inżynierii genetycznej. Są to cząsteczki homodimeryczne lub homotetrameryczne i tną cząsteczkę DNA w miejscu restrykcyjnym lub blisko niego. Wyróżnia się jedenaście podtypów systemów R-M typu drugiego (A, B, C, E, F, G, H, M, P, S, T) (Nakonieczna *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 2003).

Typ III systemów R-M to heterotrimery lub heterotetramery, wykazujące aktywność restrykcyjną, modyfikacyjną oraz DNA-zależnej NTP-azy. Konkurują między sobą w obrębie tego samego, krótkiego i asymetrycznego miejsca restrykcyjnego. Cięcie ma miejsce w odległości około 25 par zasad od miejsca restrykcyjnego, ale tylko gdy dwie sekwencje rozpoznawane są w odwrotnej orientacji do siebie.

W odróżnieniu od pozostałych trzech typów, typ IV systemów R-M, tną tylko substraty DNA zawierające metylowane, hydroksymetylowane lub glukozylowane hydroksymetylowane zasady w miejscu restrykcyjnym (Vasu & Nagaraja, 2013).

Poza opisanymi typami systemów R-M istnieją również metylotransferazy nie związane z endonukleazami – tzw. samotne metylotransferazy (ang. *solitary methyltransferases*), np. metylotransferazy Dam (ang. *DNA adenine methylase*) oraz Dcm (ang. *DNA cytosine methylase*). Metylotransferaza Dam była pierwszą opisaną samotną metylotransferazą, a jej rola u *E. coli* polega na metylowaniu DNA chromosomalnego. Mutanty *E. coli* z niefunkcjonalną metylotransferazą Dam są żywotne, ale wysoce podatne na spontaniczne mutacje (co sugeruje rolę metylacji w naprawie DNA) i mają zaburzoną

koordynację inicjacji replikacji chromosomu (Adhikari & Curtis, 2016). Rolą metylotransferazy Dcm u ssaków i prawdopodobnie u bakterii jest regulacja ekspresji genów. Mutanty z niefunkcjonalną Dcm wykazują zwiększoną ekspresję czynnika sigma odpowiedzi na stres (RpoS) co zmienia ekspresję genów w fazie stacjonarnej (Karhamanoglou *et al.*, 2012).

4.2.2. Systemy CRISPR/Cas.

Systemy CRISPR/Cas (ang. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) pośredniczą w nabywaniu odporności na wnikanie obcych elementów genetycznych do komórki bakteryjnej takich jak fagi czy plazmidy. Kasety krótkich powtórzeń z unikalnymi sekwencjami pomiędzy (ang. *spacer*) zostały zidentyfikowane już pod koniec lat 80-tych XX wieku i mimo sugestii, że te powtórzenia mogą pełnić ważne funkcje w genomie, ich rola dopiero niedawno została wyjaśniona.

Po raz pierwszy nowy rodzaj krótkich powtórzeń w genomie (ang. *Short Sequence Repeats* – SSR) zauważył Ishino *et al.* w 1987 roku, jednak nie odkryto wówczas ich funkcji. Po wielu próbach opisanie i nazwanie tych krótkich powtórzeń, dopiero w 2002 roku Jansen *et al.* wprowadzili nazwę „CRISPR”, wraz z odkryciem pierwszych genów *cas*, jednak wciąż nie określili ich funkcji w genomie. Przełom nastąpił w 2005 roku, kiedy kilka niezależnych grup badawczych zaobserwowało homologię sekwencji powtórzeń CRISPR do sekwencji mobilnych elementów genetycznych takich jak fagi, plazmidy czy transpozony. Sugerowało to ich pozachromosomalne pochodzenie i potencjalną immunologiczną funkcję (Mojica *et al.*, 2005; Pourcel *et al.*, 2005).

Dzisiaj wiadomo, że systemy CRISPR/Cas zapewniają adaptacyjną odporność przeciw obcemu DNA, a mechanizm ich działania jest złożony i wieloetapowy.

4.2.2.1. Struktura CRISPR.

Region CRISPR składa się z trzech elementów: i) sekwencji bezpośrednio powtarzalnych (ang. *Direct Repeats*, *ń*), ii) nie repetytywnych sekwencji rozdzielających (ang. *spacer*), iii) sekwencji liderowej flankującej koniec powtórzeń (ang. *leader sequence*) oraz genów regulatorowych CAS (ang. *CRISPR-Associated genes*).

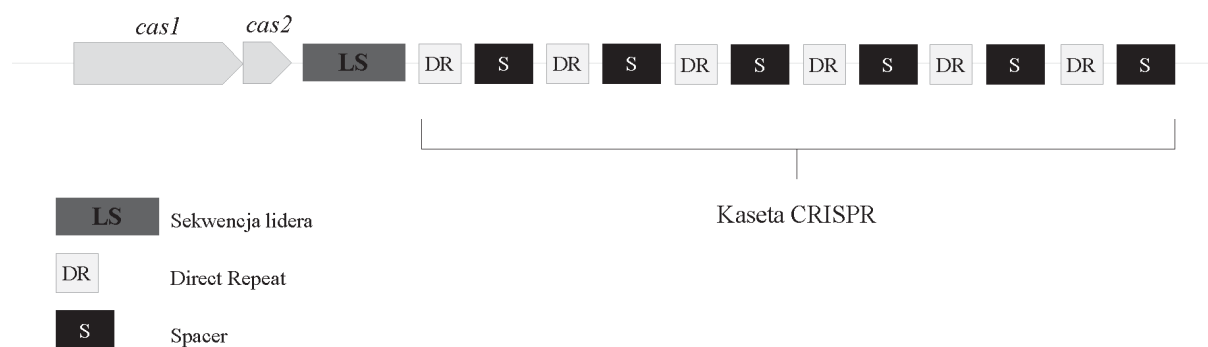
Liczba i długość sekwencji DR regionu CRISPR różni się pomiędzy organizmami. Zazwyczaj ich wielkość waha się pomiędzy 23 a 55 par zasad. U bakterii średnio identyfikuje się trzy kasety CRISPR, a u archeonów pięć. Ważną cechą kasety CRISPR jest zdolność ich transkryptów do tworzenia drugorzędowych struktur RNA (Karimi *et al.*, 2018).

Sekwencje rozdzielające – sekwencje spacerowe – charakteryzują się podobną długością w jednej kasecie CRISPR, która waha się między 26 a 72 par zasad. Pomimo podobnej długości, nie zidentyfikowano dwóch takich samych sekwencji spacer w jednej kasecie CRISPR. Wykazują one znaczną zmienność między poszczególnymi szczepami różnych gatunków, co czyni je użytecznymi narzędziami w badaniach epidemiologicznych (Koonin *et al.*, 2007). Sekwencja spacer odpowiada sekwencjom zaadoptowanym z obcych elementów genetycznych tzw. protospacer. Miejsca, w których są one przyłączane określa się jako PAMs (ang. *Protospacer Adjacent Motifs*) (Hsu *et al.*, 2014).

Sekwencje liderowe to bogate w AT, niekodujące regiony znajdujące się na końcu 5' loci CRISPR, powyżej pierwszego powtórzenia i często poniżej ostatniego genu *cas*. Badania sugerują, że transkrypcja kasety CRISPR rozpoczyna się właśnie w regionie liderowym. Inne przypisywane im funkcje to między innymi przygotowywanie platformy od przyłączania się białek CAS. Podobnie jak DR, sekwencje liderowe są konserwowane w obrębie gatunku, jednak zmienne w obrębie rodzaju (Karimi *et al.*, 2018).

Geny *cas* zlokalizowane są w sąsiedztwie kasety CRISPR i przypuszcza się, że wraz z loci CRISPR mają powiązane funkcje w metabolizmie DNA i ekspresji genów. Gen *cas1* koduje miejscowo niespecyficzną, metalo-zależną DNA-zę, prawdopodobnie biorącą udział w integracji DNA spacerowego do kasety CRISPR. Produkt genu *cas2* uczestniczy w nabywaniu nowych sekwencji spacerowych, syntezie nowych powtórzeń oraz insercji sekwencji powtórzenia-spacer na końcu lidera. Rodziny genów *cas1* oraz *cas2* są uniwersalne dla wszystkich typów CRISPR, a ich sekwencje są silnie konserwowane w genomach (Makarova *et al.*, 2011, Karimi *et al.*, 2018).

Białka RAMP (Repeat-Associated Mysterious Proteins) jest to rodzina białek Cas, zawierająca co najmniej jeden motyw rozpoznający RNA i charakterystyczną pętlę bogatą w glicynę. Niektóre z białek RAMP mają sekwencyjno- lub strukturalnie specyficzną aktywność RNA-zy, które biorą udział w przetwarzaniu transkryptu pre-crRNA (CRISPR RNA). Białka RAMP kodowane są przez m. in. geny *csx*, *cmr*, *csm*, *csa*, *cse*, *csy* (Makarova *et al.*, 2011). Przykładowy schemat organizacji systemu CRISPR przedstawia schemat nr 2.



Schemat 2. Schematyczne przedstawienie organizacji loci CRISPR.

4.2.2.2. Mechanizm działania CRISPR.

Proces nabywania odporności przebiega w trzech etapach: adaptacji, ekspresji oraz interferencji. Ponadto może zostać podzielony na dwa podsystemy: silnie konserwowany podsystem przetwarzający informacje, odpowiedzialny za etap adaptacji oraz podsystem wykonawczy, odpowiedzialny za ekspresję oraz interferencję (Makarova *et al.*, 2011).

Etap adaptacji polega na integracji krótkich fragmentów DNA homologicznych do sekwencji fagowych czy plazmidowych do loci CRISPR. Każdemu włączeniu (integracji) towarzyszy duplikacja powtórzenia, co pozwala na stworzenie nowej jednostki powtórzenie-spacer (DR-spacer). Podczas etapu ekspresji długi początkowy transkrypt locus CRISPR (tzw. pre-crRNA) jest generowany i procesowany do krótkich crRNA, co katalizowane jest przez endorybonukleazę. W ostatnim etapie – interferencji – crRNA naprowadza odpowiednie kompleksy białek Cas na komplementarne sekwencje docelowe wirusów lub plazmidów, które następnie są cięte.

4.2.2.3. Klasyfikacja i nomenklatura.

W 2005 roku Haft *et al.* zaproponowali klasyfikację systemów CRISPR na podstawie topologii genu *cas1* w analizie filogenetycznej oraz generalnej organizacji operonu *cas* w 40 analizowanych genomach. Pomimo korzystnej prostoty, klasyfikacja ta nie uwzględniała znaczących różnic pomiędzy różnymi białkami Cas ani pokrewieństwa ewolucyjnego systemów CRISPR/Cas z różnych organizmów. Makarova *et al.* w 2013 opracowali obowiązującą klasyfikację systemów CRISPR dzieląc je na trzy typy, gdzie wszystkie typy zawierają geny *cas1* oraz *cas2* będące swoistym rdzeniem systemu.

- Typ I, oprócz genów *cas1* i *cas2*, posiada również gen *cas3*, a także geny zaliczane do RAMP: *cas4*, *cas5*, *cas6*, *cas7*, *cse*, *csy*, *csn* i in.

- Typ II zawiera domenę typu HNH, w którym to białko Cas9 generuje crRNA i tnie docelowe DNA.
- Typ III zawiera polimerazę oraz moduły RAMP, z których kilka jest zaangażowanych w procesowanie transkryptu spacer-powtórzenie.

Każdy z typów charakteryzuje obecność innych genów (poza *cas1* i *cas2*) oraz można je podzielić na subtypy: I-A, I-B, I-C, I-D, I-E, I-F, I-U, II-A, II-B, III-A, III-B, III-U. Systemy CRISPR, których nie można zaklasyfikować do żadnego z 3 typów określa się jako U (ang. *unclassified*) (Makarova *et al.*, 2011).

4.2.2.4. Zastosowanie w biotechnologii.

Podstawową rolą systemów CRISPR/Cas jest oczywiście zapewnienie odporności adaptacyjnej przeciwko obcym kwasom nukleinowym. Już w 2010 roku badania nad funkcją i strukturą CRISPR/cas wykazały ich potencjał biotechnologiczny. Udowodniono, że systemy te mogą mieć zastosowanie w generowaniu odpornych na fagi szczepów bakterii mlekowych oraz w klasyfikacji filogenetycznej szczepów (Hsu *et al.*, 2017).

Krokiem milowym w określeniu zastosowań CRISPR/cas było odkrycie, że białko Cas9 jest jedynym enzymem, który pośredniczy w celowanym cięciu DNA (Garneu *et al.*, 2010). Systemy te znalazły zastosowanie w edytowaniu genomów w terapii genowej, jak i mogą być zastosowane w celach terapeutycznych w liniach komórkowych i modelach zwierzęcych. System CRISPR-Cas9 dzięki swojej zdolności edytorskiej może „poprawiać” mutacje w zaburzeniach monogenowych (np. mukowiscydozie, anemii sierpowatej, dystrofii mięśniowej Duchenne), modyfikować genomy patogenów (np. wirusa HIV), a także wywoływać ochronne lub terapeutyczne mutacje w tkankach gospodarza. Wykazano również jego potencjalną zdolność do dezaktywacji wirusów onkogennych i wywoływania ekspresji onkosupresji w terapii genowej nowotworów (Hsu *et al.*, 2014; Karimi *et al.*, 2018).

4.3. *Arthrospira* jako produkt pochodzenia naturalnego.

Suszona biomasa cyjanobakterii *Arthrospira* jest produktem pochodzenia naturalnego w formie tabletek, kapsułek czy pudru jako produkt pochodzenia naturalnego, jednak komercyjne produkty kwalifikowane są jako żywność specjalnego przeznaczenia medycznego lub suplement diety. Produkty pochodzenia naturalnego są to głównie składniki i ekstrakty z roślin, które wchodzi w skład wielu leków oraz suplementów diety.

4.3.1. Produkt leczniczy a suplement diety.

Bardzo ważne jest zrozumienie wyraźnej różnicy pomiędzy produktami leczniczymi a suplementami diety. Polskie prawo definiuje suplementy diety jako „środki spożywcze, których celem jest uzupełnienie normalnej diety, będące skoncentrowanym źródłem witamin lub składników mineralnych lub innych substancji wykazujących efekt odżywczy lub inny fizjologiczny, pojedynczych lub złożonych, wprowadzanych do obrotu w formie umożliwiającej dawkowanie w postaci: kapsułek, tabletek, drażetek i w innych postaciach, saszetek z proszkiem, ampułek z płynem, butelek z kroplomierzem i w innych podobnych postaciach płynów i proszków przeznaczonych do spożywania w małych odmierzonych ilościach jednostkowych, z wyłączeniem produktów posiadających właściwości produktu leczniczego w rozumieniu przepisów Prawa Farmaceutycznego” (Dziennik Ustaw z 2005 roku nr 31 pozycja 265). Suplement diety zatem to środek spożywczy, który nie wykazuje właściwości leczniczych, jednak może wspomagać wzmacnianie stanu zdrowia poprzez uzupełnianie niektórych składników odżywczych nie dostarczanych wystarczająco z dietą. Suplementy diety w odróżnieniu od leków podlegają normom żywnościowym, a nie tym regulowanym przez prawo farmaceutyczne. Zamiennie do suplement diety stosuje się również nazwy nutraceutyk lub żywność funkcjonalna (Krause-Baranowska, 2006).

Różnice pomiędzy lekiem a suplementem diety można zauważyć już na etapie rejestracji produktu. Produkt leczniczy, określany przez Prawo Farmaceutyczne jako „substancja posiadająca właściwości zapobiegania lub leczenia chorób występujących u ludzi i zwierząt lub podawana w celu postawienia diagnozy lub w celu przywrócenia, poprawienia lub modyfikacji fizjologicznych funkcji organizmu poprzez działanie farmakologiczne, immunologiczne lub metaboliczne” rejestruje się w Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (URPLW MiPB). W procesie rejestracji należy przedstawić opis wytwarzania produktu, opis metod kontroli stosowanych w procesie wytwarzania, sprawozdania z badań farmaceutycznych, klinicznych, nieklinicznych, opis systemu monitorowania działań niepożądanych i wiele innych. Ponadto produkt leczniczy jest niezależnie kontrolowany przez Główny Inspektorat Farmaceutyczny (GIF). Mimo, iż rejestracja jest czasochłonna i bardzo kosztowna, wszystkie te działania mają na celu zminimalizowanie jakichkolwiek zagrożeń wynikających z przyjmowania danego leku przez pacjenta (Bojarowicz & Dźwigulska, 2012).

W przypadku suplementów diety, należy powiadomić Główny Inspektorat Sanitarny (GIS) (<http://gis.gov.pl>), który nadzoruje rynek żywności w Polsce, o wprowadzeniu do obrotu suplementu diety i przedstawić projekt etykiety. Nie wymaga się przedstawienia

wyników kontroli jakości, trwałości produktu, wyników badań klinicznych, możliwych działań niepożądanych, a nawet konkretnego składu. Zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 9 października 2007 roku w sprawie składu oraz oznakowania suplementów diety, istnieje natomiast obowiązek odpowiedniego oznakowania produktu na opakowaniu, umieszczając: i) wyraźne określenie „suplement diety”; ii) nazwy kategorii składników odżywczych lub substancji charakteryzujących produkt lub wskazanie ich właściwości; iii) zalecaną dawkę dzienną; iv) ostrzeżenie dotyczące nieprzekraczania zalecanej dawki dziennej; v) stwierdzenie, że suplement diety nie może być stosowany jako substytut zróżnicowanej diety; vi) stwierdzenie, że suplement diety powinien być przechowywany w sposób niedostępny dla dzieci. Rejestracja trwa około roku, jest niekosztowna i prosta.

Prawo reguluje, że reklamy suplementów diety nie mogą sugerować ich właściwości leczniczych, w tym zapobiegania chorobom lub ich leczenia. Jednak wiele producentów suplementów diety nie stosuje się do tych wytycznych, przez co wiele pacjentów postrzega suplement diety jako produkt leczniczy, którym nie jest.

Niebezpieczeństwa związane z stosowaniem suplementów diety wynikają przede wszystkim z ich nieokreślonego składu, ale także z niejasnym procesem produkcyjnym oraz brakiem kontroli jakości produktu.

4.4. Probiotyki.

Probiotyki to organizmy żywe, które podane w odpowiedniej dawce mają korzystny wpływ na zdrowie organizmu gospodarza (FAO/WHO 2001). Probiotyki są używane przez ludzkość od wieków, pojawiły się wraz z fermentowaną żywnością. Metchnikoff jako pierwszy zasugerował pozytywny wpływ bakterii na florę mikrobiologiczną układu pokarmowego człowieka za co został uhonorowany Nagrodą Nobla. Odkrył on, że „zdrowe bakterie”, a w szczególności bakterie kwasu mlekowego (LAB, ang. *Lactic Acid Bacteria*) mogą mieć pozytywny wpływ na system odpornościowy i trawienie (Metchnikoff, 1907).

Preparaty probiotyczne zawierają jeden lub więcej szczepów bakterii, co do których udowodniono pozytywny wpływ na zdrowie człowieka. Większość mikroorganizmów określanych jako probiotyczne to bakterie Gram-dodatnie m.in. *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, ale także Gram-ujemne np. *Escherichia coli* oraz drożdże z rodzaju *Saccharomyces*. Ważne jest, aby organizm probiotyczny spełniał następujące kryteria: był łatwy w hodowli; był niepatogenny dla gospodarza; wywierał pozytywny wpływ na zdrowie człowieka/zwierzęcia; był zdolny do przeżycia w układzie pokarmowym

gospodarza i pozostawał żywy przez długi czas w organizmie; przylegał do błony śluzowej jelita gospodarza.

Badania wykazały, że bakterie probiotyczne odgrywają ważną rolę w modulacji immunologicznej, oddechowej i gastroenterologicznej. Szczepy probiotyczne są aktywne metabolicznie, wydzielają substancje antybakteryjne (m. in. bakteriocyny), kwas mlekowy i octowy, cytokiny, enzymy i inne substancje co pozwala im chronić nasz organizm poprzez konkutowanie z patogenami zasiedlającymi nasz układ pokarmowy (Behnsen *et al.*, 2013). Dodatkowo, udowodniono działanie terapeutyczne szczepów probiotycznych w następujących schorzeniach: biegunka poantybiotykowa (AAD, ang. *Antibiotic Associated Diarrhea*), biegunka podróży, biegunka wywołana rotawirusem, zapalenie zbiornika jelitowego, nieswoiste zapalenie jelit (IBD, ang. *Inflammatory Bowel Disease*), zespół jelita drażliwego (IBS, ang. *Irritable Bowel Syndrome*), nieżyt żołądka wywołany *Helicobacter pylori*, nietolerancja laktozy i inne (Rolfe *et al.*, 2000).

4.5. Rodzaj *Bacillus* i jego zastosowanie.

4.5.1. Ogólna charakterystyka rodzaju *Bacillus*.

Bakterie z rodzaju *Bacillus* to Gram-dodatnie, przetrwalnikujące, tlenowe lub fakultatywnie beztlenowe laseczki. Można je wyizolować z różnych środowisk, takich jak, powietrze, woda, rośliny, układ pokarmowy ludzi i zwierząt, jednak najczęściej są to bakterie bytujące w glebie. Niektóre z gatunków *Bacillus* są patogenami oportunistycznymi lub mogą produkować toksyny niebezpieczne dla ludzi i zwierząt. Rodzaj *Bacillus* jest blisko spokrewniony z rodzajem *Lactobacillus*, który jest powszechnie stosowany jako probiotyk ludzki (Elshagabee *et al.*, 2017).

4.5.2. *Bacillus* jako probiotyk.

Komercyjnie dostępne produkty probiotyczne z organizmami z rodzaju *Bacillus* zawierają około 10^9 /g lub 10^9 /ml endospor bakteryjnych. Właśnie zdolność do wytwarzania przetrwalników jest cechą, która skupiła zainteresowanie na organizmach z rodzaju *Bacillus* i ich potencjalnych właściwościach probiotycznych. Zdolne są do przeżycia w warunkach silnie kwasowych, a także są odporne na działanie soli żółci. Dodatkowo produkty te są trwałe w procesie wytwarzania oraz w przechowywaniu.

Mimo, iż są to organizmy tlenowe, bakterie z gatunku *Bacillus subtilis* zostały zidentyfikowane w próbkach kału oraz wycinkach z biopsji jelit u wybranych pacjentów (Fakhry *et al.*, 2008). Możliwe jest zatem, że jak wiele innych organizmów, przystosowały one się do wzrostu w beztlenowych warunkach naszego układu pokarmowego i są zdolne do

tworzenia biofilmu oraz beztlenowej sporulacji, a także produkcji związków o aktywności przeciwbakteryjnej. Rodzaj *Bacillus* zatem, powinien nie tylko być określany jako organizmy glebowe, ale też komensale układu pokarmowego człowieka (Tam *et al.*, 2006).

Probiotyczne szczepy *Bacillus* utrzymują homeostazę flory bakteryjnej jelit poprzez hamowanie wzrostu patogenów i wspieranie wzrostu korzystnych mikroorganizmów. Hamowanie wzrostu patogenów odbywa się poprzez wydzielanie różnych związków w tym bakteriocyn (subtilina, koagulina) i antybiotyków (surfaktanty, bacilizyna), a także działanie antyadhezyjne. Różne szczepy probiotyczne *Bacillus* hamują wzrost takich organizmów jak *Candida albicans* czy *Helicobacter pylori* (Elshaghabee *et al.*, 2017). Badania Ripert *et al.* (2016) wykazały działania szczepu probiotycznego *B. clausii* inhibitujące toksyny *Clostridium difficile* oraz *Bacillus cereus*, patogenów ludzkiego układu pokarmowego. Dodatkowo, niektóre szczepy probiotyczne *Bacillus* wykazują właściwości immunomodulacyjne (Duc *et al.*, 2000).

Na rynku dostępne są różne preparaty zawierające bakterie probiotyczne *Bacillus* między innymi: MegaSporeBiotic dostępny w Wielkiej Brytanii zawierający *Bacillus indicus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis* i *Bacillus clausii*; Enterogermina – produkt dostępny w Europie zawierający *Bacillus clausii*; THORNE – dostępny w USA zawierający *Bacillus coagulans*. Ważna jest kontrola jakości sprzedawanych produktów, ponieważ w bliskim pokrewieństwie do stosowanych organizmów są gatunki silnie toksyczne dla człowieka jak *Bacillus cereus*, powodujący silne zatrucia pokarmowe, czy *Bacillus anthracis*, będący czynnikiem etiologicznym wąglika (Elshaghabee *et al.*, 2017).

4.6. Rodzaj *Halomonas* i jego zastosowanie.

Rodzaj *Halomonas* należy do typu *Proteobacteria* i są to Gram-ujemne, ruchliwe pałeczki. Swoją nazwę zawdzięczają zdolności do wzrostu w wysokich stężeniach NaCl, określane są jako organizmy euryhaliczne (Arahal & Ventosa, 2006). *Halomonas* są w stanie przeżyć w 5-25% stężeniu NaCl w środowisku. Co więcej uważa się, że obecność chlorku sodu w środowisku jest wręcz niezbędna do ich wzrostu. Zazwyczaj izolowane są ze słonych zbiorników wodnych. (Vreeland *et al.*, 1980; Yin *et al.*, 2015).

Organizmy halofilne posiadają dwa główne mechanizmy adaptacyjne do wzrostu w wysokim zasoleniu. Pierwszy z nich to akumulowanie jonów nieorganicznych, np. KCl, w celu równoważenia ciśnienia osmotycznego. Drugi to akumulacja rozpuszczalnych w wodzie związków organicznych o niskiej masie molekularnej w celu osiągnięcia niskiego stężenia wewnątrzkomórkowego soli (Yin *et al.*, 2015).

Opublikowano kilka przypadków, w których opisywano rodzaj *Halomonas* jako patogen ludzki. Jednym z nich jest praca Stevens *et al.* (2009), którzy wyizolowali 3 potencjalnie patogenne szczepy *Halomonas* w centrum dializ, które prawdopodobnie przedostały się tam z dwuwęglanem używanym jako płyn do infuzji.

Rodzaj *Halomonas* ze względu na swoje przystosowanie do ekstremalnych warunków ma potencjał w biotechnologii przemysłowej. Obecnie organizmy z tego rodzaju wykorzystywane są do produkcji polihydroksyalkanianów (PHA – ang. *polyhydroxyalkanoates*) – biodegradowalnych polimerów będących alternatywą do tradycyjnych tworzyw sztucznych; ektoiny oraz hydrosyektoiny – używane jako środki do ochrony skóry ludzkiej (m. in. w kremach z filtrem słonecznym); a także biosurfaktantów, bioemulgatorów oraz halofilnych enzymów (Yin *et al.*, 2015).

Ze względu na zmieniającą się taksonomię rodziny *Halomonadaceae*, wciąż nie można określić, które gatunki są przemysłowo użyteczne, a które niebezpieczne, co powinno być obiektem szerszych badań (Arahal & Ventosa, 2006).

5. MATERIAŁY.

5.1. Szczepy *Arthrospira*.

Tabela 1. Szczepy *Arthrospira* wykorzystane w badaniach.

<i>Lp.</i>	<i>Szczep</i>	<i>Pochodzenie*</i>
1	<i>Arthrospira fusiformis</i> AB2002/2	Jezioro Sonahi, Kenia
2	<i>Arthrospira fusiformis</i> AB2002/4	Jezioro Nakuru, Kenia
3	<i>Arthrospira</i> sp. PCC 9444	Jezioro Santa Olalla, Hiszpania
4	<i>Arthrospira</i> sp. Moz 1	Staw, Maputo, Mozambik
5	<i>Arthrospira</i> sp. Moz 2	Staw, Maputo, Mozambik
6	<i>Arthrospira</i> sp. BURMA	Mjanma (Birma)
7	<i>Spirulina platensis</i> SAG21.99	Laguna Walfishbay, Namibia
8	<i>Spirulina maxima</i> SAG49.88	Włochy
9	<i>Arthrospira platensis</i> PCC 9438(C1)	Jezioro Badou, Kanem, Czad
10	<i>Arthrospira</i> sp. PCC 8005	Indie, Kenia, Meksyk lub Peru
11	<i>Arthrospira</i> sp. Mad	Indie
12	<i>Arthrospira</i> sp. CCALA030	Jezioro Natron, Czad
13	<i>Arthrospira</i> sp. LV	Lac Vert, Kongo
14	<i>Arthrospira platensis</i> str. Paracas	Peru
15	<i>Arthrospira</i> sp. M3.10	Etiopia
16	<i>Arthrospira fusiformis</i> CCALA023	Jezioro Nakuru, Kenia
17	<i>Arthrospira</i> sp. PCC 8006	Indie, Kenia, Meksyk lub Peru
18	<i>Arthrospira platensis</i> PCC 7345	Bagno Del Mar Slough, Kalifornia, USA
19	<i>Arthrospira</i> sp. PCC 9901	Jezioro Chagannao'er, Środkowa Mongolia, Chiny
20	<i>Arthrospira</i> sp. Omsk F	Alkaliczne jeziorko, Syberia, Rosja
21	<i>Arthrospira</i> sp. Omsk H	Alkaliczne jeziorko, Syberia, Rosja

- Informacje o pochodzeniu poszczególnych szczepów uzyskano z bazy danych Instytutu Pasteura (PCC) oraz bazy danych z informacjami o cyjanobakteriach CyanoBase.

5.2. Suplementy diety zawierające biomasę *Arthrospira* wykorzystane w badaniach.

Tabela 2. Charakterystyka produktów zawierających suchą biomasę *Arthrospira* dostępnych na polskim rynku.

<i>Lp</i>	<i>Producent</i>	<i>Kraj pochodzenia</i>	<i>Postać</i>
1	Parry Nutraceuticals	Indie	Tabletki
2	Biogate Polden	Chiny	Proszek
3	Cyanotech	USA (Hawaje)	Tabletki
4	Norland	Mongolia	Tabletki
5	Green Essence	Pakistan	Tabletki
6	Febico	Tajwan	Tabletki
7	Swanson	Indie	Tabletki

5.3. Referencyjne szczepy bakteryjne użyte w badaniach.

W badaniach użyto szczepów referencyjnych: *Escherichia coli* ATCC 8738, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 oraz *Candida albicans* ATCC II.

5.4. Podłoża mikrobiologiczne.

5.4.1. Pożywki do hodowli sinic.

5.4.1.1. Podłoże płynne.

Podłoże płynne Zarrouk

Makroelementy (g/l wody dejonizowanej):

K ₂ HPO ₄	0,5
NaHCO ₃	10,8
NaNO ₃	2,5
Na ₂ CO ₃	7,6
K ₂ SO ₄	1,0
NaCl	1,0
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,04
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,01
EDTANa ₂ , 2H ₂ O	0,08

Mikroelementy – dodano w ilości 1ml na 1litr podłoża:

Roztwór soli A5 (g/l wody dejonizowanej):

H ₃ BO ₃	2,86
MnCl ₂ , 4H ₂ O	1,81
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,222
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,079
MoO ₃	0,015

Roztwór soli B6 (g/l wody dejonizowanej):

NH ₄ VO ₃	0,023
K ₂ Cr(SO ₄), 12H ₂ O	0,096
NiSO ₄ , 7H ₂ O	0,048
Co(NO ₃) ₂ , 6H ₂ O	0,049
Na ₂ WO ₄ , 2H ₂ O	0,018
Ti(SO ₄) ₂ + TiOSO ₄	0,048

Pożywkę sporządzono łącząc ze sobą wszystkie wyżej wymienione wyjałowione składniki, a następnie otrzymany roztwór przechowywano w jałowej szklanej butelce w temperaturze 2-5°C.

5.4.1.2. Podłoża stałe.

Podłoże stałe Zarrouk

Składniki na 1 litr podłoża:

Podłoże płynne Zarrouk	500 ml
Agar 2,8%	500 ml

5.4.2. Podłoża do izolacji i hodowli bakterii symbiotycznych z preparatów z biomasą *Arthrospira*.

5.4.2.1. Podłoża płynne.

Podłoże płynne Zarrouk z ekstraktem z *Arthrospira* oraz 1% glukozą.

Składniki na 1 litr podłoża:

Podłoże płynne Zarrouk	500 ml
Ekstrakt z <i>Arthrospira</i>	200 ml
Płyn Ringera	200 ml
Roztwór 10% glukozy	100 ml

Składniki na 1 litr płynu Ringera:

Chlorek sodu	8,6 g
Chlorek potasu	0,3 g
Chlorek wapnia sześciowodny	0,48 g
Woda dejonizowana	1000 ml

Podłoże płynne Zarrouk z ekstraktem z *Arthrospira* oraz 0,5% ksylozą.

Składniki na 1 litr podłoża:

Podłoże płynne Zarrouk	550 ml
Ekstrakt z <i>Arthrospira</i>	200 ml
Płyn Ringera	200 ml
Roztwór 10% ksylozy	50 ml

Podłoże płynne Zarrouk z ekstraktem z *Arthrospira* oraz 0,5% ramnozą.

Składniki na 1 litr podłoża:

Podłoże płynne Zarrouk	550 ml
Ekstrakt z <i>Arthrospira</i>	200 ml
Płyn Ringera	200 ml
Roztwór 10% ramnozy	50 ml

5.4.2.2. Podłoża stałe.

Podłoże stałe Zarrouk z ekstraktem z *Arthrospira* oraz 1% glukozą.

Składniki na 1 litr podłoża:

Podłoże płynne Zarrouk	300 ml
Ekstrakt z <i>Arthrospira</i>	100 ml
Roztwór 10% glukozy	100 ml
3% roztwór agaru	500 ml

Podłoże stałe Zarrouk z ekstraktem z *Arthrospira* oraz 0,5% ksylozą.

Składniki na 1 litr podłoża:

Podłoże płynne Zarrouk	350 ml
Ekstrakt z <i>Arthrospira</i>	100 ml
Roztwór 10% ksylozy	50 ml
3% roztwór agaru	500 ml

Podłoże stałe Zarrouk z ekstraktem z *Arthrospira* oraz 0,5% ramnozą.

Składniki na 1 litr podłoża:

Podłoże płynne Zarrouk	350 ml
Ekstrakt z <i>Arthrospira</i>	100 ml
Roztwór 10% ramnozy	50 ml
3% roztwór agaru	500 ml

5.4.3. Podłoża mikrobiologiczne wykorzystywane do hodowli bakterii i grzybów oraz testów biochemicznych.**Bulion kazeinowo-sojowy (TSB – Tripcase Soy Broth)**

Składniki na 1 litr podłoża:

Trzustkowy hydrolizat kazeiny	17g
Hydrolizat papainowy mączki sojowej	3g
NaCl	5g
KHPO ₄	2,5g
Dekstroza	2,5g

Bulion MacConkeya

Składniki na 1 litr podłoża:

Trzuskowy hydrolizat żelatyny	17g
Trzustkowy hydrolizat kazeiny	1,5g
Hydrolizat pepsynowy tkanki zwierzęcej	1,5g
Laktoza	10g
Sole żółciowe	1,5g
NaCl	5g
Czerwień obojętna	0,03g
Fiolet metylowy	0,001g

Podłoże stałe MacConkeya

Składniki na 1 litr podłoża:

Trzuskowy hydrolizat żelatyny	17g
Trzustkowy hydrolizat kazeiny	1,5g
Hydrolizat pepsynowy tkanki zwierzęcej	1,5g

Laktoza	10g
Sole żółciowe	1,5g
NaCl	5g
Czerwień obojętna	0,03g
Fiolet metylowy	0,001g
Agar	13,5g
pH=7,1-7,2	

Podłoże Chapmana (Mannitol Salt Agar)

Składniki na 1 litr podłoża:

Wyciąg wołowy	1g
Trzustkowy hydrolizat kazeiny	5g
Hydrolizat pepsynowy tkanki zwierzęcej	5g
NaCl	75g
D-Mannitol	10g
Czerwień fenolowa	0,025g
Agar	15g

Podłoże płynne Mueller-Hintona

Składniki na 1 litr podłoża:

Wyciąg wołowy	2g
Kwaśny hydrolizat kazeiny	17,5g
Skrobia	1,5g

Podłoże stałe Mueller-Hintona

Składniki na 1 litr podłoża:

Wyciąg wołowy	2g
Kwaśny hydrolizat kazeiny	17,5g
Skrobia	1,5g
Agar	17g

Podłoże krwawe (Columbia Agar)

Składniki na 1 litr podłoża:

Kazeina strawiona wyciągiem trzustkowym	12g
---	-----

Tkanka zwierzęca strawiona pepsyną	5g
Wyciąg z drożdży	3g
Wyciąg bydlęcy	3g
Skrobia kukurydziana	5g
NaCl	5g
Agar	13,5g
Krew barania, bez włókna	5%

Podłoże do hodowli alkalofilnych halobakterii (Halomonas Medium)

Składniki na 1 litr podłoża:

Ekstrakt drożdżowy	10g
Cytrynian sodowy	3g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1g
Na ₂ CO ₃	3g
NaCl	100g
Mikroelementy A5 (<i>Materiały 5.4.1.1.</i>)	1 ml
Mikroelementy B5 (<i>Materiały 5.4.1.1.</i>)	1ml

Bulion Mossela (bulion EE – Enterobacteria Enrichment Broth)

Składniki na 1 litr podłoża:

Trzustkowy hydrolizat żelatyny	10g
Glukoza bezwodna	4,5g
Sole żółci	3,055g
KH ₂ PO ₄	2g
Na ₂ HPO ₄	6,4g
Zieleń brylantowa	0,015g
pH=7,0-7,4	

Bulion Rappaporta-Vasilidiasa

Składniki na 1 litr podłoża:

Pepton sojowy	4,5g
NaCl	8g
KH ₂ PO ₄	0,6g
K ₂ HPO ₄	0,4g

MgCl ₂	13,58g
Zieleń malachitowa	0,036g
pH=5,0-5.4	

Podłoże XLD (Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar)

Składniki na 1 litr podłoża:

Ksyloza	3,5g
L-lizyna	5g
Laktoza	7,5g
Sacharoza	7,5g
NaCl	5g
Wyciąg drożdżowy	3g
Czerwień fenolowa	0,08g
Dezoksycholan sodu	2,5g
Tiosiarczan sodowy	6,8g
Cytrynian amonowo-żelazowy	0,8g
Agar	13,5g
pH=7,2-7,6	

Podłoże Sabourauda

Składniki na 1 litr podłoża:

Trzustkowy hydrolizat kazeiny	5g
Hydrolizat pepsynowy tkanki zwierzęcej	5g
Glukoza	40g
Agar	15g

W modyfikacji tego podłoża z dodatkiem chloramfenikolu dodatkowo:

Chloramfenikol	0,4g
pH=5,4-5,8	

Podłoże VRBG (Violet Red Bile Glucose Agar)

Składniki na 1 litr podłoża:

Tkanka zwierzęca strawiona enzymatycznie	7g
Ekstrakt drożdżowy	3g
Sole żółci	1,5g

NaCl	5g
Czerwień neutralna	0,03g
Fiolet krystaliczny	0,002g
Glukoza	10g
Agar	12g
pH=7,2-7,6	

Podłoże MYP Agar (Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar)

Składniki na 1 litr podłoża:

Ekstrakt mięsny	1g
Pepton	10g
Mannitol	10g
Chlorek sodu	10g
Czerwień fenolowa	0,025g
Emulsja żółtka jaja kurzego	100ml
Polimyksyna	25,000U
Agar	14g
pH=7,0-7,4	

5.5. Bufory i enzymy używane do izolacji DNA genomowego.

Bufor TE (Tris 50mM, EDTA 40mM, pH=8,0)

Odważone Tris i EDTA uzupełniano wodą dejonizowaną do określonej objętości, a następnie, doprowadzono pH roztworu do 8,0 przy użyciu stężonego kwasu solnego oraz roztworu wodorotlenku sodu

Bufor TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH=8,0)

Odważone Tris i EDTA uzupełniano wodą dejonizowaną do określonej objętości, a następnie, doprowadzono pH roztworu do 8,0 przy użyciu stężonego kwasu solnego oraz roztworu wodorotlenku sodu.

- Lizozym (100 mg/ml)
- 10% roztwór SDS (laurylosiarczan sodu)
- proteinaza K (20 mg/ml)
- 5M roztwór NaCl

- mieszanina CTAB (bromek cetrymoniu)/NaCl
4,1 g NaCl rozpuszczono w 80 ml wody, a następnie stopniowo dodawano 10 g CTAB jednocześnie podgrzewając mieszaninę do 65°C.
- Mieszanina chloroform : alkohol izoamylowy (24:1)
- Mieszanina fenol : chloroform : alkohol izoamylowy (25:24:1)
- Izopropanol
- 70% etanol
- RNAza (10mg/ml)
- Woda dejonizowana

5.6. Testy i odczynniki wykorzystane do identyfikacji bakterii.

Krażki bibułowe nasączone antybiotykiem do określania wrażliwości bakterii.

Nowobiocyna 2 µg

Odczynniki do test na obecność katalazy

Woda utleniona (Laboratorium Galwenowe Olsztyn)

Odczynnik do testu na obecność koagulazy

Osocze królicze (IBSS BioMed)

Sól fizjologiczna (0,9% NaCl)

Komercyjnie dostępne testy do identyfikacji *Staphylococcus*

- STAPHYtest 24 firmy PLIVA-Lachema Diagnostika
- M43 MICROGEN STAPH firmy Microgen Bioproducts.

5.7. Odczynniki do barwienia metodą Grama.

Płyn Lugola

Jod sublimowany 0,33 g

Jodek potasu 0,66 g

Woda dejonizowana do 100 ml

Rozpuszczono jodek potasu w 75 ml wody dejonizowanej i zostawiono na noc do rozpuszczenia. Następnie dodano jod i uzupełniono wodą do 100 ml.

Fiolet krystaliczny

Przygotowywano roztwór wyjściowy o składzie:

Fiolet krystaliczny 0,4 g

95% alkohol etylowy 10 ml

Następnie do 10ml roztworu wyjściowego dodawano 100 ml 1% fenolu.

Alkohol etylowy 96%

Fuksyna zasadowa

Przygotowywano roztwór wyjściowy o składzie:

Fuksyna zasadowa 10 g

96% alkohol etylowy 100 ml

Następnie do 10ml roztworu wyjściowego dodawano 90 ml 5% fenolu.

5.8. Odczynniki wykorzystywane do reakcji amplifikacji DNA.

Tabela 3. Lista odczynników używanych do reakcji amplifikacji PCR.

<i>Nazwa odczynnika</i>	<i>Nazwa producenta</i>	<i>Stężenie odczynnika</i>
<i>Bufor do polimerazy Taq Buffer (10X) z KCl</i>	Thermo Scientific TM	10x stężony
<i>Bufor do polimerazy Dream TaqTM Buffer (10X)</i>	Thermo Scientific TM	10x stężony
<i>Roztwór dNTPs</i>	Thermo Scientific TM	2mM
<i>Roztwór MgCl₂</i>	Thermo Scientific TM	25mM
<i>Roztwór BSA</i>	Merck	10mg/ml
<i>Roztwór glicerolu</i>	POCH S.A.	60%
<i>Polimeraza Taq DNA</i>	Thermo Scientific TM	5U/μl
<i>Polimeraza Dream TaqTM</i>	Thermo Scientific TM	5U/μl
<i>Dejonizowana woda</i>	Merck	100%
<i>DNA</i>	-	50-400 μg/μl

5.9. Startery zaprojektowane do amplifikacji fragmentów genów.

Tabela 4. Lista zaprojektowanych starterów

Nazwa startera	Amplifikowany fragment genu	Wielkość produktu (bp)	Sekwencja startera (5'-3')	Kierunek amplifikacji	T _m (°C)
<i>AsuIIM_F</i> <i>AsuIIM_R</i>	metylotransferaza <i>AsuII</i>	594	ATCGCCTCAGCAGAAGTGAT CTCTCATAATCGGCTGATTG	forward reverse	56
<i>AsuIIR_F</i> <i>AsuIIR_R</i>	endonukleaza <i>AsuII</i>	578	TGTAATCTCCATTGTAAAGC ATAAAAACTCTGTGTTCTGA	forward reverse	50
<i>AvaIM_F</i> <i>AvaIM_R</i>	metylotransferaza <i>AvaI</i>	409	AGTATCCTTTCACCATCTA CCTACACAGCAAATTGAACT	forward reverse	50
<i>AvaIR_F</i> <i>AvaIR_R</i>	endonukleaza <i>AvaI</i>	158	CTGAGATAGTCCTGCTGCCG TTGTAGCACTGGCACTGGAG	forward reverse	58
<i>NheIM_F</i> <i>NheIM_R</i>	metylotransferaza <i>NheI</i>	794	ATATCCGCACTGTATCTGTAA GATAGGTCCTTGACCAGTTCG	forward reverse	56
<i>NheIR_F</i> <i>NheIR_R</i>	endonukleaza <i>NheI</i>	321	GTTCAACCAAGTAGATATTACAC GACTTATTAGGGGTGCTAAC	forward reverse	56
<i>HindIIIM_F</i> <i>HindIIIM_R</i>	metylotransferaza <i>HindIII</i>	724	TGTATCGAAGTGATGAAGTC CTTGCCAATTCACAATATTC	forward reverse	56
<i>HindIIIR_F</i> <i>HindIIIR_R</i>	endonukleaza <i>HindIII</i>	836	CTCAAGTAATTCAGAAGATGC ATCAGTTCATCACAGCTTC	forward reverse	56
<i>SacIIM_F</i> <i>SacIIM_R</i>	metylotransferaza <i>SacII</i>	398	TTGACCTCATTCAGGGGGC TTGCCAATCTTCTCGGACCC	forward reverse	56
<i>SacIIR_F</i> <i>SacIIR_R</i>	endonukleaza <i>SacII</i>	263	GACCGCTCCAAGCATCTGTA ACAGAGAAGGACTGCATGGC	forward reverse	56
<i>Cas1_F</i> <i>Cas1_R</i>	<i>cas1</i>	375	CGACACCACCAACAGATCA AACCAGAACAGAGCSAAGGG	forward reverse	54
<i>Cas2_F</i> <i>Cas2_R</i>	<i>cas2</i>	207	TGGTTGGTTTGCTACGACGT AGTCGAGGGATTGAGGGGAT	forward reverse	58
<i>Cmr6_F</i> <i>Cmr6_R</i>	<i>cmr6</i>	428	TGTGACGACCCGACGATTTT TCCCGTTGAGTAACCTTGCC	forward reverse	58
<i>Csm3_F</i> <i>Csm3_R</i>	<i>csm3</i>	390	CGCGATCCGGTGAGTCAATA TGTTACGAAGTTGCTCGGCT	forward reverse	56
<i>Csm4_F</i> <i>Csm4_R</i>	<i>csm4</i>	252	CGGTGGGGAATGACTTGGA AGAAATTGGTCGCCCCGAGTT	forward reverse	58
<i>Csm5_F</i> <i>Csm5_R</i>	<i>csm5</i>	328	TTACACATTGGCTCTGCGGT TGCCGGGAATGTAAAGCTGT	forward reverse	52

5.10. Startery użyte do amplifikacji fragmentów genów.

Tabela 5. Lista użytych starterów do reakcji amplifikacji PCR operonu rybosomalnego.

Nazwa startera	Amplifikowany fragment genu	Wielkość produktu	Sekwencja startera (5'-3')	źródło
16S3'F/ CL I SUB A	ITS klaster I.A	329	F TGYGGCTGGATCACCTCCTT	Sheldeman <i>et al.</i> , 1997
			R CTCACCCCAACTAGCACCTAATTCT	Baurain <i>et al.</i> , 2002
16S3'F/ CL I SUB B	ITS klaster I.B	329	F TGYGGCTGGATCACCTCCTT	Sheldeman <i>et al.</i> , 1997
			R CTCACCCCAACTAGCACCTAATTAA	Baurain <i>et al.</i> , 2002
CL II SUB A/ Long 23S5'R	ITS klaster II.A	225	F AGTTGGGGTGAGATGAGATGAGATG	Baurain <i>et al.</i> , 2002
			R TCTGTGTGCCTAGGTATCCACCGTT	Wilmotte <i>et al.</i> , 1993
CL II SUB B/ Long 23S5'R	ITS klaster II.B	225	F AGTTGGGGTGAGATGAGATGAGGTT	Baurain <i>et al.</i> , 2002
			R TCTGTGTGCCTAGGTATCCACCGTT	Wilmotte <i>et al.</i> , 1993
16S3'F /ITS_CL_III	ITS klaster I.C	453	F TGYGGCTGGATCACCTCCTT	Sheldeman <i>et al.</i> , 1997
			R TTGACTATCAGAGGAAATCCG	Waleron <i>et al.</i> 2018
27f 1492r	16S rRNA	1500	F AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Lane, 1991
			R TACGGYTACCTTGTTACGACTT	Turner <i>et al.</i> 1999

5.11. Odczynniki do reakcji trawienia genomowego DNA *Arthrospira*.

W mieszaninach zastosowano enzymy restrykcyjne wraz z buforami (Tabela 6), wodę dejonizowaną (Merck) oraz DNA genomowe *Arthrospira* w stężeniu 50-400 µg/µl.

Tabela 6. Charakterystyka stosowanych enzymów restrykcyjnych wraz z buforami do reakcji trawienia genomowego DNA.

<i>Enzym restrykcyjny</i>	<i>Stosowany bufor</i>	<i>Nazwa producenta</i>
<i>Bsh</i> NI (<i>Hgi</i> CI) 10U/µl	Bufor O 10x stężony	Thermo Scientific™
<i>Nhe</i> I 10U/µl	Bufor Tango 10x stężony	Thermo Scientific™
<i>Sp</i> II (<i>Pfl</i> 23II) 10U/µl	Bufor Tango 10x stężony	Thermo Scientific™
<i>Hin</i> II (<i>Acy</i> I) 10U/µl	Bufor G 10x stężony	Thermo Scientific™
<i>Eco</i> 88I (<i>Ava</i> I) 10U/µl	Bufor Tango 10x stężony	Thermo Scientific™
<i>Bsp</i> 143I (<i>Mbo</i> I) 10U/µl	Bufor Bsp143I 10x stężony	Thermo Scientific™
<i>Mph</i> 1103I (<i>Ava</i> III) 10U/µl	Bufor R 10x stężony	Thermo Scientific™
<i>Cfr</i> 42I (<i>Sac</i> II) 10U/µl	Bufor B 10x stężony	Thermo Scientific™
<i>Bsp</i> PI (<i>Bin</i> I) 10U/µl	Bufor Tango 10x stężony	Thermo Scientific™
<i>Bsp</i> 1191I (<i>Asu</i> II) 10U/µl	Bufor Tango 10x stężony	Thermo Scientific™

5.12. Odczynniki do rozdzielu elektroforetycznego.

Bufor wyjściowy TAE 50x

Tris	54 g
Kwas borowy	27,5 g
EDTA 0,5M pH 8	20 ml
Woda dejonizowana	do 1000 ml

Stosowane rozcieńczenia

Bufor TAE 0,5x do rozdzielu elektroforetycznego produktów reakcji PCR oraz genomowego DNA

Bufor TAE 1x do elektrodziału elektroforetycznego produktów analizy restrykcyjnej

Bufor obciążający - DNA Gel Loading Dye (6x) (Thermo Scientific ®)

Agaroza – Prona Agarose Basica LE

Marker DNA Ladder 500 bp (Thermo Fischer Scientific)

Barwienie żeli agarozowych – SERVA DNA Stain G (SERVA) – 1,5 µl/100ml żelu agarozowego

5.13. Odczynniki użyte w celu potwierdzenia obecności środków konserwujących w suplementach diety *Arthrospira*.

Rozcieńczalnik

Skład:

Trzuskowy hydrolizat kazeiny	1g
NaCl	8,5g
Woda destylowana	1000ml

pH końcowe: $7,0 \pm 0,2$

Warunku wyjaławiania w autoklawie: 121,0 °C, 15 min

Eugon LT 1000 (neutralizator)

Skład:

Trzuskowy hydrolizat kazeiny	15g
Papainowy hydrolizat soi	5g
NaCl	4g
L-cysteina	0,7g
Siarczyn sodu	0,2g
Głukoza	5,5g
Lecytyna z jajka kurzego	1g
Polisorbat 80	5g
Octoxynol 9	1g
Woda destylowana	1000ml

Warunki wyjaławiania w autoklawie: 121,0 °C, 15 min

Roztwór 0,9% chlorku sodu

Skład:

NaCl	9,0 g
------	-------

Woda destylowana do 1000,0 g

Warunki wyjaławiania w autoklawie: 121,0 °C, 15 min.

5.14. Odczynniki i podłoża użyte w badaniu właściwości przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych.

Podłoże płynne Mueller-Hintona (Materiały 2.4.3.)

Podłoże płynne Saburaud (Materiały 2.4.3.)

Metanol

Woda dejonizowana

5.15. Używana aparatura.

Mieszadło typu Vortex,

Wirówka Eppendorf Centrifuge 5418,

Waga laboratoryjna,

Termocykler Thermal Cycler T100 (BIO RAD),

Aparat do rozdzielu elektroforetycznego typu Mupid-ONE,

Mikroskop z kamerą cyfrową Nikon Eclipse E600,

Kuchenka mikrofalowa Amica

ChemiDoc® Touch BioRad,

Liofilizator Ehrist ALPHA I-6.

5.16. Genomy użyte w analizach porównawczych *in silico*.

Genomy cyjanobakterii z rzędu *Oscillatoriales* przedstawione w pracy Shih *et al.* (2012) oraz genomy *Arthrospira* dostępne w serwisie GenBank wykorzystane do analiz bioinformatycznych przedstawiono w Tabeli 7.

Tabela 7. Sekwencje genomów cyjanobakterii pozyskane z publicznej bazy danych GenBank użwraz z numerem akcesji, które wykorzystano do analiz porównawczych *in silico*.

Szczep	Nr akcesji GenBank
<i>Arthrospira maxima</i> CS-328	ABYK00000000.1
<i>Arthrospira platensis</i> C1	AFXD00000000
<i>Arthrospira platensis</i> NIES-39	AP011615
<i>Arthrospira platensis</i> str. Paraca	ACSK00000000
<i>Arthrospira platensis</i> YZ	CP013008

<i>Arthrospira</i> sp. PCC 8005	ADDH00000000
<i>Arthrospira</i> sp. TJSD091	LAYT00000000
<i>Arthrospira</i> sp. TJSD092	CP028914
<i>Chamaesiphon minutus</i> PCC 6605	CP003600.1
<i>Coleofasciculus chthonoplastes</i> PCC 7420	ABRS00000000.1
<i>Geitlerinema</i> sp. PCC 7105	ANFQ00000000
<i>Geitlerinema</i> sp. PCC 7407	CP003591.1
<i>Leptolyngbya boryana</i> PCC 6306	ALVM00000000
<i>Leptolyngbya</i> sp. Heron Island J	AWNH00000000
<i>Leptolyngbya</i> sp. JSC-1	JMKF00000000
<i>Leptolyngbya</i> sp. KIOST-1	JQFA00000000
<i>Leptolyngbya</i> sp. NIES-2104	BBWW00000000
<i>Leptolyngbya</i> sp. NIES-3755	AP017308.1
<i>Leptolyngbya</i> sp. O-77	AP017367.1
<i>Leptolyngbya</i> sp. PCC 6406	ALVV00000000
<i>Leptolyngbya</i> sp. PCC 7375	ALVN00000000
<i>Leptolyngbya</i> sp. PCC 7376	CP003946.1
<i>Lyngbya aestuarii</i> BL J	AUZM00000000
<i>Lyngbya confervoides</i> BDU141951	JTHE00000000
<i>Microcoleus</i> sp. PCC 7113	CP003630.1
<i>Microcoleus vaginatus</i> FGP-2	AFJC00000000
<i>Moorea producens</i> 3L	AEPQ00000000
<i>Moorea producens</i> JHB	CP017708.1
<i>Moorea producens</i> PAL-8-15-08-1	CP017599.1
<i>Nodosilinea nodulosa</i> PCC 7104	ALVP00000000
<i>Oscillatoria acuminata</i> PCC 6304	CP003607.1
<i>Oscillatoria formosa</i> PCC 6407	ALVI00000000
<i>Oscillatoria nigro-viridis</i> PCC 7112	CP003614.1
<i>Oscillatoria</i> sp. PCC 10802	ANKO00000000
<i>Prochlorothrix hollandica</i> PCC 9006	ANKN00000000
<i>Pseudanabaena biceps</i> PCC 7429	ALWB00000000
<i>Pseudanabaena</i> sp. PCC 6802	ALVK00000000
<i>Pseudanabaena</i> sp. PCC 7367	CP003592.1
<i>Spirulina subsalsa</i> PCC 9445	ALVR00000000
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 6312	CP003558.1
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7336	ALWC00000000
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7502	CP003594.1
<i>Trichodesmium erythraeum</i> IMS101	CP000393.1

6. METODY.

6.1. Przygotowanie pożywek mikrobiologicznych.

6.1.1. Przygotowanie pożywki Zarrouk.

Wszystkie roztwory makroelementów (*Materiały* 5.3.1.1) zostały oddzielne wyjałowione w autoklawie (121 °C, 20 min), z wyjątkiem roztworu FeSO₄, który był jałowiony poprzez filtrowanie (filtry nitrocelulozowe 0,45 µm, firma Sartorius). Jałowe roztwory makro- i mikroelementów były ze sobą łączone w warunkach aseptycznych, a następnie uzupełniano do żądanej objętości wodą jałową, demineralizowaną.

W celu uzyskania podłoża stałego Zarrouk, 2,8% roztwór agaru był jałowiony w autoklawie (120 °C, 20 min), a następnie łączony z płynną pożywką Zarrouk i wylewany na gorąco na jałowe, plastikowe szalki Petriego (*Materiały* 5.3.1.2).

6.1.2. Przygotowanie ekstraktu z *Arthrospira*.

W celu uzyskania ekstraktu z *Arthrospira*, prowadzono hodowle *Arthrospira* sp. PCC 8005 oraz *Arthrospira* sp. PCC 9901 w kolbie płaskodennej z wytrząsaniem przez minimum 3 miesiące. Następnie biomasa była oddzielana od pożywki (ekstrakt z *Arthrospira*) poprzez wirowanie w plastikowych probówkach typu Falcon (50 ml) i zbierana do jałowej butelki z ciemnego szkła. Następnie ekstrakt był filtrowany oraz przechowywany w jałowych butelkach w temperaturze 4-6 °C.

6.2. Izolacja bakterii symbiotycznych z komercyjnych preparatów z biomasą *Arthrospira* (Spirulina).

0,5 g preparatu (1 tabletka) roztarto w jałowym moździerzu i zawieszono w 10 ml jałowej wody. Następnie zawiesinę rozcieńczono w stosunku 1:10 w płynnym podłożu z ekstraktem z *Arthrospira*, glukozą i pożywką Zarrouk (*Materiały* 5.4.2.1). 100 µl zawiesiny przeniesiono na stałe podłoże z ekstraktem z *Arthrospira*, glukozą i pożywką Zarrouk (*Materiały* 5.4.2.2.). Następnie płytki inkubowano 7 dni w temperaturze 35°C. Kolonie bakteryjne, które wyrosły na podłożu, przesiano na podłoża i poddano charakterystyce morfologicznej, biochemicznej i fizjologicznej.

6.3. Hodowla mikroorganizmów.

6.3.1. Hodowla cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira*.

Hodowle szczepów *Arthrospira* były prowadzone na podłożu płynnym oraz stałym Zarrouk (*Materiały* 5.1).

Hodowle płynne prowadzone były w szklanych butelkach 100ml, kolbach płaskodennych 200 ml, 2 litrowych oraz 25 ml plastikowych butelkach do hodowli tkankowych. Objętości hodowli w poszczególnych naczyniach hodowlanych przedstawia Tabela 8.

Tabela 8. Charakterystyka używanych naczyń laboratoryjnych do hodowli cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira*.

<i>Naczynie hodowlane</i>	<i>Objętość hodowli</i>
<i>Szklane butelki 100ml</i>	20ml
<i>Szklane kolby płaskodenne 200 ml</i>	50ml
<i>Szklane kolby płaskodenne 2l</i>	1l
<i>Plastikowe butelki do hodowli tkankowych 250ml</i>	20ml

W celu założenia nowej hodowli płynnej, do świeżej pożywki Zarrouk dodawano 1/10 objętości płynnej biomasy *Arthrospira* za pomocą jałowej, szklanej pipety Pasteura. Hodowle prowadzone były w pomieszczeniu fitotronowym ze stałą temperaturą 35 °C oraz natężeniem światła pomiędzy 30-100 $\mu\text{mol/s m}^2$, bez fotoperiodu. Wyjątkiem była hodowle szczepu *Arthrospira* sp. Omsk, która prowadzone była w temperaturze 21 °C.

Hodowle na podłożu stałym Zarrouk szczepów *Arthrospira* prowadzone były na szalkach Petriego. W celu założenia nowej hodowli, na płytkę nakrapiano 0,5 ml płynnej biomasy *Arthrospira* za pomocą jałowej, szklanej pipety Pasteura. Hodowle na podłożu stałym prowadzone były w fitotronie w warunkach oświetlenia i temperatury identycznych co hodowle płynne.

6.3.2. Hodowla bakterii symbiotycznych *Arthrospira* wyizolowanych z suplementów diety Spirulina.

Hodowla izolatów bakteryjnych była prowadzona na podłożu stałym z pożywką Zarrouk, ekstraktem z *Arthrospira* oraz 1% glukozą lub 0,5% ksylozą na plastikowych, jednorazowych płytkach Petriego w temperaturze 35 °C (*Materiały* 5.4.2.). Wszystkie szczepy były również przechowywane w 25% roztworze glicerolu w temperaturze – 80 °C.

6.3.3. Hodowla referencyjnych szczepów bakterii i grzybów.

Hodowla referencyjnych szczepów bakteryjnych *Escherichia coli* ATCC 8738 oraz *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 była prowadzona na stałych podłożu Muller-Hinton II w temperaturze 37 °C. Hodowla szczepu *Candida albicans* ATCC II była prowadzona na stałym podłożu Sabouraud w temperaturze 25 °C.

6.4. Izolacja genomowego DNA.

6.4.1. Izolacja genomowego DNA zmodyfikowaną metodą CTAB.

Około 200 µl świeżej biomasy *Arthrospira* (hodowanej 3-5 tygodni) lub 2 ml całonocnej hodowli bakteryjnej umieszczano w 2 ml probówce wirowniczej typu Eppendorf, wirowano 14000 rpm (obroty na minutę ang. *revolutions per minute*), a następnie usuwano supernatant. W przypadku sproszkowanej biomasy *Arthrospira* (w formie pudru, tabletki bądź kapsułki – odpowiednio roztarte w moździerzu), zostało odważone 0,5g, a następnie wykonano następujące kroki:

1. Materiał został zawieszony w 500 µl gorącego (50 °C) buforu TE (50mM Tris, 40mM EDTA, pH=8,0). Wymieszano zawartość probówki na mieszadle typu Vortex.
2. Wirowano 14000 rpm przez 5 minut.
3. Supernatant usunięto, a osad został zawieszony w 740µl buforu TE (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH=8,0). Wymieszano zawartość probówki na mieszadle typu Vortex.
4. Dodano 20µl lizozymu (stężenie 100mg/ml). Wymieszano zawartość probówki na mieszadle typu Vortex.
5. Inkubowano 30-60 minut w temperaturze 37°C. Następnie zamrożono w temperaturze – 80 °C.
6. Dodano 40µl roztworu 10% SDS. Wymieszano zawartość probówki na mieszadle typu Vortex
7. Dodano 4µl roztworu proteinazy K (stężenie 20mg/ml). Wymieszano zawartość probówki na mieszadle typu Vortex.
8. Inkubowano 1 godzinę w temperaturze 56°C (lub też do momentu uzyskania klarownej zawiesiny).
9. Dodano 100µl roztworu 5M NaCl. Wymieszano zawartość probówki na mieszadle typu Vortex.
10. Dodano 100µl podgrzanego do 65°C roztworu CTAB/NaCl. Wymieszano zawartość probówki na mieszadle typu Vortex.

11. Inkubowano 10 minut w temperaturze 65°C.
12. Dodano 500µl mieszaniny chloroform : alkohol izoamylowy (24:1). Dobrze wymieszano.
13. Wirowano 10 minut przy maksymalnej prędkości (14 000 rpm) i temperaturze pokojowej.
14. Przeniesiono fazę wodną do nowej probówki typu Eppendorf.
15. Dodano 500µl mieszaniny fenol : chloroform : alkohol izoamylowy (25:24:1). Dobrze wymieszano.
16. Wirowano 10 minut przy maksymalnej prędkości (14 000 rpm) i temperaturze pokojowej.
17. Przeniesiono fazę wodną wraz z 0,6 objętości izopropanolu i przechowywano w -80°C przez noc.
18. Po rozmrożeniu w temperaturze pokojowej wirowano przy maksymalnej prędkości przez 30 minut.
19. Supernatant usunięto, a osad przemyto 1 ml 70% etanolem, wirowano 5 minut przy maksymalnej prędkości. Krok ten następnie powtórzono z użyciem 500 ml 70% etanolu.
20. Usunięto supernatant, a następnie suszono osad 5-10 minut w temperaturze pokojowej.
21. Zawieszono w 100µl wody i zmierzono stężenie DNA przy pomocy spektrofotometru typu NanoDrop (Thermo Fischer Scientific) w celu oceny czystości wyizolowanego DNA oraz określenia jego stężenia.
22. Jakość wyizolowanego DNA oceniano na podstawie rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym (*Materiały* 5.12.)

6.5. Analiza *in silico* genomów *Arthrospira*.

6.5.1. Sekwencjonowanie genomów *Arthrospira*.

Sekwencjonowanie genomów oraz proces ich składania był wynikiem pracy zespołowej w ramach dwóch projektów bilateralnych: program naukowej i technicznej współpracy pomiędzy Rzeczpospolitą Polska i Walonią (Belgia) i) „Wykorzystanie technik Sekwencjonowania Nowej Generacji (NGS sequencing) w opracowaniu metod inżynierii genetycznej jadalnych cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira*” (2013-2014); ii) Analiza funkcjonalna genomu jadalnej sinicy z rodzaju *Arthrospira* pod kątem charakterystyki ekspresji elementów genetycznych istotnych dla transferu genów oraz odpowiedzi na stres środowiskowy (ARTHRO-RNA) (2014-2016). Sekwencjonowanie 3 genomów *Arthrospira*,

Arthrospira sp. PCC 9901, *Arthrospira platensis* PCC 7345 i *Arthrospira fusiformis* CCALA023, było możliwe dzięki pozyskaniu grantu ESF (European Social Found) przez dr hab. Małgorzatę Waleron (pt „How can genomes help us to design genetic engineering tools for *Arthrospira* strains (Cyanobacteria)?”). Sekwencjonowanie 2 szczepów *Arthrospira*, *Arthrospira* sp. O9.13 F i *Arthrospira* sp. PCC 8006, zostało sfinansowane przez Ministerstwo Edukacji Wyższej Rzeczypospolitej Polskiej z dotacją projakościowego (KNOW) 2012-2016 – dec. MNiSW-DS.-6002-4693-23/WA/12.

Sekwencjonowanie 3 genomów zostało wykonane w systemie Illumina HiSeq System przez serwis sekwencyjny The Applied Genomics Technology Center (AGTC) w Konstancji (Niemcy), a pozostałych 2 genomów przez serwis sekwencyjny OLIGO Instytutu Biochemii i Biofizyki Państwowej Akademii Nauk (IBB PAN) z wykorzystaniem tego samego systemu.

Wyekstrahowano DNA genomowe (Metody 6.4.) z pięciu szczepów *Arthrospira*: *Arthrospira* sp. PCC 9901, *Arthrospira* sp. O9.13 F, *Arthrospira platensis* PCC 7345, *Arthrospira* sp. PCC 8006 oraz *Arthrospira fusiformis* CCALA023, a następnie wysłano do analizy sekwencyjnej.

Obróbka bioinformatyczna uzyskanych danych była prowadzona zespołowo przez: mgr Magdę Furmaniak, mgr Agnieszkę Misztak, dr hab. Małgorzatę Waleron oraz dr hab. Krzysztofa Walerona.

Składanie (ang. *assembling*) uzyskanych odczytów sekwenatora (ang. *raw reads*) wykonano dzięki uprzejmości prof. Denis Baurain z Uniwersytetu w Liege (Belgia), z użyciem klastra komputerowego „durandal” operowanego przez system InBios-PhytoSYSTEMS. Odczyty sekwenatora wszystkich sekwencjonowanych szczepów, przed *assemblingiem* zostały przefiltrowane z użyciem oprogramowania Kraken v1.0 (Wood & Salzberg, 2014), w celu uzyskania odczytów należących tylko do cyjanobakterii. Odcięcie adapterów zostało wykonane z użyciem oprogramowania Trimmomatic v0.32 (Bolger *et al.*, 2014). Analiza długości podsekwencji oraz ich dystrybucji (kmer) została wykonana z użyciem oprogramowania kmergenie v1.6949 (Chikhi & Medvedev, 2013).

Opracowane odczyty zostały złożone *de novo* z użyciem SPAdes v3.10.1 (Bankevich *et al.*, 2012), Velvet v1.2.10 (Zerbino & Birney, 2008) oraz Ray v2.3.1 (Boisvert *et al.*, 2010). Uzyskane zestawy contigów zostały zintegrowane z użyciem CISA v1.3 (Lin & Liao, 2013), a następnie ułożone w tzw. scaffolds z użyciem SSPACE v3.0 (Boetzer *et al.*, 2011). Końcowy *assembling* został poddany analizie jakościowej programu Quast v4.5 (Gurevich *et al.*, 2013). Annotacja genomów została wykonana automatycznie na portalu NCBI (National Center for Biotechnology Informtaion, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/).

Sekwencje genomów zdeponowano w bazie GenBank pod następującymi numerami akcesji: *A. platensis* PCC 7345 (PKG000000000), *A. fusiformis* CCALA023 (PKGE000000000), *Arthrospira* sp. PCC 9901 (PKGF000000000), *Arthrospira* sp. PCC 8006 (PKGG000000000), *Arthrospira* sp. O9.13 F (PKGD000000000).

6.5.2. Identyfikacja bakteryjnych systemów obronnych przed egzogennym DNA w genomach *Arthrospira*.

6.5.2.1. Identyfikacja systemów R-M typu I.

Wykorzystując platformę bioinformatyczną MaGe (<http://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/home/index.php>), zidentyfikowano sekwencje determinant genetycznych potencjalnie kodujących 14 systemów R-M typu I.

Platforma MaGe umożliwia analizy sekwencji jedynie sześciu genomów *Arthrospira* (*Arthrospira platensis* C1, *Arthrospira maxima* CS-328, *Arthrospira* sp. PCC 8005, *Arthrospira* sp. TJSD091 oraz *Arthrospira platensis* YZ). Analizy porównawcze sekwencji pozostałych siedmiu genomów wykonano z użyciem programu Geneious v9.1.8.

6.5.2.2. Identyfikacja systemów R-M typu II.

W celu identyfikacji determinant genetycznych kodujących systemy R-M *Arthrospira* skonstruowano bazę danych zawierającą 59427 białkowe sekwencje wszystkich dostępnych (do dnia 30.06.2016) systemów RM typu II znajdujących się w bazie REBASE (<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>). Utworzona w ten sposób baza sekwencji białkowych posłużyła jako referencyjna w celu przeszukania trzynastu genomów *Arthrospira* z użyciem narzędzia tBLASTn z e-value $<1E^{-10}$.

Następnie, uzyskane wyniki przeszukano w celu usunięcia sekwencji zduplikowanych i izoschizomerów. Do dalszych badaniach użyto jedynie sekwencji wskazujących co najmniej 50% identyczności. Analizy porównawcze wykonano z użyciem programu Geneious v9.1.8.

Należy podkreślić, że dla uproszczenia nazewnictwa systemów R-M typu II przyjęto nazwy izoschizomerów prototypowych korzystając z platformy REBASE.

6.5.2.3. Identyfikacja systemów CRISPR/Cas.

Trzynaście genomów *Arthrospira* zostało poddane analizie na obecność sekwencji CRISPR z użyciem platformy CRISPRFinder (<http://crispr.i2bc.paris-saclay.fr>). Analizy porównawcze genów skojarzonych z systemami CRISPR/Cas oraz określenie organizacji operonów CRISPR/Cas w genomach *Arthrospira* były wykonywane analogicznie jak w

przypadku systemów R-M, z użyciem platformy MaGe oraz programu Geneious v9.1.8. Przynależność do poszczególnych typów systemów CRISPR/Cas określono na podstawie wytycznych Makarova *et al.* (2011).

Obecność zidentyfikowanych genów CRISPR w genomach innych niż *Arthrospira* została sprawdzona z użyciem narzędzia BLAST i bazy danych nr (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) (program Geneious v9.1.8).

6.5.2.4. Analiza odczytów sekwenatora w celu potwierdzenia wątpliwych wyników analizy *in silico*.

W procesie assemblingu (składania), ze względu na wysoką repetytywność genomów *Arthrospira*, część z sekwencji mogła zostać utracona. W celu weryfikacji obecności loci potencjalnie zagubionych w procesie assemblingu, użyto programu Geneious i wykonano dodatkowe mapowanie odczytów sekwenatora (nie asemblowanych) do konkretnych sekwencji genów R-M lub CRISPR/Cas.

6.5.2.5. Analiza porównawcza liczby loci CRISPR oraz obecności genów CRISPR/Cas u cyjanobakterii nitkowatych (*Oscillatoriales* – Subsection III).

Analizy porównawcze prowadzono dla sekwencji genomowych 35 szczepów *Oscillatoriales* dostępnych w GenBank (*Materiały* 5.16.) oraz 5 genomów *Arthrospira* zsekwencjonowanych w ramach tej pracy. Z użyciem narzędzia CRISPRFinder (<http://crispr.i2bc.paris-saclay.fr>) określono liczbę potwierdzonych oraz przypuszczalnych loci CRISPR. Przeprowadzono analizę porównawczą genów CRISPR/Cas zidentyfikowanych w trzynastu genomach *Arthrospira* z zastosowaniem narzędzia BLAST, w celu określenie obecności sekwencji danych genów w genomach *Oscillatoriales*.

6.5.2.6. Analizy filogenetyczne.

W celu wykonania analizy filogenetycznej sekwencje genów kodujących systemy R-M oraz CRISPR/Cas, porównano ze sobą, a następnie uzyskane porównania połączono uzyskując zestawienie sekwencji (ang. *concatenated alignment*) o łącznej długości 11 488 (11 genów *cas* i RAMP) oraz 27 265 pz (22 geny *cas* RAMP, R-M typu I i R-M typu II). Porównanie sekwencji i ich połączenie wykonano za pomocą programu Geneious v9.1.8.

Następnie, porównanie połączonych sekwencji poddano analizom filogenetycznym z wykorzystaniem oprogramowania MEGA v7 (www.megasoftware.net). Dla analizowanych

danych określono najbardziej dopasowany model ewolucji GTR (ang. *General Time Reversible*) z użyciem jednolitych współczynników oraz modelu GD (ang. *Gamma Distribution*) z użyciem opcji *invariant sites*. Następnym krokiem było wygenerowanie konsensusowych drzew filogenetycznych za pomocą metody największego prawdopodobieństwa (ang. *maximum-likelihood*, ML). Istotność uzyskanego drzewa zweryfikowano wykorzystując metodę bootstrap dla 500 powtórzeń.

6.5.3. Identyfikacja genów klastrów biosyntezy metabolitów wtórnych w genomach *Arthrospira*.

Sekwencje wszystkich 13 genomów *Arthrospira* zostały przeszukane na obecność klastrów genów kodujących szlaki biosyntezy metabolitów wtórnych z użyciem platformy AntiSmash (Medema *et al.*, 2011). Potencjalne sekwencje klastrów genów kodujących biosyntezę metabolitów wtórnych zostały wyeksportowane i analizowane w programie Geneious v9.1.8.

6.5.4. Identyfikacja sekwencji fagowych w genomach *Arthrospira*.

Identyfikacja regionów fagowych w trzynastu genomach *Arthrospira* została przeprowadzona z użyciem platformy PHASTER (Arndt *et al.*, 2016). Zidentyfikowane regiony zostały poddane analizie narzędziem BLAST względem wewnętrznej bazy danych wirusowej i fagowej platformy PHASTER. Dalsza analiza poszczególnych regionów została wykonana z użyciem programu Geneious v9.1.8.

6.6. Eksperymentalne potwierdzenie obecności w genomach oraz funkcjonalności bakteryjnych systemów obrony przez obcym DNA.

6.6.1. Amplifikacja fragmentów genów z użyciem DNA *Arthrospira* jako matrycy w reakcji PCR.

Wykorzystując DNA wyizolowane z komórek *Arthrospira* wykonano amplifikację metodą PCR następujących fragmentów genów: endonukleaz *AsuII* (*AsuIIR*), *AvaI* (*AvaIR*), *NheI* (*NheIR*), *HindIII* (*HindIIIR*), *SacII* (*SacIIR*), metylotransefraz, *AsuII* (*AsuIIM*), *AvaI* (*AvaIM*), *NheI* (*NheIM*), *HindIII* (*HindIIIM*), *SacII* (*SacIIM*), genu *cas1*, *cas2*, *cmr6*, *csm3*, *csm4*, *csm5* i fragmentu *csm3-csm5*. Warunki poszczególnych reakcji przedstawiono w Aneksie 1.

6.6.2. Trawienie genomowego DNA *Arthrospira* enzymami restrykcyjnymi dostępnymi komercyjnie.

Przeprowadzono reakcje trawienia DNA genomowego *Arthrospira* enzymami restrykcyjnymi dostępnymi komercyjnie i będącymi izoschizomerami enzymów zidentyfikowanych w genomach: *BshNI* (*HgiCI*), *NheI*, *SplI* (*Pfl23II*), *Hin1I* (*AcyI*), *Eco88I* (*AvaI*), *Bsp143I* (*MboI*) i *Mph1103I* (*AvaIII*).

Do każdej reakcji dodano 1 µl genomowego DNA wyizolowanego z komórek *Arthrospira* o stężeniu minimum 50 ng/ µl. Inkubacja była prowadzona przez 3 godziny w odpowiednich temperaturach, a następnie dezaktywowano działanie enzymu przez 20 minut.

Warunki reakcji trawienia enzymem <i>BshNI</i> (<i>HgiCI</i>)	
Nazwa odczynnika	Stężenie końcowe
Bufor O	1 x stężony
enzym restrykcyjny	0,5 U
dejonizowana woda	Dopełniono do objętości 20 µl
temperatura inkubacji	37 °C
temperatura dezaktywacji enzymu	65 °C

Warunki reakcji trawienia enzymem <i>NheI</i>	
Nazwa odczynnika	Stężenie końcowe
Bufor Tango	1 x stężony
enzym restrykcyjny	0,5 U
dejonizowana woda	Dopełniono do objętości 20 µl
temperatura inkubacji	37 °C
temperatura dezaktywacji enzymu	65 °C

Warunki reakcji trawienia enzymem <i>SplI</i> (<i>Pfl23II</i>)	
Nazwa odczynnika	Stężenie końcowe
Bufor Tango	1 x stężony
enzym restrykcyjny	0,5 U
dejonizowana woda	Dopełniono do objętości 20 µl
temperatura inkubacji	37 °C
temperatura dezaktywacji enzymu	65 °C

Warunki reakcji trawienia enzymem <i>Hin1I</i> (<i>AcyI</i>)	
Nazwa odczynnika	Stężenie końcowe
Bufor G	1 x stężony
enzym restrykcyjny	0,5 U
dejonizowana woda	Dopełniono do objętości 20 µl
temperatura inkubacji	37 °C
temperatura dezaktywacji enzymu	65 °C

Warunki reakcji trawienia enzymem <i>Eco88I</i> (<i>AvaI</i>)	
Nazwa odczynnika	Stężenie końcowe
Bufor Tango	1 x stężony
enzym restrykcyjny	0,5 U
dejonizowana woda	Dopełniono do objętości 20 µl
temperatura inkubacji	35 °C
temperatura dezaktywacji enzymu	65 °C

Warunki reakcji trawienia enzymem <i>Bsp143I</i> (<i>MboI</i>)	
Nazwa odczynnika	Stężenie końcowe
Bufor Bsp143I	1 x stężony
enzym restrykcyjny	0,5 U
dejonizowana woda	Dopełniono do objętości 20 µl
temperatura inkubacji	37 °C
temperatura dezaktywacji enzymu	65 °C

Warunki reakcji trawienia enzymem <i>Mph1103I</i> (<i>AvaIII</i>)	
Nazwa odczynnika	Stężenie końcowe
Bufor R	1 x stężony
enzym restrykcyjny	0,5 U
dejonizowana woda	Dopełniono do objętości 20 µl
temperatura inkubacji	35 °C
temperatura dezaktywacji enzymu	65 °C

Warunki reakcji trawienia enzymem <i>Cfr42I</i> (<i>SacII</i>)	
Nazwa odczynnika	Stężenie końcowe
Bufor B	1 x stężony
enzym restrykcyjny	0,5 U
dejonizowana woda	Dopełniono do objętości 20 µl
temperatura inkubacji	35 °C
temperatura dezaktywacji enzymu	65 °C

Warunki reakcji trawienia enzymem <i>BspPI</i> (<i>BinI</i>)	
Nazwa odczynnika	Stężenie końcowe
Bufor Tango	1 x stężony
enzym restrykcyjny	0,5 U
dejonizowana woda	Dopełniono do objętości 20 µl
temperatura inkubacji	55 °C
temperatura dezaktywacji enzymu	80 °C

Warunki reakcji trawienia enzymem <i>Bsp119I</i> (<i>AsuII</i>)	
Nazwa odczynnika	Stężenie końcowe
Bufor Tango	1 x stężony
enzym restrykcyjny	0,5 U
dejonizowana woda	Dopełniono do objętości 20 µl
temperatura inkubacji	37 °C
temperatura dezaktywacji enzymu	80 °C

Przeprowadzono również symulację wyniku trawienia danego enzymu w programie Geneious v9.1.8 z użyciem genomu *Arthrospira* sp. PCC 8005 (wersja ARTHROv5) jako wzorcowego.

6.7. Amplifikacja fragmentów genów z użyciem jako matrycy DNA genomowego szczepów bakteryjnych wyizolowanych z suplementów diety *Arthrospira* oraz suchej biomasy jako matrycy w reakcji PCR.

Wykorzystując DNA wyekstrahowane z komórek szczepów bakteryjnych wyizolowanych z suplementów diety *Arthrospira* wykonano amplifikację metodą PCR następujących fragmentów genów: operonu klastra ITS I.A, I.B, II.A, II.B, I.C oraz fragmentu genu 16S rRNA. Warunki przeprowadzenia poszczególnych reakcji PCR przedstawiono w *Aneksie 1*.

6.8. Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym.

6.8.1. Rozdział elektroforetyczny genomowego DNA wyizolowanego z komórek *Arthrospira*, bakterii wyizolowanych z suplementów diety *Arthrospira* oraz z suchej biomasy *Arthrospira*.

Do 100 ml 1% gorącego żelu agarozowego dodawano 1,5 µl barwnika Serva G®, a następnie wylewano mieszaninę do formy aparatu do elektroforezy. Do każdej studzienki dodawano następującą mieszaninę:

Nazwa odczynnika	Ilość [μ l]
DNA genomowe lub Marker DNA 500 pz	3 μ l
Bufor obciążający	5 μ l
dejonizowana woda	2 μ l
	Dopełniono do objętości 20 μ l

Elektroforezę przeprowadzano w 0,5 razy stężonym buforze TAE przy napięciu 100V przez 90 minut.

6.8.2. Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji reakcji PCR (w tym reakcji optymalizacji starterów).

Do 100 ml 1%, gorącego żelu agarozowego dodawano 1,5 μ l barwnika Serva G®, a następnie wylewano mieszaninę do formy aparatu do elektroforezy. Do każdej studzienki dodawano następującą mieszaninę:

Nazwa odczynnika	Ilość [μ l]
Produkt PCR lub Marker DNA 500 pz	10 μ l
Bufor obciążający	5 μ l
dejonizowana woda	2 μ l
	Dopełniono do objętości 20 μ l

Elektroforezę przeprowadzano w 0,5 razy stężonym buforze TAE przy napięciu 100V przez 40 minut.

Rozwinięte żele agarozowe były wizualizowane w świetle UV w aparaturze GelDoc® firmy BioRad.

6.8.3. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji trawienia genomowego DNA enzymami restrykcyjnymi.

Do 150 ml 1%, gorącego żelu agarozowego dodawano 2,5 μ l barwnika Serva G®, a następnie wylewano mieszaninę do formy aparatu do elektroforezy. Do każdej studzienki dodawano:

1. 5 μ l markera 500 pz z dodatkiem 2 μ l buforu obciążającego i uzupełnione do 20 μ l wodą dejonizowaną.
2. 20 μ l reakcji trawienia z dodatkiem 2 μ l buforu obciążającego.

3. 3 μ l DNA genomowego z dodatkiem 2 μ l buforu obciążającego i uzupełnionego do 20 μ l wodą dejonizowaną.

Elektroforezę przeprowadzano w 1 raz stężonym buforze TAE przy napięciu 50V przez 360 minut.

Rozwinięte żele agarozowe były wizualizowane w świetle UV w aparaturze GelDoc® firmy BioRad.

6.9. Analiza ekspresji genów R-M typu II oraz CRISPR/Cas w warunkach stresowych.

Metodologia badania zmiany poziomu ekspresji genów została opisana w pracy Badri *et al.* 2014, a wyniki zostały udostępnione do tej pracy dzięki uprzejmości dr Pietera Monsieurs z Eksperckiej Grupy Badań z zakresu Biologii Molekularnej i Komórkowej, Belgijskiego Centrum Nuklearnego SCK-CEN w Mol, Belgia.

W powyższej pracy opisano globalnie zmiany ekspresji genów pod wpływem stresu iradiacyjnego. Natomiast, w ramach tej pracy, zbadano zmiany ekspresji genów kodujących systemy R-M typu II oraz związane z systemami CRISPR/Cas zidentyfikowane we wcześniejszych analizach *in silico*. Skrócony opis metody:

Badaniu zmiany ekspresji genów w różnych natężeniach promieniowania gamma (3200 Gy, oraz 5000 Gy) poddano szczep *Arthrospira* sp. PCC 8005. Naświetlanie prowadzone było w reaktorze RITA (BR2- Belgijski Reaktor nr 2), w ciemności w otoczeniu czterech źródeł promieniowania ^{60}Co . Ekstrakcje RNA przeprowadzono metodą z użyciem ciekłego azotu oraz Trizolu, a oczyszczanie RNA z użyciem Direct-zol RNA miniprep 2050 (Zymosearch). Zaprojektowano mikromacierz „*Arthrospira* HX12” z sondami o długości 50 do 72 nukleotydów, łącznie 135 367 sond, które zmapowano do ostatniej wersji genomu *Arthrospira* sp. PCC 8005.

Uzyskane dane zostały przeprocesowane z użyciem pakietu Oligo v1.24 oraz BioConductor v2.12. Znacząca zmiana transkrypcji była określana tylko, gdy $P < 0.05$ (ang. *p-value*) i całkowity „fold change” (FC) był równy lub większy niż 2 dla zwiększonej ekspresji i równy lub mniejszy niż 0.5 dla zmniejszonej ekspresji. Fold change (FC) to parametr mierzący zmianę w poziomie ekspresji genu pomiędzy dwoma warunkami – w tym przypadku, poddane działaniu promieniowania gamma versus nie poddane działaniu promieniowania (kontrola).

Dzięki uzyskanym danym transkryptomicznym, możliwa była identyfikacja genów związanych z systemami R-M typu II oraz CRISPR/Cas (scharakteryzowanych we wcześniejszych analizach *in silico*), a następnie analiza zmiany ich ekspresji w warunkach stresu iradiacyjnego (3200 Gy i 5000 Gy).

6.10. Badanie czystości mikrobiologicznej preparatów zawierających biomasę *Arthrospira*.

Badanie czystości mikrobiologicznej zostało wykonywane według procedur opisanych w Farmakopei Polskiej X. Preparaty zakwalifikowano jako doustne postaci leku zawierające surowce pochodzenia naturalnego, których nie poddaje się wstępnej obróbce zmniejszającej liczbę drobnoustrojów i dla których organ upoważniony dopuszcza TAMC (ogólna liczba drobnoustrojów tlenowych, ang. *Total Aerobic Microbial Count*) surowców powyżej 10^3 CFU (jednostki tworzące kolonie (JTK), w pracy stosowane będzie określenie w języku angielskim - *Colony Forming Units*, ze względu na jego zastosowanie w Farmakopei) w 1g/ml.

6.10.1. Określenie liczby CFU w 1 ml lub 1 g preparatu.

Poszczególne preparaty określone w tabeli (*Materiały 5.2.*), zostały roztarte w jałowym moździerzu (w przypadku tabletek) lub bezpośrednio odważone (w przypadku proszku) po 0,5g, a następnie przeniesione do 4,5 ml bulionu kazeinowo-sojowego w probówce 10 ml. Wykonano 3 kolejne 10-krotne rozcieńczenia (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) i każde z rozcieńczeń inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C.

Po okresie 24 godzinnym okresie inkubacji wykonano 4 kolejne, 10-krotne rozcieńczenia (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}). Z rozcieńczeń 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , w trzech powtórzeniach, wysiano 100 µl zawiesiny na stałe podłoże z agarem kazeinowo-sojowym i rozprowadzono za pomocą jałowej głaszczki. Płytki inkubowano przez 24 godziny w 37°C, a następnie zliczono kolonie, które wyrosły na podłożu i obliczono CFU/g. Prace prowadzono w trzech powtórzeniach dla każdego preparatu.

6.10.2. Wykrywanie obecności pałeczek *Escherichia coli* w preparacie.

Preparaty przygotowane w formie proszku (roztarte w jałowym moździerzu w razie potrzeby) w ilości 1 g zostały przeniesione do 9 ml bulionu TSB oraz inkubowane przez 24 godziny w temperaturę 35°C. Po inkubacji, zawartość probówki dokładnie została wymieszana, a następnie przeniesiono 1 ml zawiesiny do 100 ml bulionu MacConkeya i inkubowano 48 godzin w 42°C. Po zakończonym procesie inkubacji przeniesiono 100 µl zawiesiny na stałe podłoże MacConkeya i inkubowano kolejne 72 godziny w temperaturze 35°C. Odczytano wyniki wzrostu bakterii.

6.10.3. Wykrywanie obecności pałeczek *Salmonella* w preparacie.

5 g sproszkowanego preparatu przeniesiono do 90 ml bulionu TSB, wymieszano i inkubowano 24 godziny w temperaturze 35°C. Po inkubacji przeniesiono 100 µl zawiesiny do 10 ml bulionu Rappaporta-Vassiliadis, a następnie inkubowano ponownie przez 24 godziny w 35°C. 100 µl zawiesiny po inkubacji przeniesiono na stałe podłoże z ksylozą, lizyną i dezoksycholanem (XLD) i inkubowano przez 48 godzin w temperaturze 35°C. Odczytano wyniki wzrostu bakterii.

6.10.4. Wykrywanie obecności *Staphylococcus aureus* w preparacie.

1 g sproszkowanego preparatu przeniesiono do 9 ml bulionu TSB i inkubowano 24 godziny w temperaturze 35°C. Po okresie inkubacji przeniesiono 100 µl zawiesiny na podłoże stałe z mannitolem i chlorkiem sodu i inkubowano 72 godziny w 35°C. Odczytano wyniki wzrostu bakterii.

6.10.5. Wykrywanie obecności bakterii Gram-ujemnych tolerujących żółć.

1 g sproszkowanego preparatu przeniesiono do 9 ml bulionu TSB i inkubowano przez 2 godziny w temperaturze 20°C. Całą zawartość probówki przeniesiono do 100 ml bulionu Mossela i inkubowano przez 48 godzin w temperaturze 35°C. Po upływie okresu inkubacji przeniesiono 100 µl zawiesiny na stałe podłoże VRBG i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 35°C. Odczytano wyniki wzrostu bakterii.

6.10.6. Identyfikacja gatunkowa i charakterystyka bakterii, określonych jako zanieczyszczenie w badanych preparatach.

6.10.6.1. Test na obecność koagulazy.

Przygotowano dwie probówki z osoczem króliczym i solą fizjologiczną, do jednej z nich wprowadzono za pomocą jałowej ezy *Staphylococcus aureus* N315 jako kontrolę pozytywną, a do drugiej testowany mikroorganizm. Probówki inkubowano w temperaturze 35°C przez 4 godziny, po czym odczytano wyniki.

6.10.6.2. Identyfikacja bakterii z rodzaju *Staphylococcus*.

6.10.6.2.1. Test na obecność katalazy.

Przed wykonaniem komercyjnego testu identyfikacyjnego, przeprowadzono badanie na obecność katalazy. Kolonię bakteryjną bezpośrednio na podłożu nakropiono 1-2 kroplami wody utlenionej i sprawdzono obecność pęcherzyków.

6.10.6.2.2. Określenie wrażliwości na nowobiocynę.

Określono wrażliwość na nowobiocynę metodą krążków bibułowych - 100 µl zawiesiny bakteryjnej o gęstości 0,5 McF rozprowadzono za pomocą jałowej głaszczki na stałym podłożu Mueller-Hintona, a następnie umieszczono krążek bibułowy nasączony nowobiocyną (2 µg). Po pół godzinny okresie preinkubacji (30 minut w temperaturze pokojowej), inkubowano płytkę w temperaturze 37°C przez 24 godziny, a następnie zmierzono strefę zahamowania wzrostu.

6.10.6.2.3. STAPHYtest 24.

Przygotowano zawiesinę bakteryjną w soli fizjologicznej o gęstości 2 McF, a następnie inokulowano po 100 µl do wszystkich studzienek płytki testu. Do odpowiednich studzienek dodano ciekłej parafiny według zaleceń producenta. Płytkę inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C, a następnie interpretowano wyniki zgodnie z zaleceniami.

6.10.6.2.4. Test M43 MICROGEN STAPH.

Jedną kolonię bakteryjną pobrano bezpośrednio z podłoża stałego i umieszczono ją wraz z kroplą odczynnika lateksowego na płytce. Mieszano próbkę oraz kontrole pozytywną przez 2 minuty, a następnie odczytano wyniki.

6.11. Badanie obecności środków konserwujących w tabletkach z biomasą *Arthrospira* firmy Febico (Tajwan).

Metodyka została oparta na podstawie normy ISO PN-EN 11930:2012 (Kosmetyki - Mikrobiologia - Test skuteczności i ocena zakonserwowania produktów kosmetycznych).

6.11.1. Przygotowanie zawiesin roboczych.

Na skosy agarowe, odpowiednio z podłożem TSA oraz Sabouraud, wykonano posiewy szczepów testowych *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 8738 oraz *C. albicans* ATCC II, a następnie inkubowano przez 24 godziny w 32°C. Posiew został powtórzony (pasaż II), a następnie otrzymana hodowla posłużyła do przygotowania zawiesin roboczych bakterii i grzybów. Skosy pasażu II przepłukano 10 ml rozcieńczalnika, a otrzymany roztwór został przeniesiony do jałowych probówek z kulkami szklanymi, które były mieszane na mieszadle typu vorteks przez 3 minuty.

Przygotowano rozcieńczenia zawiesin roboczych w chlorku sodu (0,9%) do gęstości 0,6 McF dla bakterii i 4,5 McF dla drożdży. Wykonano seryjne rozcieńczenia (*E. coli* i *S. aureus* rozcieńczenia 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 cfu/ml; *C. albicans* rozcieńczenia 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 cfu/ml) oraz posiewy na upłynnionym podłożu TSA (tzw. posiew wgłębnny). W celu określenia liczby mikroorganizmów, inkubowano 24-48 godzin w temperaturze 32°C dla bakterii i 24°C dla drożdży.

6.11.2. Kontrola efektywności neutralizatora

W celu przygotowania preparatu *Arthrospira* do badania, roztarto 10 tabletek (5 g suchej biomasy) w jałowym moździerzu, a następnie przeniesiono na jałową, szklaną płytkę Petriego i zalano 5 ml jałowej wody (w trzech powtórzeniach). Liofilizowaną biomasę wymieszano, tworząc „pastę”, która stanowiła podstawę testu konserwacji. Kontrolę neutralizatora wykonano w trzech powtórzeniach.

Skuteczność neutralizatora zbadano przygotowując zawiesiny szczepów testowych o stężeniu 10^3 cfu/ml. Do jałowych probówek przeniesiono 0,5g „pasty” przygotowanej z preparatu *Arthrospira* za pomocą jałowej szpatułki, a następnie dodano 9 ml neutralizatora (N_{vf}). Całość wymieszano, a następnie inkubowano 30 minut w temperaturze pokojowej. Wykonano również próbę kontrolną (N_{vn}): 9ml neutralizatora wymieszano z 1 ml rozcieńczalnika. Próby kontrolne oraz testowe zostały zainokulowane 1 ml zawiesin szczepów testowych. Inokulum kontrolne (N_v) zawierało 10 ml rozcieńczalnika i 1 ml zawiesin mikroorganizmów. Dla wszystkich próbek wykonano posiew wgłębnny (1ml roztworu dodano do 20 ml upłynnionego podłoża TSA/Sabouraud), inkubowano 48-72h w odpowiedniej temperaturze.

6.11.3. Ocena skuteczności zakonserwowania preparatu *Arthrospira*.

Na jałowej, szklanej płytce Petriego, dla każdego z testowanych drobnoustrojów, wymieszano 5 g (10 tabletek roztartych w jałowym moździerzu) z 5 ml jałowej wody, tworząc „pastę” z preparatu *Arthrospira*. Do każdej płytki dodano 200 μ l odpowiedniej zawiesiny bakterii ($1 \times 10^5/1 \times 10^6$ cfu/ml dla bakterii i $1 \times 10^4/1 \times 10^5$ cfu/ml dla drożdży), wymieszano jałową szpatułką i zabezpieczono płytkę parafilmem. Płytki inkubowano 28 dni w temperaturze pokojowej, bez dostępu do światła.

Po 1,3,7,14 oraz 28 dniu inkubacji, pobierano jałową szpatułką 0,5 g „pasty” z preparatem *Arthrospira*, przenoszono do jałowej probówki i neutralizowano przez 30 minut (9 ml neutralizatora). Następnie do 1ml roztworu dodawano 20 ml upłynnionego podłoża TSA/Sabouraud i wykonywano posiew wgłębny. 10-krotne rozcieńczenie roztworu wysiewano na podłoże Columbia Agar + 5%KB. Wszystkie posiewy inkubowano w 32°C/24°C 2-5 dni, następnie sprawdzano liczbę kolonii mikroorganizmów.

6.12. Badanie właściwości przeciwbakteryjnych oraz przeciwgrzybiczych ekstraktów wodnych i metanolowych uzyskanych z suchej biomasy *Arthrospira*.

6.12.1. Przygotowanie ekstraktów metanolowych z suchej biomasy *Arthrospira*.

Ekstrakty metanolowe przygotowano z suchej biomasy zawartej w preparatach *Arthrospira* pochodzących z USA (Cyanotech), Chin (Biogate Polden), Pakistanu (Green Essence) i Tajwanu (Febico). 2 g sproszkowanej biomasy dodano do 8 ml roztworu wodno-metanolowego (20:80, v/v), a następnie otrzymaną zawiesinę sonifikowano przez 2 minuty w 9 cyklach. Zawiesinę po sonifikacji wirowano przez 15 minut przy maksymalnym dopuszczonym przyspieszeniu (14 000 rpm). Supernatant przeniesiono do 50 ml probówki wirowniczej typu Falcon. Powtórzono etap sonifikacji i wirowania. Uzyskane supernatanty połączono i przeniesiono do temperatury -80°C na minimum dobę. Następnie, zamrożoną próbę poddano liofilizacji. Uzyskany liofilizat ważono i rozpuszczano w 1 ml wody dejonizowanej i przechowywano w temperaturze pokojowej.

6.12.2. Przygotowanie ekstraktów wodnych z suchej biomasy *Arthrospira*.

Ekstrakty wodne również przygotowano z suchej biomasy zawartej w preparatach *Arthrospira* pochodzących z USA (Cyanotech), Chin (Biogate Polden), Pakistanu (Green Essence) i Tajwanu (Febico). 2 g sproszkowanej biomasy dodano do 200 ml gotującej się, dejonizowanej wody. Zawiesina zaparzana była przez 15 minut, a następnie filtrowana przez sącze bibułowy w celu usunięcia pozostałości komórkowych. Otrzymany ekstrakt przeniesiono do temperatury -80°C, a następnie poddano liofilizacji. Uzyskany liofilizat ważono i zawieszano w 1 ml wody dejonizowanej, a następnie przechowywano w temperaturze pokojowej.

6.12.3. Badanie właściwości przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych biomasy *Arthrospira*.

Przygotowano 24-godzinne hodowle bakteryjnych szczepów referencyjnych (*Materiały* 5.3.) w płynnym podłożu Mueller-Hintona inkubowane w temperaturze 37°C oraz hodowlę referencyjnego szczepu grzybów (*Materiały* 5.3.) w podłożu płynnym Sabourauda inkubowaną w temperaturze 25°C. Hodowle szczepów referencyjnych rozcieńczano odpowiednim podłożem płynnym do uzyskania zawiesiny o gęstości 0,5 McF, a następnie rozcieńczono ją stukrotnie. Badanie właściwości bójczych mikroorganizmów przeprowadzano oddzielnie dla ekstraktów uzyskanych z jednego preparatu.

6.12.4. Badanie właściwości bakteriobójczych.

Przygotowano dwie jałowe, 96-dołkowe płytki titracyjne i do każdego dołka dodano po 100 µl płynnego podłoża Mueller-Hintona. W wierszach A-C w pierwszej kolumnie dodano po 100 µl odpowiedniego ekstraktu wodnego, a w wierszach D-F dodano po 100 µl odpowiedniego ekstraktu wodnego. Przygotowano seryjne rozcieńczenia ekstraktów, do rozcieńczenia 10^{-12} . Do każdego rozcieńczenia dodano po 100 µl zawiesiny bakteryjnej szczepów referencyjnych *S. aureus* (płytką nr 1) lub *E. coli* (płytką nr 2). Wykonano również i) kontrolę żywności podłoża – do 100 µl podłoża Mueller-Hintona dodano 100 µl zawiesin bakteryjnej; ii) oraz kontrolę jałowości podłoża - 100 µl podłoża Mueller-Hintona bez dodatku zawiesin bakteryjnych ani ekstraktu. Płytkę inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 35°C, następnie określano wzrost bakterii na podstawie zmętnienia podłoża. Z każdego rozcieńczenia ekstraktu, po inkubacji, wysiewano 15 µl zawiesiny na podłoże Columbia Agar i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 35°C.

6.12.5. Badanie właściwości przeciwgrzybiczych.

Analogicznie do badania właściwości bakteriobójczych, badanie właściwości przeciwgrzybiczych przeprowadzane było na 96-dołkowych, jałowych, płytkach titracyjnych. Do każdego dołka dodano 100 µl podłoża płynnego Sabourauda, w wierszach A-C dodano po 100 µl ekstraktu wodnego, w następnych trzech (D-F) metanolowego. Do seryjnych rozcieńczeń ekstraktów z pożywką dodano po 100 µl zawiesiny referencyjnego szczepu *C. albicans*. Przygotowano również kontrolę żywności i jałowości podłoża. Płytkę inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 25°C, następnie określano wzrost drożdżaków na podstawie zmętnienia podłoża. Z każdego rozcieńczenia ekstraktu, po inkubacji, wysiewano 15 µl zawiesiny na podłoże stałe Sabouraud i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 25°C.

6.13. Charakterystyka i identyfikacja gatunkowa izolatów bakteryjnych z preparatów *Arthrospira*.

6.13.1. Charakterystyka morfologiczna.

Każdy szczep bakteryjny wyizolowany z preparatów *Arthrospira* poddano barwieniu metodą Grama według następującego protokołu:

1. Na szkiełko podstawowe naniesiono kroplę jałowego 0,9% roztworu soli chlorku sodu, po czym za pomocą jałowej ezy wykonano rozmaz w roztworze soli.
2. Szkiełko pozostawiono do wyschnięcia, a następnie utrwalono preparat poprzez trzykrotne przesunięcie nad płomieniem palnika.
3. Utrwalony preparat barwiono przez 2 minuty roztworem fioletu krystalicznego.
4. Odczynnik spłukano wodą.
5. Dobarwiono preparat przez 1 minutę w płynie Lugola.
6. Odczynnik spłukano wodą.
7. Preparat odbarwiano przez 30 sekund roztworem alkoholu etylowego z dodatkiem acetonu.
8. Odczynnik spłukano wodą.
9. Barwiono preparat za pomocą roztworu fuksyny przez 30 sekund, a następnie odczynnik spłukano wodą.
10. Preparat osuszono bibułą, a efekt barwienia obserwowano pod mikroskopem świetlnym pod powiększeniem 100x z użyciem olejku immersyjnego.

6.13.2. Charakterystyka biochemiczna i fizjologiczna.

Określono następujące cechy biochemiczne z użyciem odpowiednich stałych podłoży mikrobiologicznych:

- i) zdolność do wzrostu na podłożu z 0,5% ksylozą jako jedyne źródło węgla – podłoże z ekstraktem z *Arthrospira* i 0,5% ksylozą (*Materiały* 5.4.2.);
- ii) zdolność do wzrostu na podłożu z 0,5% ramnozą jako jedyne źródło węgla – podłoże z ekstraktem z *Arthrospira* oraz 0,5% ramnozą;
- iii) zdolność do rozkładu mannitolu, zdolność do hydrolizy lecytyny żółtka jaja kurzego, zdolność do wzrostu w wysokim stężeniu chlorku sodu i oporność na polimyksynę – podłoże stałe MYP Agar (*Materiały* 5.4.3.);

- iv) zdolność do rozkładu laktozy – podłoże MacConkeya (*Materiały* 5.4.3.); v) zdolność do rozkładu mannitolu i wzrostu w wysokim stężeniu chlorku sodu – podłoże stałe Chapmanna (*Materiały* 5.4.3.);
- v) zdolność do wzrostu w bardzo wysokich stężeniach chlorku sodu – podłoże stałe Halomonas Medium (*Materiały* 5.4.3.)
- vi) wzrost na podłożu stałym Mueller-Hinton II Agar (*Materiały* 5.4.3.).

6.13.3. Sekwencjonowanie fragmentu 16S rRNA.

Amplifikowane fragmenty genu kodującego 16S rRNA o wielkości 1500 pz (*Materiały* 5.10.) zostały wysłane do analizy sekwencyjnej w Instytucie Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie (IBB PAN). Sekwencjonowanie prowadzono z użyciem obydwu uniwersalnych starterów 27f i 1492r, wykorzystanych uprzednio do reakcji amplifikacji. Otrzymane sekwencje zostały złożone do tzw. sekwencji konsensusowych. Za pomocą narzędzia BLAST wyszukano w bazie danych nr sekwencji 16S najbardziej podobnych do tych nowo uzyskanych. Następnie, porównano uzyskane sekwencje z sekwencjami najbliższej spokrewnionych organizmów pozyskanymi z GenBank i wyliczono % identyczności. Kolejnym krokiem była analiza filogenetyczna, która pozwoliła na identyfikację nowych izolatów bakterii towarzyszących *Arthrospira*.

6.13.4. Analiza filogenetyczna.

Analizę filogenetyczną sekwencji genu kodującego 16S rRNA 40 izolatów bakterii towarzyszących *Arthrospira* oraz 17 najbardziej podobnych sekwencji uzyskanych z bazy nr wykonano na pomocą programu MEGA v.7 (www.megasoftware.net). Po pobraniu najbardziej dopasowanego modelu ewolucji General Time Reversible, wygenerowano fylogramy metodą Maximum-Likelihood (ML). Wiarygodność uzyskanych drzew zweryfikowano metodą bootstrap dla 500 powtórzeń.

6.14. Izolacja bakterii symbiotycznych z hodowli *Arthrospira* poddanych naświetlaniu promieniowaniem gamma.

6.14.1. Naświetlanie hodowli *Arthrospira* promieniowaniem gamma.

Do eksperymentu użyto hodowli następujących szczepów *Arthrospira*: *A. fusiformis* AB2002/2, *Arthrospira* sp. O9.13 F, *Spirulina platensis* SAG21.99, *A. platensis* str. Paracas, *Arthrospira* sp. PCC 8005 fenotyp P2 (filament prosty), *Arthrospira* sp. PCC 8005 fenotyp P6

(filament skręcony), *Arthrospira* sp. PCC 9901, *Arthrospira* sp. LV, *Arthrospira* sp. BURMA oraz *Arthrospira* sp. Moz 1.

1 ml każdej 3-tygodniowej płynnej hodowli prowadzonej w pożywce Zarrouk, przeniesiono do 24-dołkowej jałowej płytki titracyjnej. Naświetlanie przeprowadzono w Belgijskim Centrum Nuklearnym SCK-CEN w reaktorze RITA (BR2 – Belgijski Reaktor numer 2) w ramach projektu bilateralnego między Polską i Flandrią (wspólny projekt badawczy w ramach porozumienia o współpracy naukowej między PAB i FWO na lata 2016-2018: Fizjologia, biologia komórki i biotechnologia jadalnych cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira*). Płytki umieszczono w ciemnym, zamkniętym kanistrze w otoczeniu czterech źródeł promieniowania gamma ^{60}Co . Próbkę naświetlane były w dawkach 900, 2100 oraz 5000 Gy. Po irradacji umieszczono płytki w temperaturze 35°C pod stałym dostępem światła.

6.14.2. Izolacja bakterii symbiotycznych z hodowli *Arthrospira* poddanych irradacji.

Po 7 dniach od naświetlania promieniowaniem gamma, 100 µl hodowli zostało przeniesione na stałe podłoże z ekstraktem z *Arthrospira* oraz 1% glukozą (*Materiały* 5.4.2.) i hodowano przez 7 dni w temperaturze 35°C. Wyrosłe pojedyncze kolonie, przesiano indywidualnie na czyste podłoża stałe z ekstraktem z *Arthrospira* i glukozą (*Materiały* 5.4.2.). Wszystkie szczepy były również przechowywane w 25% roztworze glicerolu w temperaturze – 80 °C.

7. WYNIKI.

7.1. Wyniki pomiaru absorbancji DNA genomowego wyizolowanego z komórek szczepów *Arthrospira*.

Ekstrakcja genomowego DNA z komórek *Arthrospira* w celu jego sekwencjonowania stanowiła istotny etap w badaniach. W przypadku haloalkalofilnego organizmu jakim jest *Arthrospira* izolacja DNA jest trudna, ponieważ optymalne warunki dla ich wzrostu (pH=10, stężenie NaCl 2,5%) sprawiają, że jakoś wyekstrahowanego DNA znacznie odbiega od wartości optymalnych dla sekwencjonowania genomowego DNA. Komórki *Arthrospira* cechują się niską zawartością kwasów nukleinowych, a obecność produkowanych przez nie polisacharydów dodatkowo utrudnia proces ich ekstrakcji. Wydłużony czas hodowli teoretycznie zwiększa ilość komórek, a co za tym idzie DNA, jednak z wiekiem wzrasta ilość produkowanych polisacharydów. Natomiast zbyt krótki czas hodowli, sprawia, że komórki są w fazie logarytmicznego wzrostu co skutkuje problemami w sekwencjonowaniu genomu. Przeanalizowano wpływ wieku hodowli *Arthrospira* na ilość i jakość genomowego DNA w komórkach w celu opracowania optymalnej metody hodowli i późniejszej ekstrakcji DNA opisanej w *Metodach* (6.4.1.). Wyizolowano DNA genomowe z osiemnastu szczepów *Arthrospira*, określono jego stężenie i jakość w uzyskanych wodnych roztworach, wyniki przedstawia Tabela 9. Wyekstrahowane DNA posłużyło do sekwencjonowania genomowego DNA, amplifikacji fragmentów genów metodą PCR oraz trawienia wybranymi enzymami restrykcyjnymi.

Tabela 9. Wyniki pomiaru absorbancji DNA genomowego.

<i>Lp.</i>	<i>Szczep</i>	<i>Absorbancja 260/280 nm</i>	<i>Stężenie DNA w próbce ng/μl</i>
1	<i>Arthrospira fusiformis</i> AB2002/2	0,1074	107,4
2	<i>Arthrospira</i> sp. PCC 9444	0,7471	747,1
3	<i>Arthrospira</i> sp. Moz 1	0,0644	64,4
4	<i>Arthrospira</i> sp. Moz 2	0,4674	467,4
5	<i>Arthrospira</i> sp. BURMA	0,1948	194,8
6	<i>Spirulina maxima</i> SAG49.88	0,5616	561,6
7	<i>Arthrospira platensis</i> PCC 9438(C1)	0,4265	426,5
8	<i>Arthrospira</i> sp. PCC 8005	0,6435	643,5
9	<i>Arthrospira</i> sp. LV	0,1353	135,3
10	<i>Arthrospira</i> sp. Paracas P0	0,157	157,0
11	<i>Arthrospira</i> sp. M3.10	0,2873	287,3
12	<i>Arthrospira fusiformis</i> CCALA023	0,8231	823,1
13	<i>Arthrospira</i> sp. PCC 8006	0,1862	186,2
14	<i>Arthrospira platensis</i> PCC 7345	0,6487	648,7
15	<i>Arthrospira</i> sp. PCC 9901	1,8407	1840,7
16	<i>Arthrospira</i> sp. Omsk F	0,2271	227,1
17	<i>Arthrospira</i> sp. Omsk H	0,7449	0,7449
18	<i>Arthrospira</i> sp. CCALA030	1,9165	1916,5

7.2. Analiza *in silico* genomów *Arthrospira*.

Przeprowadzona analiza genomyczna koncentrowała się na identyfikacji i charakterystyce genów związanych z systemami R-M, CRISPR/Cas, regionami profagowymi oraz klastrami kodującymi biosyntezę metabolitów wtórnych. Ponieważ dostępne genomy *Arthrospira* reprezentowały jedynie cztery z siedmiu opisanych genotypów, w pierwszej kolejności zsekwencjonowano pięć genomów *Arthrospira*, uzupełniając dane o brakujące genotypy. Ze względu na kłopotliwą taksonomię rodzaju *Arthrospira*, wykonano również analizy filogenetyczne na podstawie genów związanych z obroną komórki przed egzogennym DNA.

7.2.1. Sekwencjonowanie genomów *Arthrospira*.

W celu przeprowadzenia dokładniejszych i bardziej wiarygodnych analiz z zakresu filogenomiki oraz genomiki porównawczej, poddano analizie sekwencyjnej genomy pięciu szczepów *Arthrospira*: *A. platensis* PCC 7345, *A. fusiformis* CCALA023, *Arthrospira* sp. PCC

9901, *Arthrospira* sp. PCC 8006 oraz *Arthrospira* sp. O9.13 F według metodyki przedstawionej w rozdziale *Metody* 6.5.1. Charakterystyka zsekwencjonowanych genomów została przedstawiona w Tabeli 10 uwzględniając numer akcesji, liczbę tzw. scaffolds, wielkość genomu, liczbę kodujących sekwencji DNA CDS (ang. *Coding DNA Sequence*) oraz liczbę genów kodujących RNA.

Tabela 10. Charakterystyka pięciu zsekwencjonowanych genomów *Arthrospira*.

	<i>Arthrospira platensis</i> PCC 7345	<i>Arthrospira fusiformis</i> CCALA023	<i>Arthrospira</i> sp. PCC 9901	<i>Arthrospira</i> sp. PCC 8006	<i>Arthrospira</i> sp. O9.13 F
Numer akcesji	PKGC00000000	PKGE00000000	PKGf00000000	PKGG00000000	PKGD00000000
Liczba scaffolds	360	379	235	711	928
%GC	44.48	44.6	44.66	44.43	44.5
Wielkość genomu	5 908 457	5 790 010	5 511 007	5 952 635	4945448
Liczba kodujących sekwencji DNA	5,011	4,888	4,556	5,301	76,01
Geny kodujące RNA	47	49	52	49	42

7.2.2. Identyfikacja systemów R-M typu I w genomach *Arthrospira*.

Analiza porównawcza trzynastu genomów *Arthrospira* wykazała obecność czternastu różnych genów w analizowanej puli szczepów potencjalnie kodujących systemy R-M typu I (Tabela 11, ANEKS 2 Tabela 1 i 2). Cztery z nich to metylazy DNA (*hsdM* - ang. *host specificity for DNA*), sześć to miejscowo-specyficzne endonukleazy (*hsdR*), trzy to geny kodujące podjednostkę S systemu R-M typu I, a jeden to gen kodujący białko specyficzności *EcoKI*.

Tabela 11. Obecność zidentyfikowanych genów kodujących systemy R-M typu I w trzynastu genomach *Arthrospira*: ✓ - gen jest obecny w genomie, – - gen jest nieobecny w genomie, F – gen jest obecny we fragmencie.

Genomy <i>Arthrospira</i> , klaster ITS	Systemy restrykcyjno-modyfikacyjne typu I													
	Enzym restrykcyjny typu I, bialko specyficznośc i EcoKI	<i>hsdM</i> metylo- transferaz a DNA	R-M system typu I, podjedno- stka S	R-M system typu I, podjedno- stka R HsdR	R-M system typu I, podjedno- stka M HsdM	Enzym typu I EcoprI, bialko M HsdM	Enzym restry- kcyjny typu I, podjedn- ostka M	R-M enzym typu I R	Miejscowo- specyficzna dezoksyrybo- nukleaza z rodziny HsdR	Miejscowo- specyficzna dezoksyrybo- nukleaza z rodziny HsdR	Miejscowo- specyficzna dezoksyrybo- nukleaza z rodziny HsdR	Miejscowo- specyficzna dezoksyrybo- nukleaza z rodziny HsdR	Enzym R- M typu I, podje- dnostka S	Potencjalna endonukleaza restrykcyjna, podjednostka S
<i>Arthrospira platensis</i> C1(I.A)	✓	✓	F	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	F
<i>Arthrospira maxima</i> CS-328 (I.A)	✓	✓	F	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	—	✓
<i>Arthrospira</i> sp. TJSD091 (I.A)	✓	✓	F	✓	✓	—	—	✓	✓	✓	✓	✓	—	✓
<i>Arthrospira</i> sp. TJSD092 (I.A)	F	✓	F	F	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	—	F
<i>Arthrospira</i> sp. PCC8005 (I.B)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	—	F
<i>Arthrospira</i> sp. PCC9901 (III)	—	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	—
<i>Arthrospira</i> sp. O9.13 F(I.B/III)	F	✓	F	F	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	F
<i>Arthrospira platensis</i> NIES- 39 (II.A)	—	—	✓	✓	✓	✓	✓	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Arthrospira platensis</i> YZ (II.A)	—	—	F	✓	✓	✓	✓	—	✓	✓	✓	✓	F	F
<i>Arthrospira platensis</i> str. Paraca (II.A)	—	—	F	✓	✓	✓	✓	—	✓	✓	✓	✓	—	F
<i>Arthrospira platensis</i> PCC7345 (II.A/II.B)	—	—	F	✓	✓	✓	✓	—	✓	✓	✓	✓	F	F
<i>Arthrospira fusiformis</i> CCALA023 (II.B)	—	—	F	✓	✓	✓	✓	—	✓	✓	✓	✓	F	F
<i>Arthrospira</i> sp. PCC8006 (II.B)	—	—	F	✓	✓	✓	✓	—	✓	✓	✓	✓	✓	F

	890	900	910	920	930	940	950																
Consensus	CCTTTCGTTGTATTGGAAGAAACAGCAAAAGGAGGTAAACGAGAGCATGAAAAGTTAGGTTT																						
Frame 1	P	F	R	V	Y	W	K	K	Q	Q	K	E	V	K	R	E	H	E	K	L	G	F	
Identity																							
1. <i>Arthrospira platensis</i> C1	CCTTTCGTTGTATTGGAAGAAACAGCAAAAGGAGGTAAACGAGAGCATGAAAAGTTAGGTTT																						
Frame 1	P	F	R	V	Y	W	K	K	Q	Q	K	E	V	K	R	E	H	E	K	L	G	F	
2. <i>Arthrospira maxima</i> CS-328	CCTTTCGTTGTATTGGAAGAAACAGCAAAAGGAGGTAAACGAGAGCATGAAAAGTTAGGTTT																						
Frame 1	P	F	R	V	Y	W	K	K	Q	Q	K	E	V	K	R	E	H	E	K	L	G	F	
3. <i>Arthrospira</i> sp. TJS091	CCTTTCGTTGTATTGGAAGAAACAGCAAAAGGAGGTAAACGAGAGCATGAAAAGTTAGGTTT																						
Frame 1	P	F	R	V	Y	W	K	K	Q	Q	K	E	V	K	R	E	H	E	K	L	G	F	
4. <i>Arthrospira</i> sp. TJS092	CCTTTCGTTGTATTGGAAGAAACAGCAAAAGGAGGTAAACGAGAGCATGAAAAGTTAGGTTT																						
Frame 1	P	F	R	V	Y	W	K	K	Q	Q	K	E	V	K	R	E	H	E	K	L	G	F	
5. <i>Arthrospira</i> sp. PCC 8005	CCTTTCGTTGTATTGGAAGAAACAGCAAAAGGAGGTAAACGAGAGCATGAAAAGTTAGGTTT																						
Frame 1	P	F	R	V	Y	W	K	K	Q	Q	K	E	V	K	R	E	H	E	K	L	G	F	
6. <i>Arthrospira</i> sp. PCC 9901	CCTTTCGTTGTATTGGAAGAAACAGCAAAAGGAGGTAAACGAGAGCATGAAAAGTTAGGTTT																						
Frame 1	P	F	R	V	Y	W	K	K	Q	Q	K	E	V	K	R	E	H	E	K	L	G	F	
7. <i>Arthrospira</i> sp. O9.13 F	CCTTTCGTTGTATTGGAAGAAACAGCAAAAGGAGGTAAACGAGAGCATGAAAAGTTAGGTTT																						
Frame 1	P	F	R	V	Y	W	K	K	Q	Q	K	E	V	K	R	E	H	E	K	L	G	F	
8. <i>Arthrospira platensis</i> NIES-39	T	F	G	V	D	W	K	K	Q	Q	K	E	V	K	R	E	H	E	K	L	G	F	
Frame 1	P	F	G	V	D	W	K	K	Q	Q	K	E	V	K	R	E	H	E	K	L	G	F	
9. <i>Arthrospira</i> platensis YZ	T	F	G	V	D	W	K	K	Q	Q	K	E	V	K	R	E	H	E	K	L	G	F	
Frame 1	P	F	G	V	D	W	K	K	Q	Q	K	E	V	K	R	E	H	E	K	L	G	F	
10. <i>Arthrospira platensis</i> str. Paracas	T	F	G	V	D	W	K	K	Q	Q	K	E	V	K	R	E	H	E	K	L	G	F	
Frame 1	P	F	G	V	D	W	K	K	Q	Q	K	E	V	K	R	E	H	E	K	L	G	F	
11. <i>Arthrospira platensis</i> PCC 7345	T	F	G	V	D	W	K	K	Q	Q	K	E	V	K	R	E	H	E	K	L	G	F	
Frame 1	P	F	G	V	D	W	K	K	Q	Q	K	E	V	K	R	E	H	E	K	L	G	F	
12. <i>Arthrospira fusiformis</i> CCA1A023	T	F	G	V	D	W	K	K	Q	Q	K	E	V	K	R	E	H	E	K	L	G	F	
Frame 1	P	F	G	V	D	W	K	K	Q	Q	K	E	V	K	R	E	H	E	K	L	G	F	
13. <i>Arthrospira</i> sp. PCC 8006	T	F	G	V	D	W	K	K	Q	Q	K	E	V	K	R	E	H	E	K	L	G	F	
Frame 1	P	F	G	V	D	W	K	K	Q	Q	K	E	V	K	R	E	H	E	K	L	G	F	

W analizowanej puli genomów *Arthrospira* zidentyfikowano determinant

genomie *A. platensis* str. Paraca. Natomiast geny kodujące pięć kompletnych systemów R-M (*HgiCI*, *SplI*, *AcyI*, *AvaIII*, *AsuII*) wykryto we wszystkich trzech klastrach ITS (I, II, III), ale nie we wszystkich trzynastu genomach – system *AsuII* jest nieobecny w genomie *A. maxima* CS-328 (ITS klaster I) i *A. platensis* str. Paraca (ITS klaster II) (Tabela 12).

Endonukleaza *SacII* jest obecna we wszystkich genomach, natomiast metylotransferaza *SacII* występuje jedynie w genomach należących do klastra II ITS. System *HindIII* jest obecny jedynie w genomach należących do klastra I ITS, z wyjątkiem *Arthrospira* sp. TJSD092, który posiada metylotransferazę *HindIII*, ale nie posiada endonukleazy. Ponadto system *HindIII* jest obecny również w genomie *Arthrospira* sp. O9.13 F, który posiada dwie różne wersje ITS, I.B oraz III. System *NheI* jest obecny jedynie w genomach należących do klastrów I oraz III.

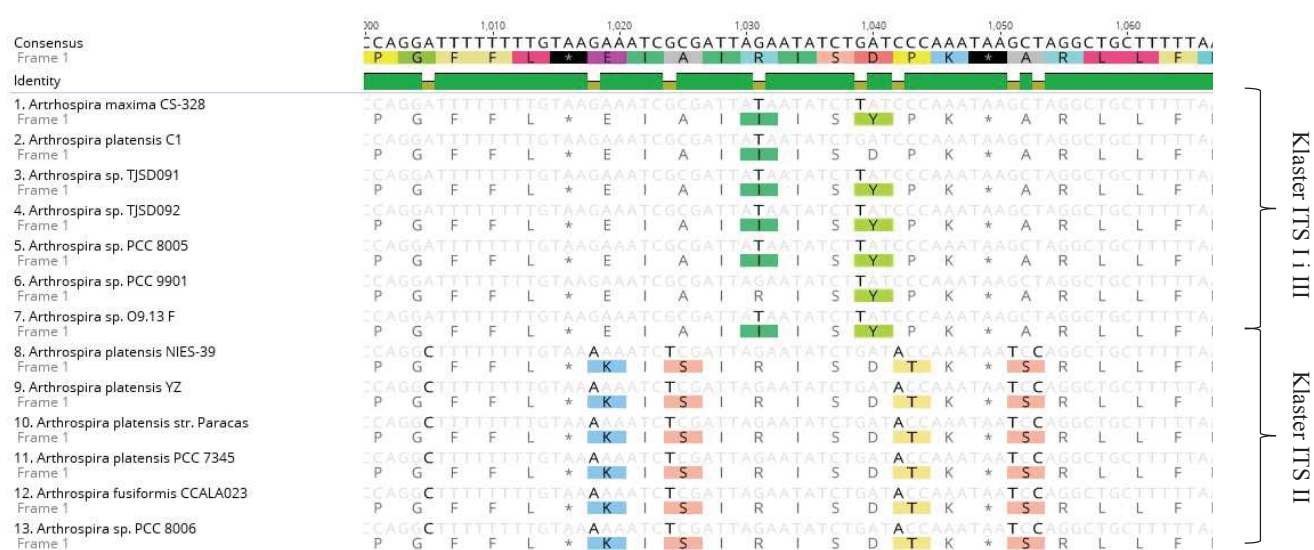
Sekwencje nukleotydowe jak i białkowe zidentyfikowanych systemów R-M typu II zostały porównane w trzynastu genomach *Arthrospira*. Podobieństwo sekwencji endonukleazy i metylotransferazy *HindIII* między genomami klastra I wynosi 100%. Podobnie jest w przypadku metylotransferazy *SacII* występującej jedynie w genomach należących do klastra II – podobieństwo sekwencji nukleotydowej wynosi 100%. Sekwencję nukleotydową metylotransferazy oraz endonukleazy *NheI* w genomie *Arthrospira* sp. PCC 8005 różni od pozostałych genomów należących do klastra I oraz III tylko jeden polimorfizm.

Podobnie jak w przypadku sekwencji genów kodujących systemy R-M typu I, w sekwencjach systemów R-M występujących w różnych genomach obserwuje się charakterystyczne polimorfizmy pomiędzy klastrem I i III a klastrem II. Przykładowo, dla sekwencji genu kodującego endonukleazę *AcyI* na 1071 pz 66 pozycji jest zmiennych, w tym 63 to substytucje niesynonimiczne, które pozwalają na rozróżnienie sekwencji genu *AcyI* szczepów zaliczanych do klastra ITS I i III oraz szczepów zaliczanych do klastra ITS II (Rycina 3).

W genomie szczepu *A. platensis* str. Paraca zidentyfikowano tylko jeden system R-M typu II, *AcyI*, oraz jedną metylotransferazę *BinI*. Sekwencje te miały niskie podobieństwo (<50%) w stosunku do genów, kodujących tę metylotransferazę, obecnych w innych genomach *Arthrospira*. Obecność genów zidentyfikowanych *in silico* potwierdzono eksperymentalnie (Metody 6.6.). W wyniku przeprowadzonej amplifikacji fragmentów genów metodą PCR wykazano obecność systemów *AvaI* oraz *SacII* w szczepie *A. platensis* str. Paraca, których sekwencje nie zostały zidentyfikowane w genomach metodami bioinformatycznymi.

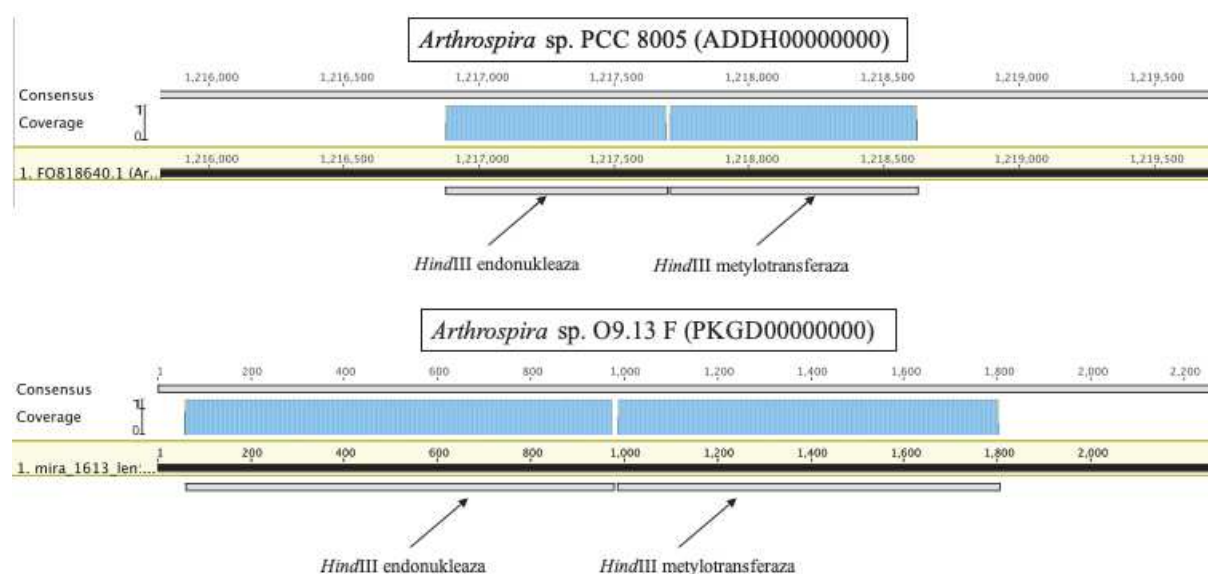
Tabela 12. Zestawienie wyników identyfikacji genów kodujących systemy R-M typu II w trzynastu genomach *Arthrospira*: ✓ - gen jest obecny w genomie, – - gen jest nieobecny w genomie, F – gen jest obecny we fragmencie, M – metylotransferaza, E – endonukleaza.

Genomy <i>Arthrospira</i> , klaster ITS	Systemy restrykcyjno-modyfikacyjne typu II																			
	<i>Bsh</i> NI		<i>Nhe</i> I		<i>Pfl</i> 23II		<i>Hin</i> II		<i>Eco</i> 88I		<i>Bsp</i> 143 I	<i>Mph</i> 1103I		<i>Cfr</i> 42I	<i>Bsp</i> 119I		<i>Bsp</i> PI		<i>Hind</i> III	
	<i>Hgi</i> CI, <i>Ban</i> I				<i>Sp</i> II, <i>Bsi</i> WI		<i>Acy</i> I, <i>Bsa</i> HI		<i>Ava</i> I		<i>Mbo</i> I, <i>Sau</i> 3A	<i>Ava</i> III, <i>Eco</i> T22I, <i>Nsi</i> I		<i>Sac</i> II	<i>Asu</i> II, <i>Bst</i> BI		<i>Bin</i> I, <i>Alw</i> I			
	Miejsce cięcia																			
	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	M	E	M	E	M	E	M	M	E
<i>Arthrospira platensis</i> C1(I.A)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	–	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Arthrospira maxima</i> CS-328 (I.A)	✓	✓	✓	✓	✓	F	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	–	F	–	–	✓	✓	✓
<i>Arthrospira</i> sp. TJSD091 (I.A)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	–	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Arthrospira</i> sp. TJSD092 (I.A)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	–	✓	✓	✓	✓	✓	–
<i>Arthrospira</i> sp. PCC8005 (I.B)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	–	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Arthrospira</i> sp. PCC9901 (III)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	–	✓	✓	✓	✓	–	–
<i>Arthrospira</i> sp. O9.13 F(I.B/III)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	–	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Arthrospira platensis</i> NIES-39 (II.A)	✓	✓	–	–	✓	✓	✓	✓	F	F	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	–	–
<i>Arthrospira platensis</i> YZ (II.A)	✓	✓	–	–	✓	✓	✓	✓	F	F	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	–	–
<i>Arthrospira platensis</i> str. Paraca (II.A)	–	–	–	–	–	–	✓	✓	✓	✓	–	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	–	–
<i>Arthrospira platensis</i> PCC7345 (II.A/II.B)	✓	✓	–	–	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	–	–
<i>Arthrospira</i> <i>fusiformis</i> CCALA023 (II.B)	✓	✓	–	–	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	–	–
<i>Arthrospira</i> sp. PCC8006 (II.B)	✓	✓	–	–	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	–	–



Rycina 3. Porównanie najbardziej zmiennego fragmentu sekwencji genu kodującego endonukleazę *AcyI* w trzynastu genomach *Arthrospira*. Kolorami zaznaczono substytucje niesynonimiczne występujące pomiędzy sekwencjami szczepów należących do klastra ITS I i III a szczepami należącymi do klastra ITS II.

Analiza wykazała również, że geny kodujące endonukleazy i metylotransferazy tego samego systemu R-M znajdują się w bliskim sąsiedztwie w genomach, przykładową organizację determinantów genetycznych systemu R-M przedstawiono na Rycinie 4.



Rycina 4. Organizacja genów kodujących system R-M *HindIII* w genomie *Arthrospira* sp. PCC 8005 oraz *Arthrospira* sp. O9.13 F.

7.2.4. Identyfikacja systemów CRISPR/Cas w genomach *Arthrospira*.

7.2.4.1. Określenie liczby loci CRISPR.

Platforma CRISPRFinder (Metody 6.5.2.3.) dzieli wyniki zidentyfikowanych loci CRISPR na potwierdzone (ang. *confirmed*) oraz przypuszczalne (ang. *questionable*). Przypuszczalne loci CRISPR to małe CRISPR, których struktura ma tylko dwa lub trzy regiony powtórzone DR (ang. *Direct Repeats*) oraz struktury, w których powtarzany motyw (DR) nie jest w 100% identyczny, we wszystkich powtórzeniach. Liczba wszystkich przewidywanych loci CRISPR (potwierdzonych oraz przypuszczalnych) w genomach *Arthrospira* waha się między 17 (*Arthrospira* sp. O9.13 F) a 55 (*A. fusiformis* CCALA023). Najmniejsza liczba potwierdzonych loci CRISPR to zaledwie 3 (*Arthrospira* sp. O9.13 F), a największa to 13 (*A. platensis* str. Paraca) (Tabela 13).

Tabela 13. Zestawienie ilościowe przewidywanych loci CRISPR zidentyfikowanych w trzynastu genomach *Arthrospira* z użyciem narzędzia CRISPRFinder.

<i>Genom Arthrospira</i>	<i>Liczba potwierdzonych loci CRISPR</i>	<i>Liczba przypuszczalnych loci CRISPR</i>	<i>Całkowita liczba loci CRISPR</i>
<i>Arthrospira platensis</i> C1	7	19	26
<i>Arthrospira maxima</i> CS-328	8	20	28
<i>Arthrospira</i> sp. TJSD091	9	24	33
<i>Arthrospira</i> sp. TJSD092	6	18	24
<i>Arthrospira</i> sp. PCC 8005	6	22	28
<i>Arthrospira</i> sp. PCC 9901	5	19	24
<i>Arthrospira</i> sp. O9.13 F	3	14	17
<i>Arthrospira platensis</i> NIES-39	9	30	39
<i>Arthrospira platensis</i> YZ	7	22	29
<i>Arthrospira platensis</i> str. Paraca	13	31	44
<i>Arthrospira platensis</i> PCC 7345	7	36	43
<i>Arthrospira fusiformis</i> CCALA023	8	47	55
<i>Arthrospira</i> sp. PCC 8006	8	33	41

7.2.4.2. Identyfikacja genów związanych z systemami CRISPR/Cas.

Poza określeniem liczby loci CRISPR postanowiono zidentyfikować oraz porównać sekwencje genów *cas* oraz RAMP, które są ściśle związane z systemami CRISPR/Cas (*Metody* 6.5.2.3.).

Gen *cas1* w genomach *Arthrospira* w trzech różnych wariantach nazwanych na potrzeby tej pracy *cas1.1*, *cas1.2* oraz *cas1.3* zidentyfikowano w analizie porównawczej z użyciem platformy MaGe oraz narzędzia. Obecność wszystkich trzech genów została potwierdzona w dwunastu genomach *Arthrospira*. W przypadku genomu *A. platensis* str. Paraca zidentyfikowano jedynie geny *cas.1.* oraz *cas.1.2* (Tabela 14). Zidentyfikowano również dwa warianty genu *cas2*: *cas2.1* oraz *cas2.2*. Obecność obydwu wariantów genu *cas2* potwierdzono we wszystkich trzynastu genomach *Arthrospira*. Gen *cas6* również zidentyfikowano we wszystkich analizowanych genomach.

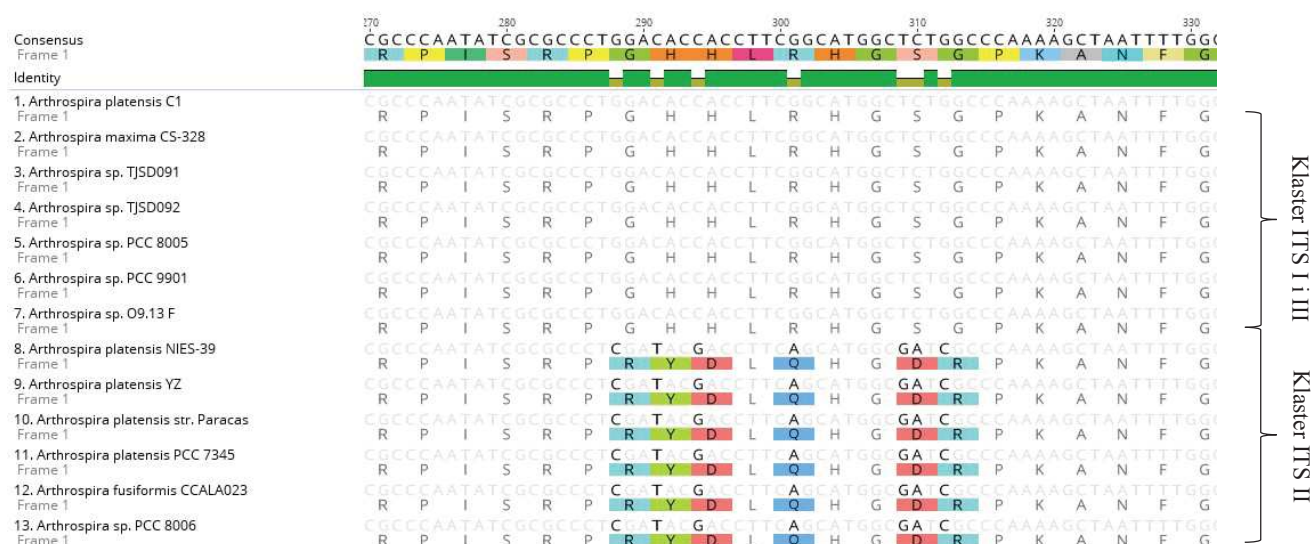
W przypadku genów RAMP (ang. Repeat-associated Misterious Protein), sekwencje genów *cmr4* oraz *cmr6* są obecne we wszystkich genomach *Arthrospira*, natomiast gen *cmr2* nie występuje w genomach *A. platensis* C1, *A. maxima* CS-328, *A. platensis* YZ oraz *A. platensis* str. Paraca. W dziewięciu pozostałych genomach *Arthrospira* potwierdzono jego obecność.

Poza genomem *Arthrospira* sp. PCC 8005, gen *csx3* kodujący mangano-zależną egzorybonukleazę deadenylacji, jest obecny we wszystkich genomach. Gen *csx10*, którego funkcja wciąż nie została poznana, zidentyfikowano w dziesięciu genomach, nie posiadają go genomy *A. platensis* C1, *A. maxima* CS-328 oraz *Arthrospira* sp. O9.13 F. Geny *csm1*, *csm2*, *csm3*, *csm4* oraz *csm5* są obecne we wszystkich genomach, z pewnymi wyjątkami. W genomie *A. maxima* CS-328 nie wykryto genów *csm2* oraz *csm4*, w genomie *Arthrospira* sp. TJSD091 nie stwierdzono występowania genu *csm2*, natomiast genom *A. platensis* str. Paraca nie posiada genu *csm3*.

Podobnie jak w przypadku sekwencji nukleotydowych genów kodujących systemy R-M typu I i II (*Wyniki* 7.2.2. i 7.2.1.) podczas analizy sekwencji nukleotydowej genów związanych z systemami CRISPR/Cas zaobserwowano pojedyncze polimorfizmy pomiędzy genomami należącymi do klastra ITS I i III a genomami należącymi do klastra ITS II. Przykładowo, dla sekwencji genu kodującego białko Cas.1.3 na 1028 pz 106 pozycji jest zmiennych, w tym 80 to substytucje niesynonimiczne, które pozwalają na rozróżnienie sekwencji genu *cas1.3* szczepów zaliczanych do klastra ITS I i III oraz szczepów zaliczanych do klastra ITS II (Rycina 5).

Tabela 14. Obecność zidentyfikowanych genów kodujących systemy CRISPR/Cas w trzynastu genomach *Arthrospira*: ✓ - gen jest obecny w genomie, – - gen jest nieobecny w genomie, F – gen jest obecny we fragmencie.

Genomy <i>Arthrospira</i>	Klaster ITS	Geny kodujące systemy CRISPR/Cas															
		<i>cas1.1</i>	<i>cas1.2</i>	<i>cas1.3</i>	<i>cas2.1</i>	<i>cas2.2</i>	<i>cas6</i>	<i>csx3</i>	<i>csx10</i>	<i>cmr2</i>	<i>cmr4</i>	<i>cmr6</i>	<i>csm1</i>	<i>csm2</i>	<i>csm3</i>	<i>csm4</i>	<i>csm5</i>
<i>Arthrospira platensis</i> C1	I.A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	–	–	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Arthrospira maxima</i> CS-328	I.A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	–	–	✓	✓	✓	–	✓	–	✓
<i>Arthrospira</i> sp. TJSD091	I.A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	–	✓	✓	✓
<i>Arthrospira</i> sp. TJSD092	I.A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Arthrospira</i> sp. PCC8005	I.B	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Arthrospira</i> sp. PCC9901	III	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Arthrospira</i> sp. O9.13 F	I.B/III	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	–	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Arthrospira platensis</i> NIES-39	II.A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Arthrospira platensis</i> YZ	II.A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	–	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Arthrospira platensis</i> str. Paraca	II.A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	–	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Arthrospira platensis</i> PCC7345	II.A/II.B	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Arthrospira</i> sp. PCC8006	II.B	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Arthrospira fusiformis</i> CCALA023	II.B	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓



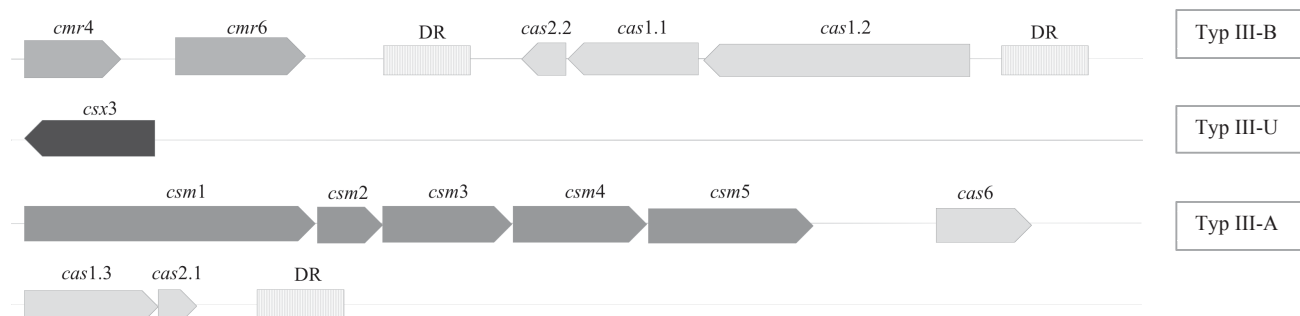
Rycina 5. Porównanie najbardziej zmiennego fragmentu sekwencji genu kodującego białko Cas1.3 w trzynastu genomach *Arthrospira*. Kolorami zaznaczono substytucje niesynonimiczne występujące pomiędzy sekwencjami szczepów należących do różnych klastrów ITS.

7.2.4.3. Organizacja operonów CRISPR/Cas w genomach *Arthrospira* oraz określenie ich przynależności do poszczególnych typów.

Identyfikacja genów *cas* oraz RAMP pozwoliła określić organizację operonów CRISPR/Cas w trzynastu genomach *Arthrospira* (Metody 6.5.2.3.) We wszystkich genomach zidentyfikowano systemy CRISPR/Cas należące do typów: III-A, III-B i III-U wydzielonych przez Makarova i wsp. (2011), a we wszystkich genomach poza *A. platensis* C1, *A. maxima* CS-328 oraz *Arthrospira* sp. O9.13 F zidentyfikowano również systemy CRISPR/Cas należące do typu I-U. Makarova i wsp. (2011) przeanalizowali 310 bakteryjnych genomów posiadających co najmniej jeden moduł CRISPR i opracowali klasyfikację, gdzie geny *cas1* oraz *cas2* stanowią rdzeń aktywnych systemów CRISPR/Cas.

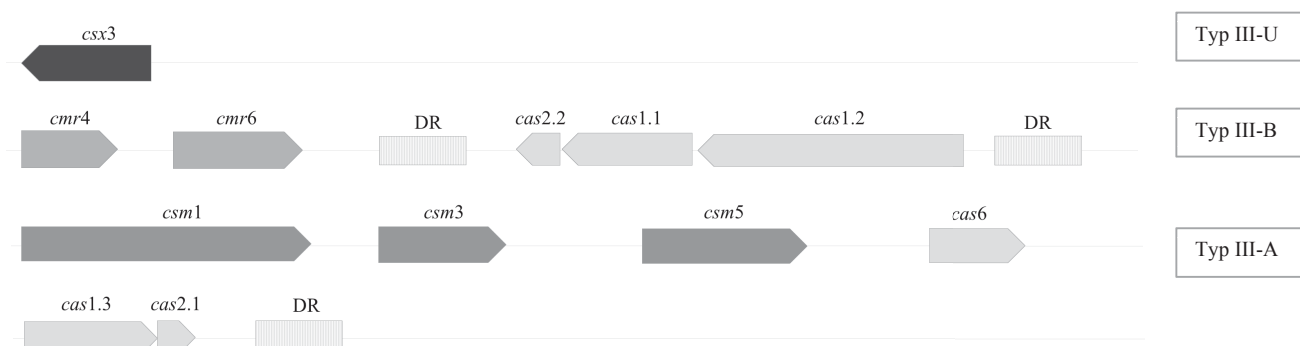
Organizacja operonów CRISPR/Cas w trzynastu genomach *Arthrospira* wraz z przypisanymi typami systemów CRISPR/Cas według Makarova *et al.* (2011) została przedstawiona na poniższych Schematach (nr 3-15).

Arthrospira platensis C1



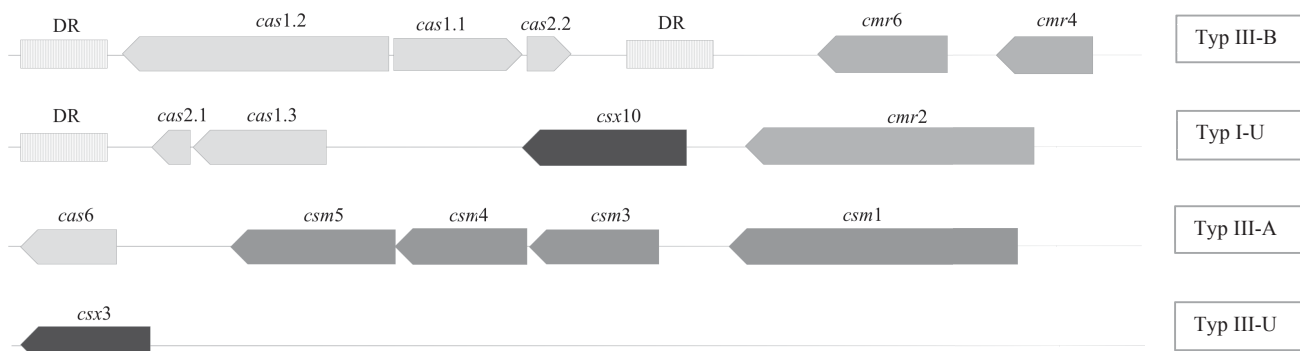
Schemat 3. Organizacja regionu CRISPR/Cas w genomie *A. platensis* C1.

Arthrospira maxima CS-328

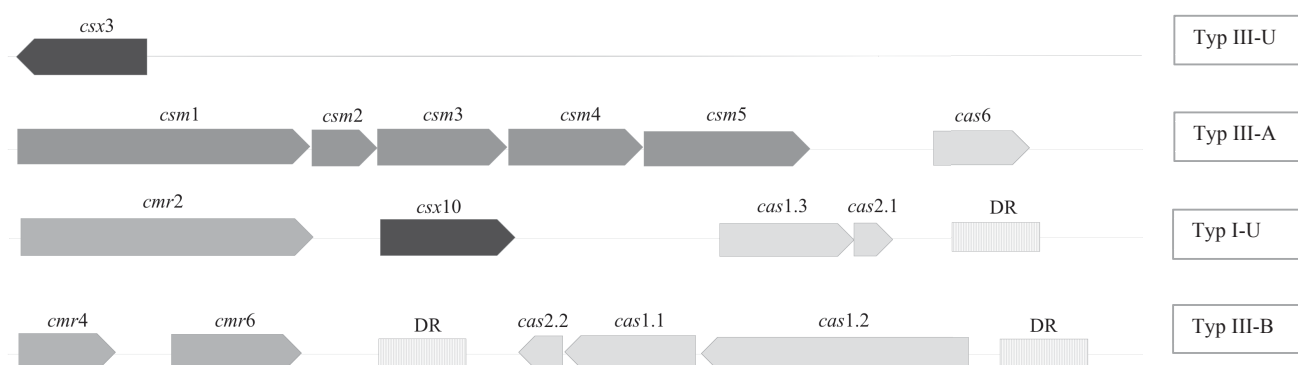
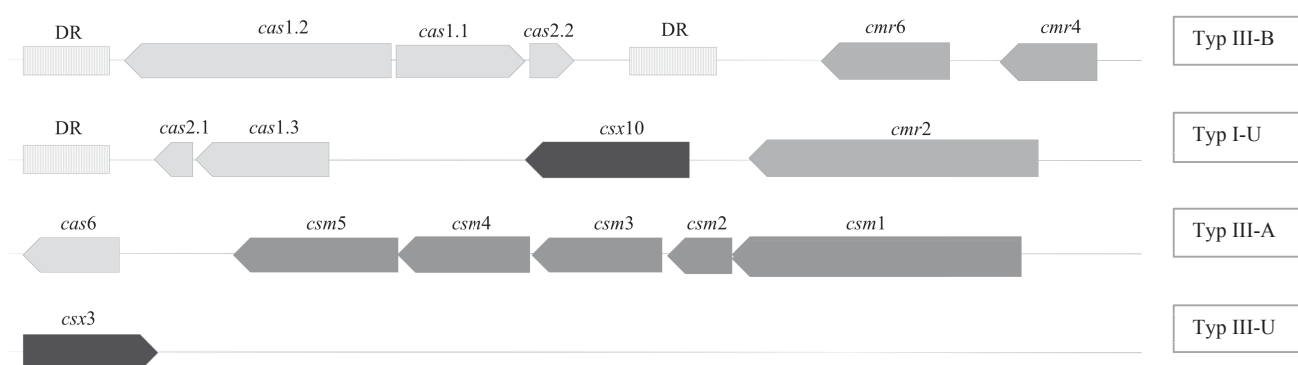
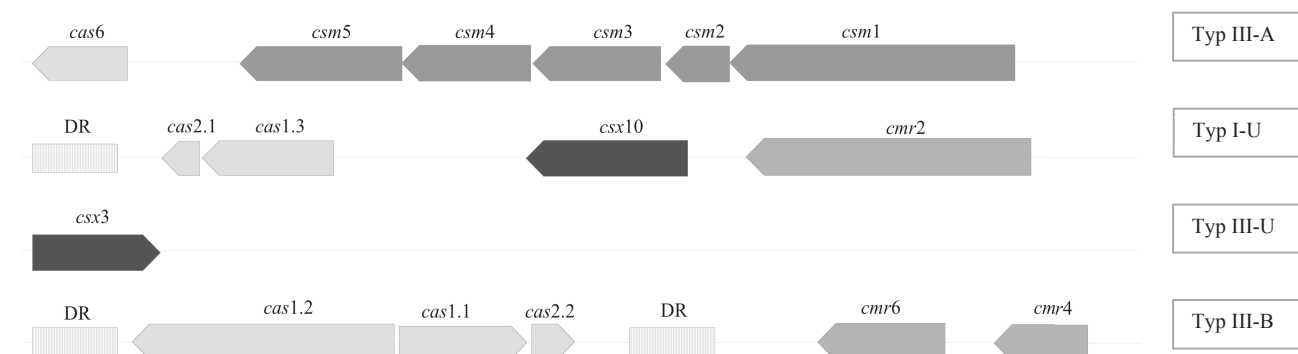


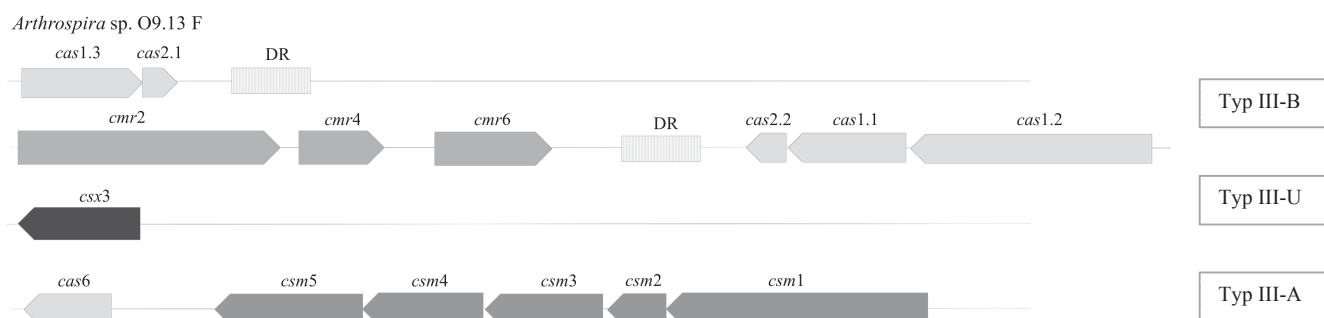
Schemat 4. Organizacja regionu CRISPR/Cas w genomie *A. maxima* CS-328.

Arthrospira sp. TJSD091

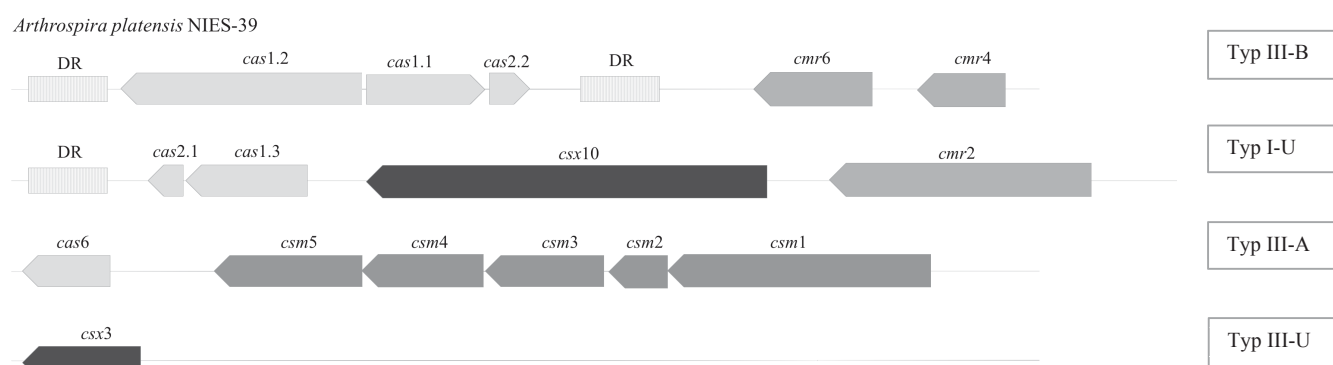


Schemat 5. Organizacja regionu CRISPR/Cas w genomie *Arthrospira* sp. TJSD091.

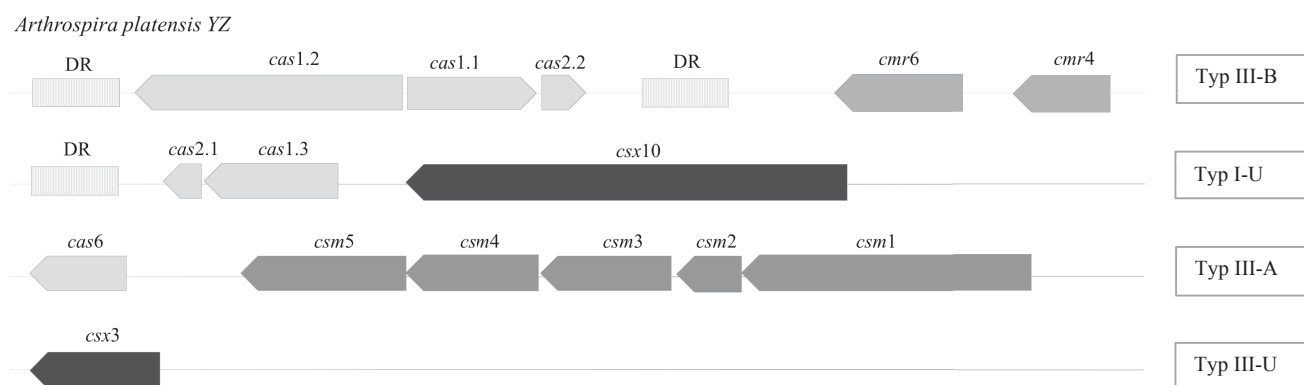
Arthrospira sp. TJSD092**Schemat 6.** Organizacja regionu CRISPR/Cas w genomie *Arthrospira* sp. TJSD092.*Arthrospira* sp. PCC 8005**Schemat 7.** Organizacja regionu CRISPR/Cas w genomie *Arthrospira* sp. PCC 8005.*Arthrospira* sp. PCC 9901**Schemat 8.** Organizacja regionu CRISPR/Cas w genomie *Arthrospira* sp. PCC 9901.



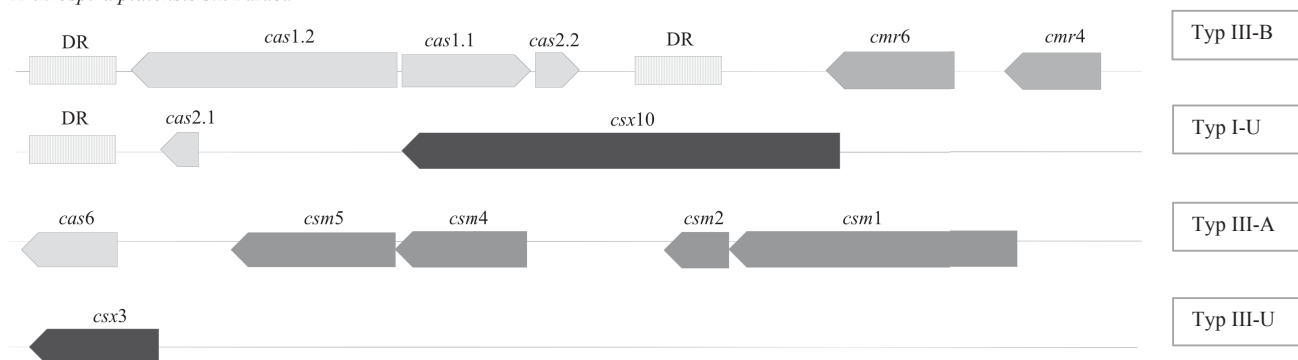
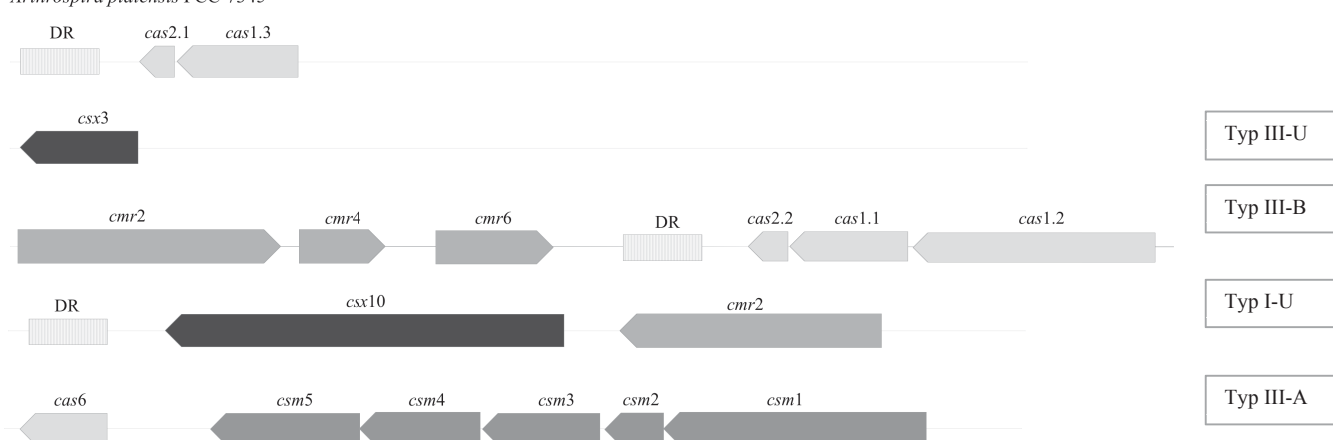
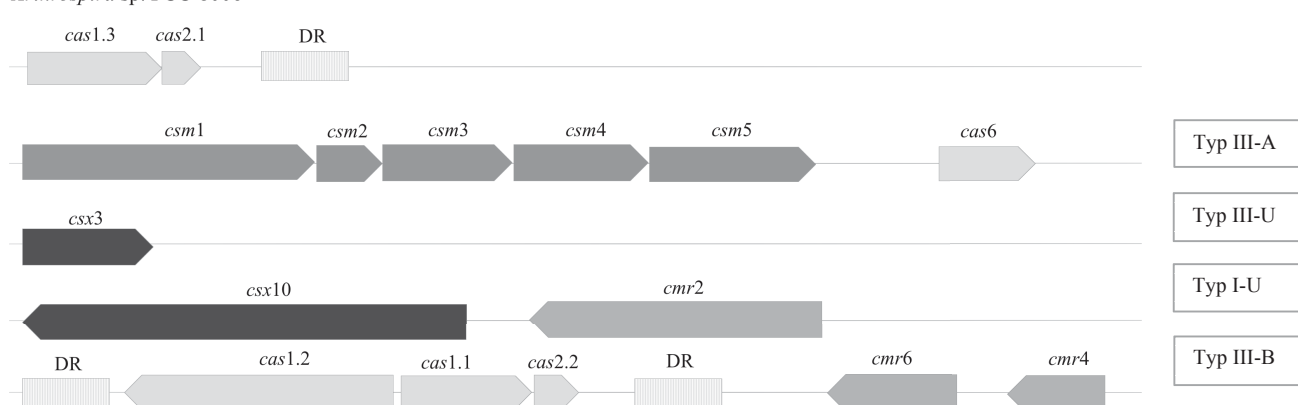
Schemat 9. Organizacja regionu CRISPR/Cas w genomie *Arthrospira* sp. O9.13 F.

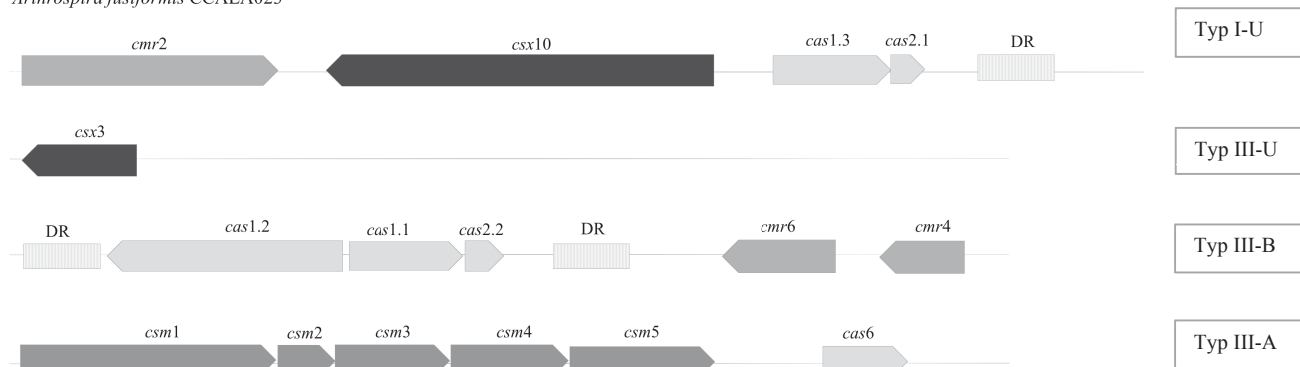


Schemat 10. Organizacja regionu CRISPR/Cas w genomie *A. platensis* NIES-39.



Schemat 11. Organizacja regionu CRISPR/Cas w genomie *A. platensis* YZ.

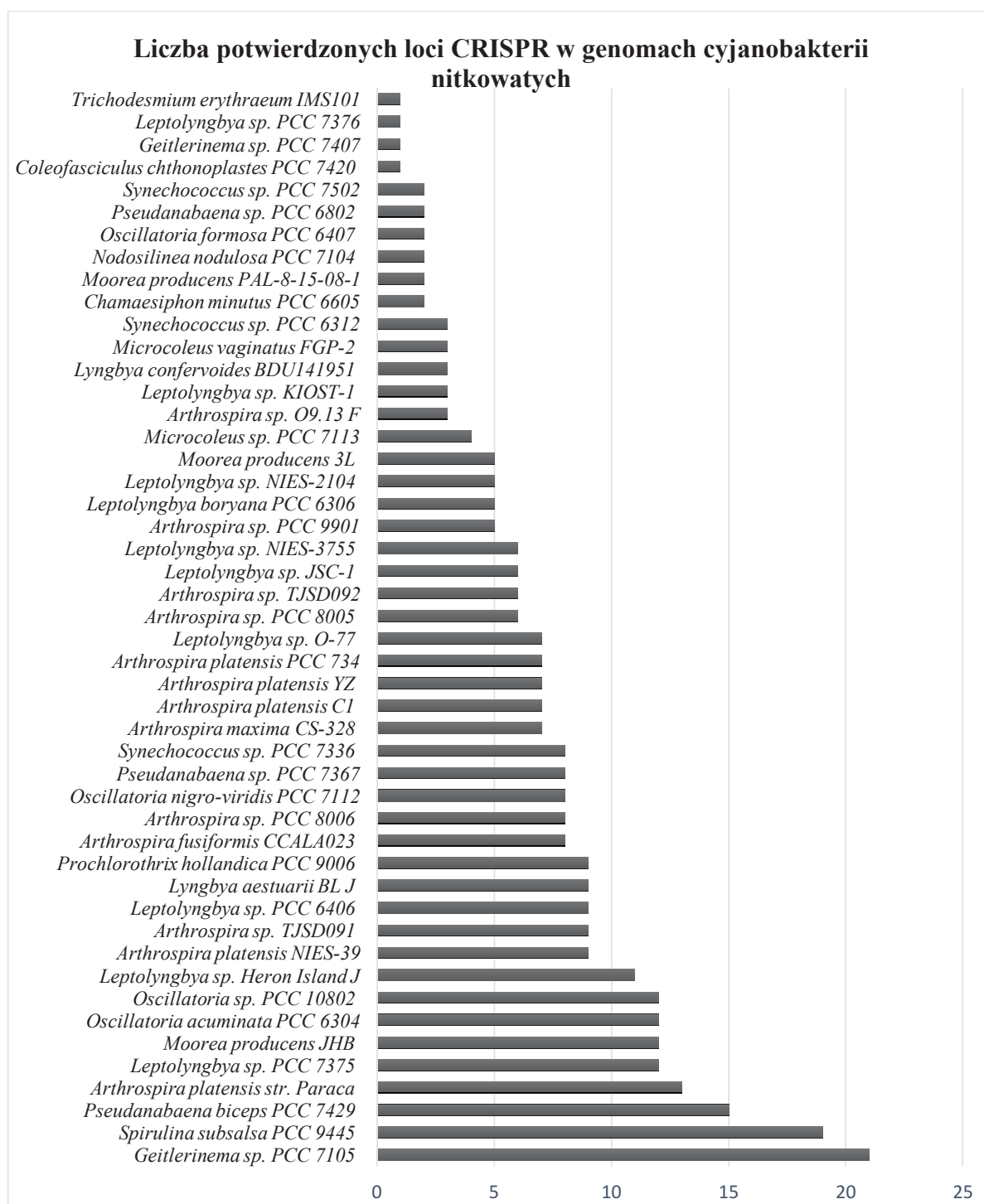
Arthrospira platensis str. Paraca**Schemat 12.** Organizacja regionu CRISPR/Cas w genomie *A. platensis* str. Paraca.*Arthrospira platensis* PCC 7345**Schemat 13.** Organizacja regionu CRISPR/Cas w genomie *A. platensis* PCC 7345.*Arthrospira* sp. PCC 8006**Schemat 14.** Organizacja regionu CRISPR/Cas w genomie *Arthrospira* sp. PCC 8006.

Arthrospira fusiformis CCALA023

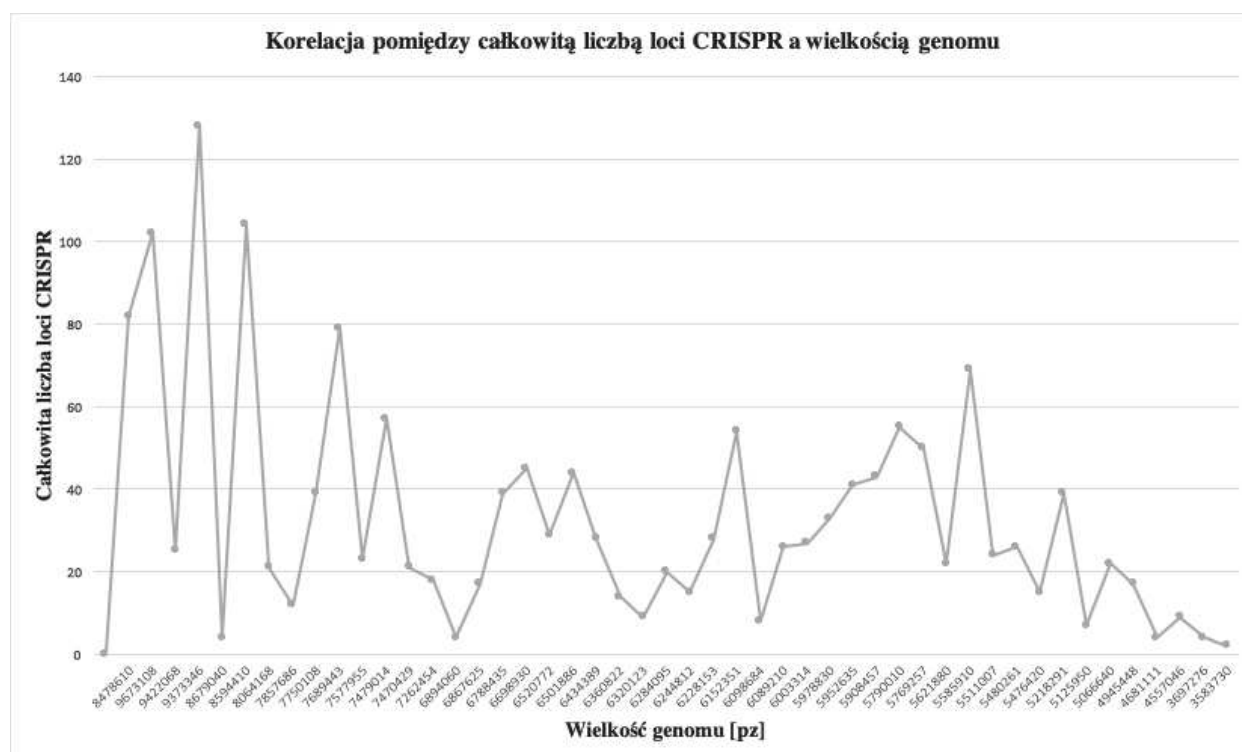
Schemat 15. Organizacja regionu CRISPR/Cas w genomie *A. fusiformis* CCALA023.

7.2.5. Analiza porównawcza sekwencji genów CRISPR/Cas oraz liczby loci CRISPR u *Oscillatoriales* (Subsection III).

W celu określenia stopnia konserwacji genów *cas* oraz RAMP w obrębie rzędu, przeprowadzono analizę porównawczą z wykorzystaniem 35 genomów należących do rzędu *Oscillatoriales* dostępnych w bazie GenBank (*Materiały* 5.16., *Metody* 6.5.2.5.). Analiza porównawcza z użyciem narzędzia BLAST zidentyfikowanych genów *cas* oraz RAMP w genomach *Arthrospira* względem 35 genomów cyjanobakterii nitkowatych wykazała ich unikalność w obrębie rodzaju. W żadnym z analizowanych genomów *Oscillatoriales* nie wykryto genów *cas* lub RAMP charakterystycznych dla *Arthrospira*. Największą liczbę potwierdzonych loci CRISPR zidentyfikowano w genomie *Geitlerinema* sp. PCC 7105 – 33, a najmniejszą u *Coleofasciculus chthonoplastes* PCC 7420, *Geitlerinema* sp. PCC 7407, *Leptolyngbya* sp. PCC 7376 oraz *Trichodesmium erythraeum* IMS101 – 1 (Wykres 1). Określono również brak korelacji pomiędzy wielkością genomu, a całkowitą liczbą zidentyfikowanych loci CRISPR (Wykres 2).



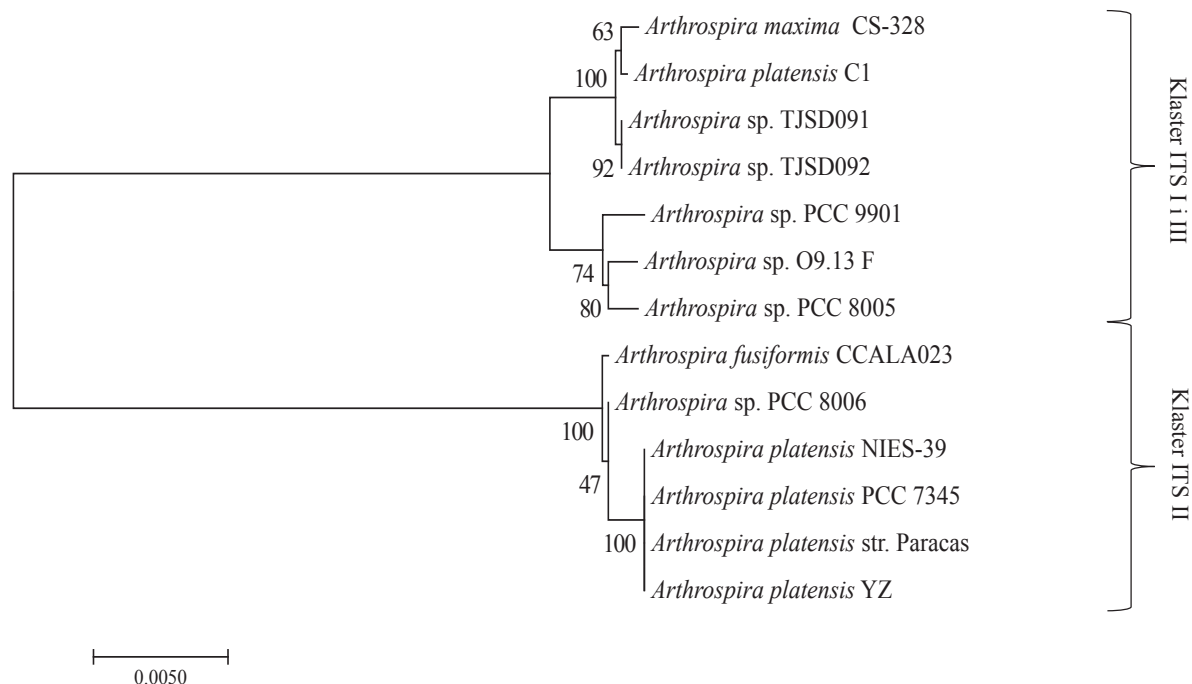
Wykres 1. Liczba potwierdzonych loci CRISPR w genomach cyjanobakterii nitkowatych.



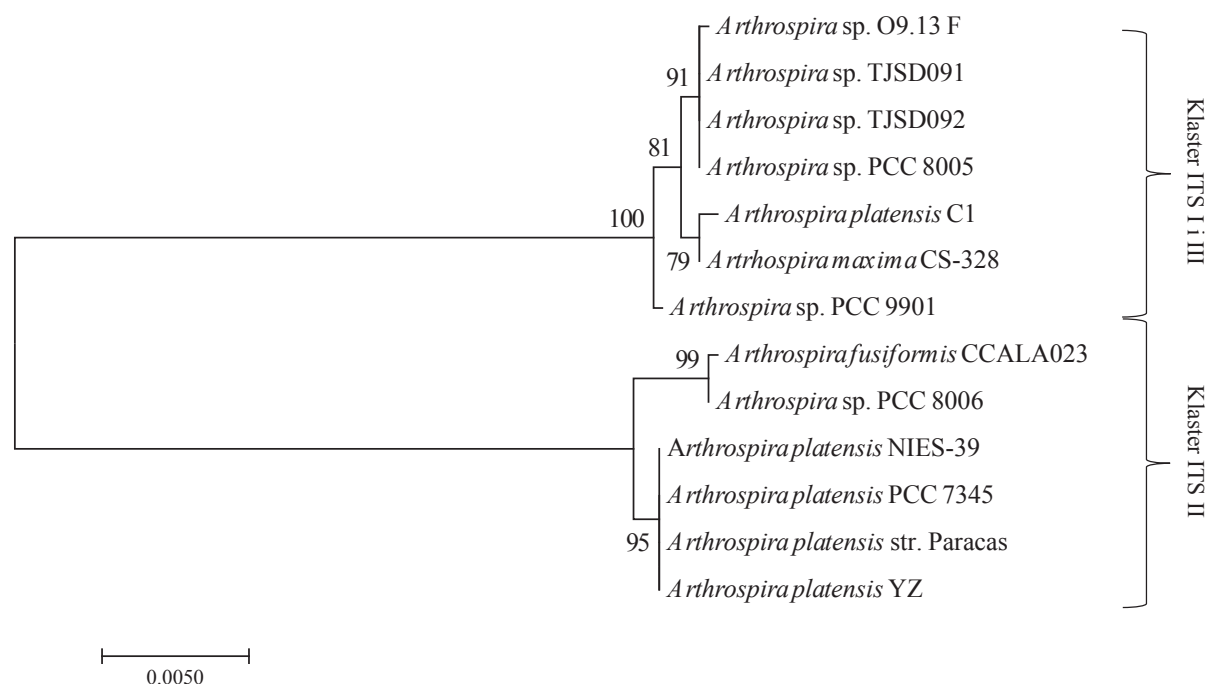
Wykres 2. Analiza zależności całkowitej liczby loci CRISPR w genomie od jego wielkości.

7.2.6. Analiza filogenetyczna na podstawie sekwencji genów kodujących systemu RM oraz CRISPR/Cas.

W celu potwierdzenia dychotomii rodzaju *Arthrospira*, którą sugerują uzyskane wyniki analizy sekwencji nukleotydowych genów kodujących systemu R-M, *cas* oraz RAMP przeprowadzono analizę filogenetyczną (Metody 6.5.2.6.). Do analizy wykorzystano geny R-M, *cas* oraz RAMP obecne we wszystkich genomach *Arthrospira*. Analiza filogenetyczna połączonych sekwencji 11 genów *cas* i RAMP (Rycina 6) oraz połączonych sekwencji 22 genów kodujących systemu R-M typu I, R-M typu II, genów *cas* oraz RAMP (Rycina 7) potwierdza dychotomię w obrębie rodzaju *Arthrospira*. Sekwencje nukleotydowe analizowanych genów różnią się pomiędzy szczepami należącymi do różnych klastrow ITS. Ponieważ obserwowane polimorfizmy to substytucje niesynonimiczne to sekwencje aminokwasowe kodowanych przez nie białek są odmienne.



Rycina 6. Drzewo filogenetyczne M-L połączonych sekwencji 11 genów *cas* oraz RAMP z trzynastu genomów *Arthrospira*.



Rycina 7. Drzewo filogenetyczne M-L połączonych sekwencji 22 genów kodujących systemy R-M typu I, R-M typu II, genów *cas* oraz RAMP z trzynastu genomów *Arthrospira*.

7.2.7. Identyfikacja klastrow genów kodujących biosyntezę metabolitów wtórnych w genomach *Arthrospira*.

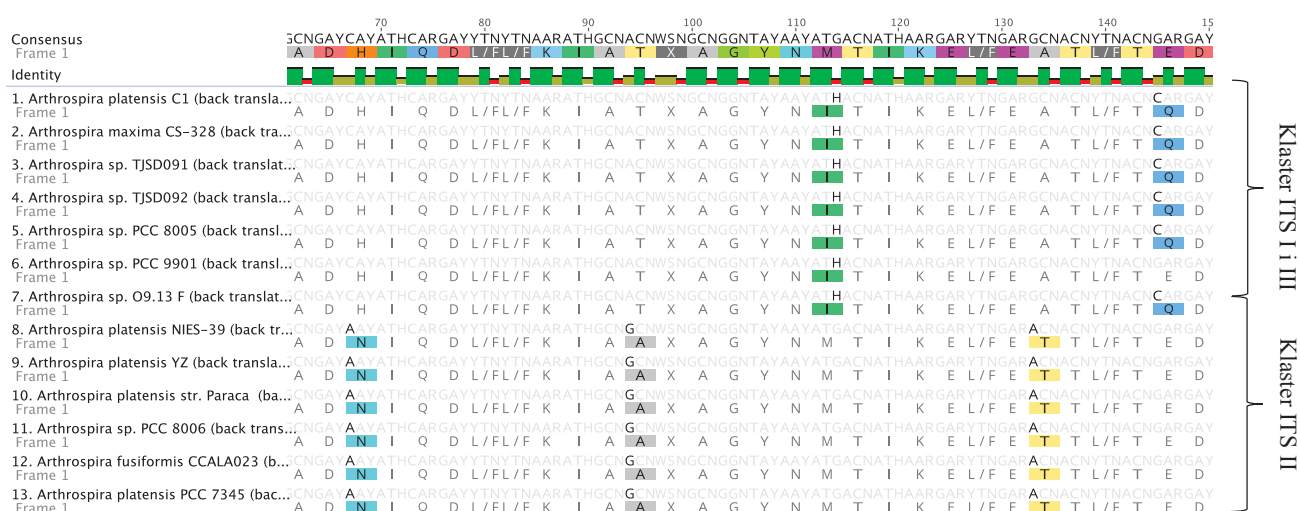
Kolejnym krokiem w analizie filogenomicznej *Arthrospira* była identyfikacja genów kodujących biosyntezę metabolitów wtórnych w dostępnej puli genomów oraz ich analiza porównawcza (Metody 6.5.3.). Analiza trzynastu genomów *Arthrospira* w platformie AntiSMASH wykazała obecność łącznie ośmiu różnych klastrow genów kodujących enzymy biorące udział w syntezie metabolitów wtórnych (Tabela 15). Należały do nich: syntaza fytoenu, grupa peptydów podobna do rodziny Niff-11, syntaza beta-keto-acylo-ACP (ang. *Acyl Carrier Protein*), metaloproteaza RseP regulująca proteolizę międzymembranową RIP (ang. *Regulated Intramembrane Proteolysis*), beta-N-acetyloglukozaminylotransferaza undekaprenyldifosfo-muramylopentapeptydu, proteaza dojrzewania cyjanobaktyn z rodziny PatA/PatG, rodzina mikrocyklamidu/patelamidu RiPP (ang. *Ribosomally synthesized and Post-translationally modified Peptides*), syntaza fytoenu oraz cyklaza adenylowa.

Determinanty genetyczne pięciu klastrow: rodzinę peptydów Niff-11-podobną, syntazę fytoenu, metaloproteazę RseP regulującą proteolizę międzymembranową RIP (ang. *Regulated Intramembrane Proteolysis*) oraz beta-N-acetyloglukozaminylotransferazę undekaprenyldifosfo-muramylopentapeptydu wykryto we wszystkich trzynastu genomach. Proteaza dojrzewania cyjanobaktyn z rodziny PatA/PatG jest nieobecna w genomach *A. maxima* CS-328, *Arthrospira* sp. TJSD091 i TJSD092. Klaster rodziny mikrocyklamidu/patelamidu RiPP jest nieobecny w genomach *A. platensis* C1 i *Arthrospira* sp. TJSD091 oraz TJSD092. Klaster cyklazy adenylowej jest nieobecny w genomach *Arthrospira* sp. TJSD091 oraz TJSD092 (Tabela 15).

Nie zaobserwowano korelacji pomiędzy obecnością determinant genetycznych a genotypem *Arthrospira*. Jednakże, podobnie jak w przypadku sekwencji nukleotydowych genów kodujących systemy R-M typu I i II oraz związanych z systemami CRISPR/Cas (Wyniki 7.2.2., 7.2.3, 7.2.4.2.) podczas analizy sekwencji nukleotydowej genów kodujących klastry biosyntezy metabolitów wtórnych zaobserwowano pojedyncze polimorfizmy pomiędzy genomami należącymi do klastra ITS I i III a genomami należącymi do klastra ITS II. Przykładowo, dla sekwencji genu kodującego białko rodziny peptydów Niff-11 na 252 pz 11 pozycji jest zmiennych, w tym 6 to substytucje niesynonimiczne, które pozwalają na rozróżnienie sekwencji tego genu szczepów zaliczanych do klastra ITS I i III oraz szczepów zaliczanych do klastra ITS II (Rycina 8).

Tabela 15. Zestawienie wyników identyfikacji klastrów genów kodujących biosyntezę metabolitów wtórnych w trzynastu genomach *Arthrospira*: ✓ - klaster jest obecny w genomie, – - klaster jest nieobecny w genomie.

<i>Genom Arthrospira</i>	<i>Klaster ITS</i>	<i>Rodzina peptydów NifH-11-podobna</i>	<i>syntaza fitoenu</i>	<i>syntaza beta-keto-acylo-ACP</i>	<i>proteaza dojrzewania cyjanobaktyn z rodziny PatA/PatG</i>	<i>metaloproteaza regulująca proteolizę międzymembranową RIP</i>	<i>rodzina mikrocyklamidu/patelamidu RiPP</i>	<i>cyklaza adenylowa</i>	<i>beta-N-acetyloglukozaminylotransferaza undekaprenyldifosfomuramylopentapeptydu</i>
<i>Arthrospira platensis</i> C1	I.A	✓	✓	✓	✓	✓	–	✓	✓
<i>Arthrospira maxima</i> CS-328	I.A	✓	✓	✓	–	✓	✓	✓	✓
<i>Arthrospira</i> sp. TJSD091	I.A	✓	✓	✓	–	✓	–	–	✓
<i>Arthrospira</i> sp. TJSD092	I.A	✓	✓	✓	–	✓	–	–	✓
<i>Arthrospira</i> sp. PCC8005	I.B	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Arthrospira</i> sp. PCC9901	III	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Arthrospira</i> sp. O9.13 F	I.B/III	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Arthrospira platensis</i> NIES-39	II.A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Arthrospira platensis</i> YZ	II.A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Arthrospira platensis</i> str. Paraca	II.A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Arthrospira platensis</i> PCC7345	II.A/II.B	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Arthrospira fusiformis</i> CCALA023	II.B	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Arthrospira</i> sp. PCC8006	II.B	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓



Rycina 8. Porównanie najbardziej zmiennego fragmentu sekwencji genu kodującego białko rodziny peptydów Niff-11 w trzynastu genomach *Arthrospira*. Kolorami zaznaczono substytucje niesynonimiczne występujące pomiędzy sekwencjami szczepów należących do różnych klastrow ITS.

7.2.8. Identyfikacja regionów fagowych w genomach *Arthrospira*.

W literaturze brak jest potwierdzonych doniesień odnośnie fagów infekujących komórki *Arthrospira*. Sprawdzono natomiast sprawdzić ślady obecności profagów w analizowanej puli genomów (Metody 6.5.4.). We wszystkich trzynastu genomach *Arthrospira* zidentyfikowano za pomocą narzędzia PHASTER sześć różnych regionów fagowych, zawierające charakterystyczne dla nich geny (Tabela 16). Region nr 1 o długości 12 625 pz zidentyfikowany został w genomie *A. platensis* C1, a analiza narzędziem BLAST wykazał, że zawiera on prawdopodobnie gen kodujący fagową fosfodisesterazę diestru glicerofosforylu. Region nr 2 o długości 14 751 pz zidentyfikowano w genomie *A. platensis* NIES-39 i zawiera prawdopodobnie gen kodujący helikazę fagową. Region 3 został zidentyfikowany w genomie *A. platensis* C1 o długości 33 755 pz i zawiera prawdopodobnie gen kodujący fagowy inicjator płytki podstawkowej. Region 4 o wielkości 9 507 pz zidentyfikowano w genomie *A. platensis* C1. Region 5 zidentyfikowany w genomie *A. platensis* NIES-39 o długości 6 384 pz zawiera prawdopodobnie gen kodujący fagową transpozazę, natomiast region 6 zidentyfikowany w tym samym genomie o długości 12 868 pz koduje potencjalnie białko fagowe.

Jedynie region 5 jest obecny we wszystkich genomach *Arthrospira*. Pozostałe pięć zidentyfikowanych regionów były nieobecne w pojedynczych genomach (Tabela 16). Ponadto, zidentyfikowane regiony były niekompletne oraz wykazywały mniej niż 70% identyczności z regionami w bazie danych platformy PHASTER.

Tabela 16. Określenie obecności zidentyfikowanych sześciu regionów profagowych w trzynastu genomach *Arthrospira*: ✓ - region jest obecny w genomie, – - region jest nieobecny w genomie.

<i>Genom Arthrospira</i>	Klaster ITS	Region 1	Region 2	Region 3	Region 4	Region 5	Region 6
<i>Arthrospira platensis</i> C1	I.A	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Arthrospira maxima</i> CS-328	I.A	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Arthrospira</i> sp. TJSD091	I.A	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Arthrospira</i> sp. TJSD092	I.A	✓	P	P	✓	✓	–
<i>Arthrospira</i> sp. PCC8005	I.B	✓	P	–	✓	✓	✓
<i>Arthrospira</i> sp. PCC9901	III	✓	–	✓	✓	✓	✓
<i>Arthrospira</i> sp. O9.13 F	I.B/III	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Arthrospira platensis</i> NIES-39	II.A	✓	✓	✓	–	✓	✓
<i>Arthrospira platensis</i> YZ	II.A	✓	✓	✓	–	✓	✓
<i>Arthrospira platensis</i> str. Paraca	II.A	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Arthrospira platensis</i> PCC7345	II.A/II.B	–	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Arthrospira</i> sp. PCC8006	II.B	–	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Arthrospira fusiformis</i> CCALA023	II.B	–	✓	✓	✓	✓	✓

7.3. Analiza ekspresji genów R-M typu II oraz CRISPR/Cas w warunkach stresowych.

Systemy CRISPR/Cas zarówno jak R-M są zaangażowane w obronę komórki przed obcym DNA. Na podstawie udostępnionych wyników pracy Badri *et al.* (2015), sprawdzono zmianę ekspresji poszczególnych genów kodujących systemy obrony w warunkach stresowych jakimi jest poddanie działaniu promieniowania gamma (*Metody* 6.9.)

Wyniki analizy zmiany ekspresji genów kodujących systemy R-M typu II oraz CRISPR/Cas szczepu poddanego różnym dawkom promieniowania gamma zamieszczono w *Aneksie 3 Tabeli 1*. Zaobserwowano znaczące zmiany, zarówno supresję jak i nadekspresję, większości spośród analizowanych genów R-M oraz CRISPR/Cas w warunkach stresowych jakim jest poddanie działaniu promieniowania gamma imitującego warunki w kosmosie.

Geny kodujące system *Sp/II* (metylotransferazę i endonukleazę) były supresowane w warunkach 3200 Gy, natomiast przy zwiększonej dawce promieniowania do 5000 Gy zaobserwowano ich nadekspresję. Geny kodujące samotne metylotransferazy *BinI* oraz *MboI* zarówno w dawce 3200 Gy jak i 5000 Gy wykazywały supresję, która zwiększyła się wraz ze wzrostem promieniowania (odpowiednio -1,489 oraz -0,924 FC). Geny kodujące system R-M *AvaI* wykazały nadekspresję w obu dawkach promieniowania, jednak ponad trzykrotnie większą w przypadku dawki 5000 Gy w stosunku do 3200 Gy.

Podobny trend zaobserwowano dla poziomu ekspresji genów kodujących białka RAMP: *csm3*, *csx10*, *cmr2*, *csm1*, *csm2*, *csm3*, *csm4* oraz *csm5*, gdzie nadekspresja w warunkach 5000 Gy była wyższa co najmniej dwukrotnie niż w warunkach 3200 Gy. W przeciwieństwie do genu *cmr2*, geny *cmr4* oraz *cmr6* wykazały supresję. Dla genu *cmr4* odnotowano wyższą supresję w większej dawce Gy, natomiast gen *cmr6* wykazał mniejszą ekspresję przy niższej dawce promieniowania. Geny kodujące białko Cas1.3 wykazały wzrost ekspresji w dawce 3200 Gy i supresję w dawce 5000 Gy (odpowiednio 0,826 oraz -0,171 FC). Pozostałe geny *cas*: *cas1.1* wykazał delikatną nadekspresję, a gen *cas1.2* wykazał wyższą nadekspresję po dawce 3200 Gy niż 5000 Gy. Podobny wynik uzyskano dla genów *cas2* (*cas2.1* oraz *cas2.2*): nadekspresja była wyższa w przypadku niższej dawki promieniowania (*Aneks 3, Tabela 1*).

7.4. Amplifikacja regionów kodujących systemy RM oraz białek związanych z systemami CRISPR/Cas.

Wykorzystując standardową metodę PCR oraz zestaw zaprojektowanych specyficznych starterów (*Materiały* 5.9., *Metody* 6.6.) potwierdzono obecności genów kodujących *AsuIIR*, *AsuIIM*, *AvaIR*, *AvaIM*, *NheIR*, *NheIM*, *HindIIIR*, *HindIIIM*, *SacIIM*, *SacIIR*, *cas1.1*, *cas2.1*, *cmr6*, *csm3*, *csm4*, *csm5* i fragmentu *csm3-csm5*. Fotografie rozdziałów elektroforetycznych amplifikacji DNA zamieszczono w *Aneksie* 2 (Fotografie 1-17). Wyniki eksperymentalne pokrywają się i uzupełniają dane uzyskane w analizie *in silico*: systemy *AsuII*, *AvaI* oraz endonukleaza *SacII* są obecne we wszystkich badanych szczepach, system *HindIII* jest obecny w szczepach reprezentujących klaster ITS I, system *NheI* jest obecny jedynie w szczepach należących do klastra ITS I oraz III, a metylotransferaza *SacII* jest obecna jedynie w szczepach należących do klastra ITS II. Podobne wyniki uzyskano dla genów związanych z systemami CRISPR/Cas: geny *cas.1.1*, *cas2.1*, *cmr6*, *csm3*, *csm4* i *csm5* obecne są we wszystkich analizowanych szczepach. Zbiorcze zestawienie analizy *in silico* oraz PCR przedstawiono w Tabeli 12 i 14.

7.5. Eksperymentalne potwierdzenie funkcjonalności zidentyfikowanych metylotransferaz w komórkach *Arthrospira*.

Zidentyfikowane *in silico* systemy R-M, których obecność w genomie została potwierdzona eksperymentalnie zostały poddane dalszej analizie. W celu określenia aktywności zidentyfikowanych metylotransferaz, genomowe DNA ośmiu szczepów *Arthrospira* poddano analizie restrykcyjnej z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych enzymów restrykcyjnych (*BshNI* (*HgiCI*), *NheI*, *SplI* (*Pfl23II*), *Hin1I* (*AcyI*), *Eco88I* (*AvaI*), *Bsp143I* (*MboI*) i *Mph1103I* (*AvaIII*)) będących izoschizomerami systemów zidentyfikowanych w puli genomów. Przeprowadzono również symulacje trawienia *in silico* dla trzech genomów referencyjnych (*Arthrospira* sp. PCC 8005, *A. platensis* NIES-39 oraz faga lambda) w celu określenia liczby miejsc restrykcyjnych dla poszczególnych enzymów, które wyniki zamieszczono w Tabeli 17.

Tabela 17. Szacowana liczba miejsc restrykcyjnych *Bsh*NI (*Hgi*CI), *Nhe*I, *Sp*II (*Pfl*23II), *Hin*II (*Acy*I), *Eco*88I (*Ava*I), *Bsp*143I (*Mbo*I) i *Mph*1103I (*Ava*III)) w trzech referencyjnych genomach.

Enzym restrykcyjny	<i>Arthrospira</i> sp. PCC 8005 (6 228 153 pz)	<i>Arthrospira platensis</i> NIES-39 (6 788 436 pz)	Fag lambda (14 087 pz)
<i>Bsh</i> NI (<i>Hgi</i> CI)	754	832	25
<i>Pfl</i> 23II (<i>Sp</i> II)	7	12	1
<i>Bsp</i> 143I (<i>Mbo</i> I)	23 286	23 800	117
<i>Eco</i> 88I (<i>Ava</i> I)	24 630	1 206	8
<i>Hin</i> II (<i>Acy</i> I)	226	134	40
<i>Mph</i> 1103I (<i>Ava</i> III)	55	79	14
<i>Nhe</i> I	37	50	1

Wyniki reakcji trawienia DNA genomowego ośmiu szczepów *Arthrospira* wskazują, iż zidentyfikowane *in silico* metylotransferazy *Bsh*NI (*Hgi*CI), *Nhe*I, *Sp*II (*Pfl*23II), *Hin*II (*Acy*I), *Eco*88I (*Ava*I), *Bsp*143I (*Mbo*I) i *Mph*1103I (*Ava*III) są funkcjonalne w komórkach (*Aneks* 2, Fotografie 18-24). Świadczy o tym brak produktów cięcia enzymami restrykcyjnymi – DNA chronione jest poprzez metylację w poszczególnych miejscach restrykcyjnych w przeciwieństwie do DNA faga lambda (kontrola).

7.6. Klasyfikacja szczepów *Arthrospira* stanowiących biomasę komercyjnych preparatów wyprodukowanych w Mongolii i Indiach.

W celu identyfikacji szczepów *Arthrospira* wykorzystywanych do produkcji komercyjnie dostępnych preparatów z liofilizowanej biomasy tego mikroorganizmu wyekstrahowano DNA i wykorzystano je jako matrycę do reakcji amplifikacji PCR regionu ITS (*Metody* 6.7.) Celem tego doświadczenia było określenie czy biomasa sprzedawana komercyjnie pochodzi z jednorodnej czy też mieszanej populacji *Arthrospira*. Wykorzystując reakcję PCR ze starterami specyficznymi dla pięciu wariantów ITS (I.A, I.B, II.A, II.B, III) (*Materiały* 5.10., *Metody* 6.7.) określono liczbę wariantów rejonu ITS w totalnym DNA analizowanych preparatów.

Reakcje amplifikacji poszczególnych wariantów ITS wykazały, że DNA wyizolowane z preparatu pochodzącego z Indii posiada jeden wariant ITS – I.A (Tabela 18; *Aneks* 2, Fotografia 25). Można zatem wnioskować, iż jest to populacja jednorodna. W przypadku biomasy preparatu pochodzącego z Mongolii zidentyfikowano trzy warianty ITS – I.A, II.B oraz III –

co może świadczyć o obecności mieszanej populacji *Arthrospira* (Tabela 18; Aneks 2, Fotografie 25, 28, 29).

Tabela 18. Wyniki klasyfikacji szczepów *Arthrospira* stanowiących biomasę komercyjnych preparatów wyprodukowanych w Indiach i Mongolii.

<i>Wynik reakcji PCR ze starterami specyficznymi na różnych wariantów ITS</i>					
<i>Pochodzenie preparatu</i>	I.A	I.B	II.A	II.B	III
<i>Indie</i>	+	-	-	-	-
<i>Mongolia</i>	+	-	-	+	+

7.7. Badanie czystości mikrobiologicznej preparatów zawierających biomasę *Arthrospira*.

Komercyjnie dostępne preparaty zawierające suchą biomasę *Arthrospira* zaklasyfikowane są jako suplementy diety, dlatego też powinny być bezpieczne dla zdrowia ludzi i zwierząt. Niestety z uwagi na regulacje prawne jakim podlegają suplementy diety, w czasie ich rejestracji producent nie ma wymogu certyfikowania każdej partii sprzedawanego preparatu. Fakt ten wiąże się z niedostateczną kontrolą jakości zarówno pod względem chemicznym jak i mikrobiologicznym. Dane literaturowe potwierdzają obecność innych mikroorganizmów w sprzedawanych preparatach. W ramach niniejszej pracy przeprowadzono badanie czystości mikrobiologicznej siedmiu preparatów dostępnych na polskim rynku stosując standardy Farmakopei X Polskiej dla produktów leczniczych (*Metody* 6.10.).

7.7.1. Liczba CFU w 1 g preparatów z biomasą *Arthrospira*.

Wyniki wartości CFU (ang. *Colony Forming Units*) na 1 g (*Metody* 6.10.1.) produktu dla sześciu preparatów z biomasą *Arthrospira* przedstawia Tabela 19.

Tabela 19. Wyniki uzyskanych wartości CFU/g produktu z suchą biomasą *Arthrospira*.

<i>Producent</i>	<i>Pochodzenie</i>	<i>CFU/g</i>
<i>Green Essence</i>	Pakistan	$3,46 \cdot 10^5$
<i>Febico</i>	Tajwan	0
<i>Cyanotech</i>	Hawaje	$8,9 \cdot 10^8$
<i>Parry Nutraceuticals</i>	Indie	$2,2 \cdot 10^7$
<i>Biogate Polden</i>	Chiny	$4,52 \cdot 10^6$
<i>Norland</i>	Mongolia	$1,6 \cdot 10^9$

7.7.2. Określenie obecności poszczególnych bakterii w preparatach zawierających biomasę *Arthrospira*.

Kolejnym krokiem w analizie czystości mikrobiologicznej preparatów z biomasą *Arthrospira* było potwierdzenie nieobecności w preparacie *E. coli*, *Salmonella* sp., *S. aureus* oraz Gram-ujemnych bakterii tolerujących żółć (*Metody* 6.10.2.).

W żadnym z badanych preparatów nie stwierdzono obecności *E. coli*, *Salmonella* sp. oraz bakterii Gram-ujemnych tolerujących żółć (Tabela 20). W preparatach firmy Parry Nutraceuticals (Indie) oraz Norland (Mongolia) zaobserwowano wzrost mannitolo-dodatnich bakterii na podłożu Chapmana, które poddano dalszej analizie identyfikacyjnej (Tabela 20).

Tabela 20. Potwierdzenie lub wykluczenie obecności wybranych rodzajów bakterii w preparatach zawierających biomasę *Arthrospira* dostępnych na polskim rynku: (+) – wynik pozytywny – dany rodzaj bakterii jest obecny w preparacie; (-) – wynik negatywny – dany rodzaj bakterii jest nieobecny w preparacie.

Test na nieobecność	Badany preparat						
	Parry Nutraceuticals (Indie)	Biogate Polden (Chiny)	Cyanotech (USA)	Nordland (Mongolia)	Green Essence (Pakistan)	Febico (Tajwan)	Swanson (Indie)
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus</i>	+	-	-	+	-	-	-
Bakterii Gram (-) tolerujących żółć	-	-	-	-	-	-	-

7.7.3. Identyfikacja bakterii z rodzaju *Staphylococcus*.

W związku z wyizolowaniem mannitolo-dodatnich bakterii na podłożu Chapmana w przypadku dwóch preparatów, w preparacie firmy Nordland oraz Parry Nutraceuticals (*Wyniki* 7.8.2.), sprawdzono czy mikroorganizmy te można zaklasyfikować do rodzaju *Staphylococcus*. W preparacie mikroskopowym preparatu firmy Norland wybarwionym metodą Grama zaobserwowano Gram-dodatnie ziarniaki. Bakterie te fermentowały mannitol na podłożu z mannitolem i chlorkiem sodu. Za pomocą komercyjnego testu M43 MICROGEN STAPH jak i testu na koagulazę, określono, że były koagulazo-ujemne, co wykluczało ich przynależność

do gatunku *Staphylococcus aureus* oraz innych koagulazo-dodatnich gronkowców posiadających białko A.

Test na obecność katalazy wskazał wynik dodatni. Na podstawie analizy testem komercyjnym STAPHYtes24 zidentyfikowano *Staphylococcus saprophiticus* spp. *saprophiticus*.

Natomiast, w preparacie firmy Parry Nutraceuticals, dla którego wyniki poprzednich badań również sugerowały obecność mannitolo-dodatnich gronkowców – nie zaobserwowano Gram-dodatnich ziarniaków. Obserwacja mikroskopowa preparatów wybarwionych metodą Grama wykazała obecność Gram-dodatnich laseczek, najprawdopodobniej z rodzaju *Bacillus*.

7.8. Badanie obecności środków konserwujących w tabletkach z biomasą *Arthrospira* firmy Febico (Tajwan).

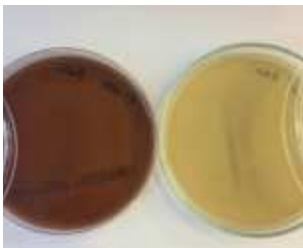
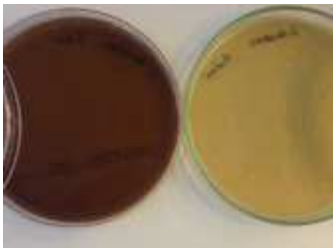
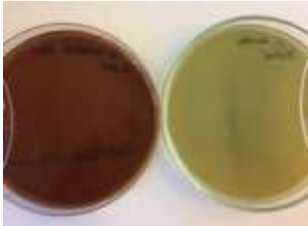
Wyniki powyższych badań czystości mikrobiologicznej (Wyniki 7.8.), wykazały całkowity brak hodowalnych mikroorganizmów w preparacie pochodzących z Tajwanu (Febico). Stosując procedury i podłoża przewidziane w Farmakopei Polskiej X wartość CFU/g wynosiła 0. Brak jakichkolwiek mikroorganizmów świadczyć może nie tyle o czystości mikrobiologicznej preparatu, lecz o tym, iż poddany został działaniu środków o charakterze bakteriobójczym lub konserwującym. Obydwie grupy związków nie powinny występować w suplementach diety. Dlatego też, preparat przebadano pod kątem obecności środków konserwujących w preparacie, hamujących wzrost mikroorganizmów. W tym celu wykorzystano metodologię stosowaną do analizy jakości i czystości produktów kosmetycznych opisaną w Metodach (6.11.).

7.8.1. Ocena skuteczności zakonserwowania produktu.

Po pierwszej dobie po inkubacji zaobserwowano wzrost wszystkich szczepów, którymi zakażono preparat „Spirulina”. Po trzeciej dobie inkubacji nie zaobserwowano wzrostu szczepów *E. coli* i *S. aureus* na podłożach testowych. Po trzeciej dobie inkubacji, „pasta” zakażona *C. albicans*, całkowicie przerosła drobnoustrojami, co wiązało się z koniecznością zakończenia testu z użyciem tych drobnoustrojów.

Posiewy po siódmej dobie inkubacji, również nie wykazały wzrostu *E. coli* i *S. aureus*. Test konserwacji zakończono po 14 dobie inkubacji, ze względu na obfity wzrost pleśni na badanej „paście”. Zbiorne wyniki oceny skuteczności zakonserwowania preparatu firmy Febico z dokumentacją zdjęciową przedstawia Tabela 21.

Tabela 21. Wyniki oceny skuteczności zakonserwowania produktu zawierającego suchą biomasę *Arthrospira* z Tajwanu.

<i>Doba inkubacji</i>	<i>E.coli</i> ATCC 8738	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>C. albicans</i> ATCC II
0			
1			
3			
7			
14			Brak

14



Brak

7.9. Bakterie symbiotyczne wyizolowane z suchej i mokrej biomasy *Arthrospira*.

7.9.1. Charakterystyka i identyfikacja bakterii symbiotycznych wyizolowanych z suchej biomasy *Arthrospira* pochodzącej z preparatów *Spirulina* dostępnych na polskim rynku.

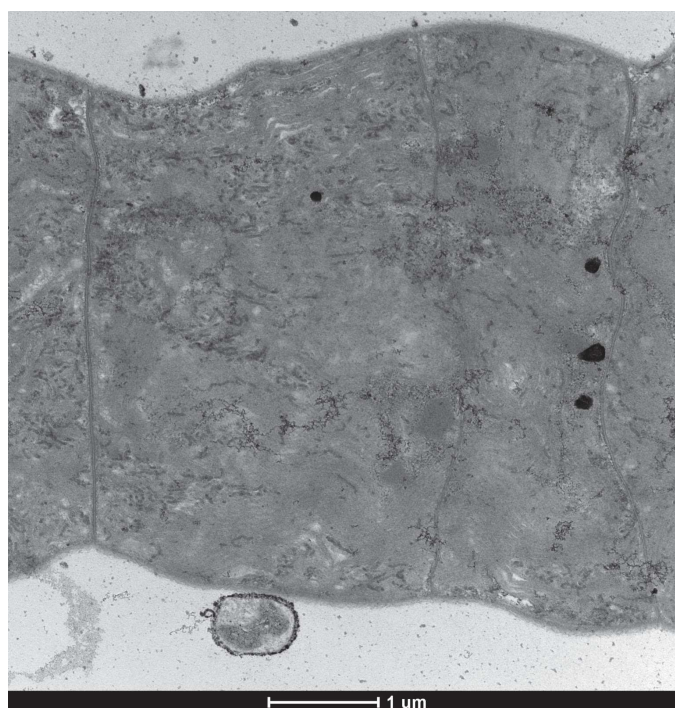
Z doświadczenia w pracy z *Arthrospira* wiemy, że nie jest ona zdolna do wzrostu w monohodowlach (Fotografia 5). Wyniki analizy czystości mikrobiologicznej (Wyniki 7.7.) również sugerują obecność konsorcjum mikrobiologicznego w preparatach komercyjnie dostępnych zawierających suchą biomasę. Opracowano specjalne podłoże do hodowli mikroorganizmów symbiotycznych z *Arthrospira* zawierające ekstrakt z *Arthrospira* (Materiały 5.4.2., Metody 6.1.). Z sześciu analizowanych suplementów diety uzyskano 46 izolatów bakteryjnych, które następnie scharakteryzowano pod względem morfologicznym biochemicznym oraz genetycznym (Materiały 5.2., Metody 6.13.) Zbiorcze zestawienie wyników uzyskanych dla wszystkich 46 izolatów przedstawiono w Aneksie 4 Tabeli 1.

Wszystkie 46 izolaty wykazywały zdolność do wzrostu zarówno na podłożu Zarrouk z glukozą, ksylozą jak i ramnozą (Materiały 5.4.2.). Wszystkie wyizolowane szczepy wykazywały również wzrost na podłożu Mueller-Hintona oraz podłożu Halomonas Medium (Materiały 5.4.3.). W przypadku 26 szczepów sprawdzono zdolność do wzrostu na podłożu MYP Agar (Materiały 5.4.3.) wykorzystywanym do izolacji i hodowli bakterii z rodzaju *Bacillus*. Wszystkie spośród badanych 26 izolatów były zdolne do wzrostu na tym podłożu, jednak nie powodowały charakterystycznego dla *Bacillus cereus* zmętnienia podłoża. Ponadto zaobserwowano, iż 44 z 46 izolatów, wykazała zdolność do wzrostu oraz rozkładu mannitolu na podłożu Chapmanna (Materiały 5.4.3.) Nie zaobserwowano wzrostu badanych izolatów na podłożu MacConkeya (Materiały 5.4.3.), które jest dedykowane do hodowli Gram-ujemnych pałeczek jelitowych.

Analiza mikroskopowa wszystkich izolatów w preparatach barwionych metodą Grama wykazała, iż jedenaście szczepów to laseczki zaś pozostałe 32 to pałeczki. Wśród laseczek tylko

jeden izolat, pochodzący z preparatu wyprodukowanego w USA, był Gram-ujemny, natomiast tylko pięć szczepów pałeczek było Gram-dodatnich.

Należy podkreślić, że wszystkie bakterie towarzyszące *Arthrospira* nie wykazywały wzrostu na podłożach mineralnych bez dodatku organicznych związków węgla, co świadczy, iż są heterotrofami. Wykazują wzrost na podłożach zawierających hydrolizaty białkowe i ekstrakt drożdżowy lub z pożywki z hodowli cyjanobakterii, co oznacza, że do wzrostu wymagają obecności aminokwasów i być może witamin co należy sprawdzić w dalszych badaniach.



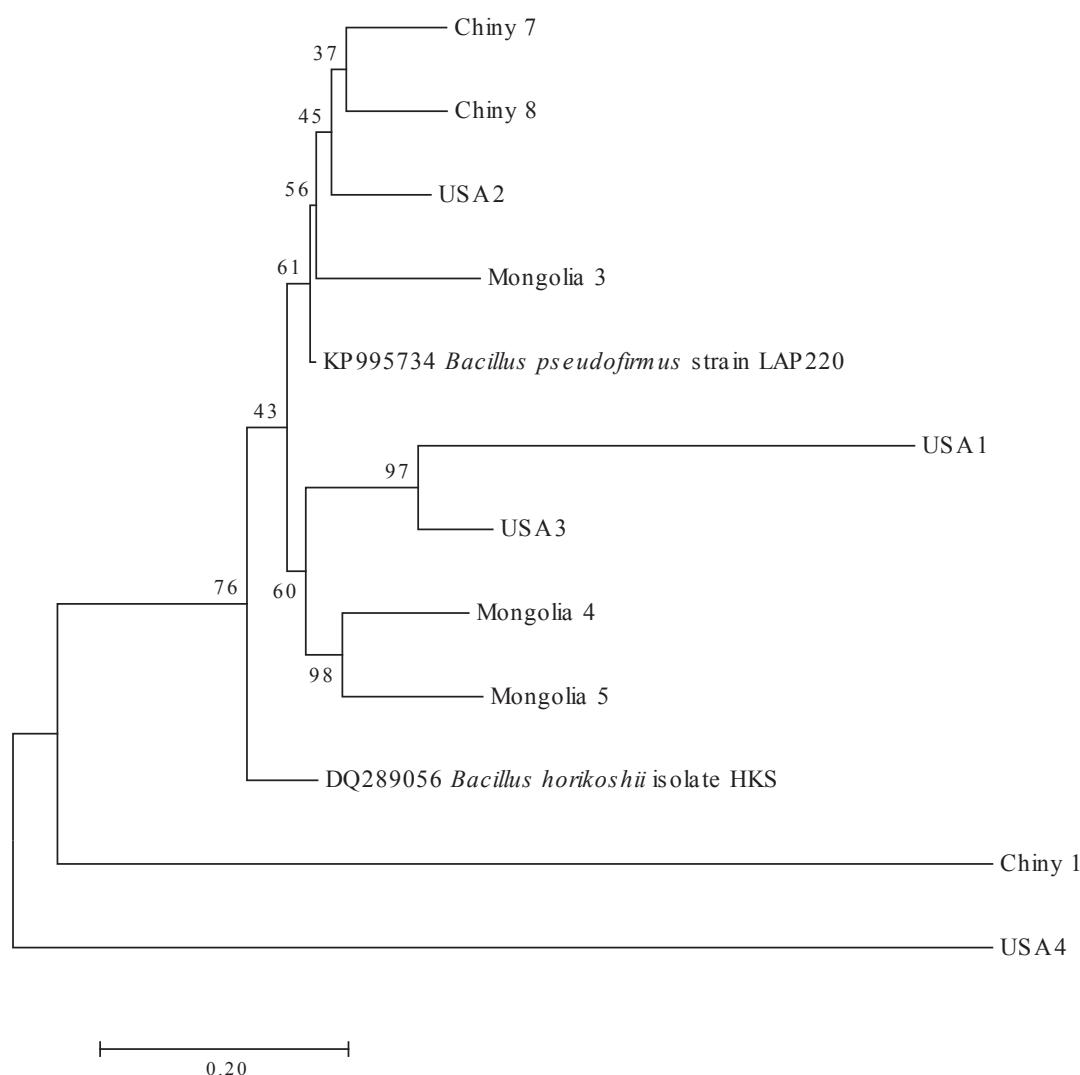
Fotografia 5. Zdjęcie z transmisyjnego mikroskopu elektronowego komórki *Arthrospira* sp. O9.13 F oraz towarzyszącej jej komórki bakteryjnej.

7.9.2. Analiza filogenetyczna szczepów wyizolowanych z suchej biomasy *Arthrospira*.

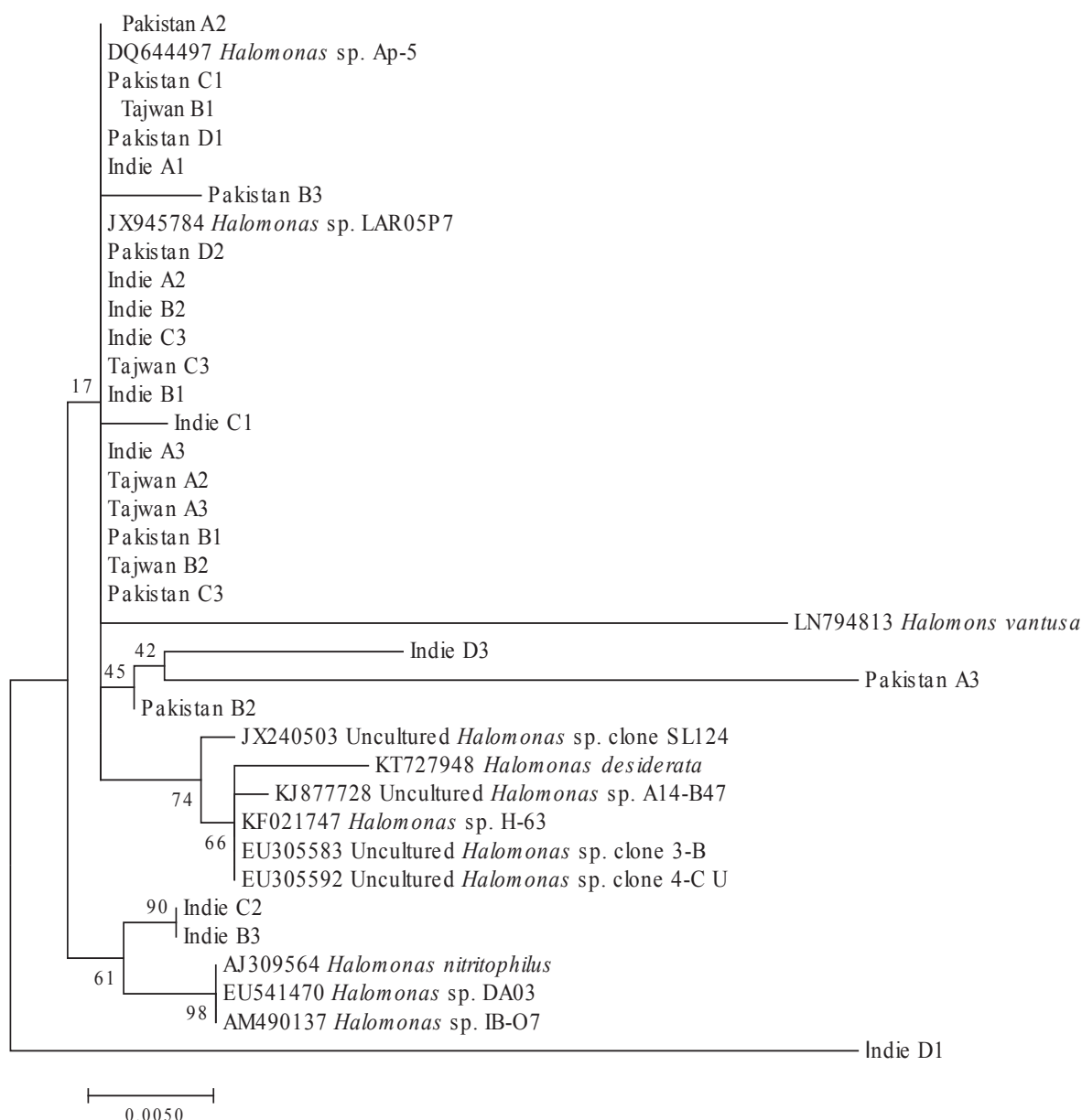
W celu klasyfikacji wszystkich 46 izolatów bakterii wykonano analizę sekwencji genu kodującego 16S rRNA. W rezultacie wykazano przynależność 22 izolatów do rodzaju *Halomonas*, 11 do rodzaju *Bacillus*, 6 do rodzaju *Roseinatronobacter*, 1 do rodzaju *Rhodobaca* oraz 6 określono jedynie ich bliskie podobieństwo do niehodowlanych bakterii (ang. *uncultured bacterium*) (Aneks 4 Tabela 1).

Izolaty bakterii wyizolowanych z suchej biomasy *Arthrospira* oznaczone jako: Indie A1-A3, Indie B1-B3, Indie C1-C3, Indie D1, Indie D3, Pakistan A2, Pakistan A3, Tajwan C3, Tajwan B1, Tajwan B2, Tajwan A2, Tajwan A3, Pakistan D1, Pakistan D2, Pakistan C1,

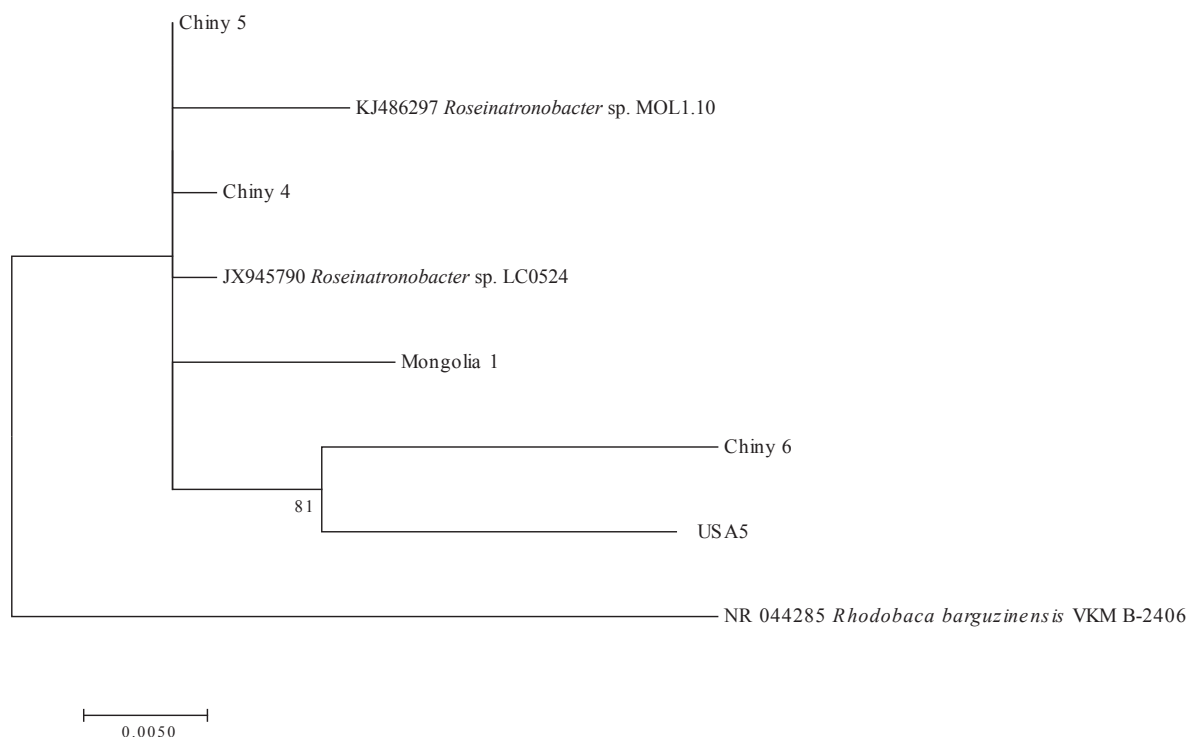
Pakistan C3, Pakistan B1-B3 wykazały najbliższe pokrewieństwo do rodzaju *Halomonas* (Rycina 9). W przypadku czterech izolatów, USA 1-3 i Chiny 1, możliwa była ich pełna identyfikacja i klasyfikacja do rodzaju do *Bacillus horikoshii*, o czym świadczy identyczność sekwencji >97% z sekwencji z bazy danych nr GenBanku. Natomiast szczepy USA 4, Chiny 7, Chiny 8, Mongolia 3-5 zidentyfikowano jako *Bacillus pseudofirmus* (Rycina 8). Kolejne cztery izolaty, Mongolia 1, Chiny 4-6, wykazały największe podobieństwo do bakterii z rodzaju *Roseinatronobacter*. Sekwencja 16S rRNA szczepu USA 3 była w 64,3% identyczna z sekwencją *Rhodobaca barguzinensis* (Rycina 10).



Rycina 8. Drzewo filogenetyczne zbudowane metodą ML sekwencji 16S rRNA 10 izolatów z suchej biomasy *Arthrospira* oraz sekwencji referencyjnych szczepów uzyskanych z bazy GenBank.



Rycina 9. Drzewo filogenetyczne zbudowane metodą ML sekwencji 16S rRNA 25 izolatów z suchej biomasy *Arthrospira* oraz sekwencji referencyjnych szczepów uzyskanych z bazy GenBank.



Rycina 10. Drzewo filogenetyczne zbudowane metodą ML sekwencji 16S rRNA 5 izolatów z suchej biomasy *Arthrospira* oraz sekwencji referencyjnych szczepów uzyskanych z bazy GenBank.

7.9.3. Bakterie symbiotyczne wyizolowane z mokrej biomasy *Arthrospira* poddanej działaniu promieniowania gamma.

W ramach projektu bilateralnego Polsko – Flandryjskiego pt. „Fizjologia, biologia komórki i biotechnologia jadalnych cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira*” sprawdzono odporność różnych szczepów *Arthrospira* na działanie promieniowania jonizującego. W niniejszej pracy sprawdzono czy różna przeżywalność obserwowana wśród szczepów cyjanobakterii nie wynika z odmiennego składu gatunkowego i liczebności bakterii towarzyszącym sinicom.

W związku z powyższym jedenaście szczepów *Arthrospira* poddano działaniu promieniowania gamma w trzech dawkach (900, 2100 oraz 5000 Gy). Następnie z hodowli wyizolowano bakterie symbiotyczne z użyciem podłoża z glukozą oraz ekstraktem z pożywki *Arthrospira* (Materiały 5.4.2., Metody 6.14.) W tabeli nr 22 przedstawiono szczepy poddane działaniu promieniowania gamma w odpowiedniej dawce oraz liczbę izolatów bakterii symbiotycznych wyizolowanych z danej hodowli *Arthrospira*. Z hodowli kontrolnych (0 Gy) wyizolowano 12 szczepów bakteryjnych, z hodowli poddanej działaniu promieniowania w

dawce 900 Gy wyizolowano jeden szczep, z hodowli poddanej działaniu promieniowania w dawce 2100 Gy wyizolowano 15 szczepów bakteryjnych, a z hodowli poddanej działaniu promieniowania gamma w dawce 5000 Gy wyizolowano aż 20 szczepów bakteryjnych. Bardzo ciekawym wynikiem jest fakt, iż z hodowli poddanych wyższym dawkom promieniowania gamma (2100 i 5000 Gy) udało się wyizolować większą ilość szczepów niż z hodowli kontrolnej (0 Gy).

Tabela 22. Liczba izolatów uzyskanych z poszczególnych szczepów *Arthrospira* poddanych działaniu różnych dawek promieniowania gamma.

<i>Szczep Arthrospira</i>	<i>Dawka promieniowania gamma</i>			
	0 Gy	900 Gy	2100 Gy	5000 Gy
<i>Arthrospira fusiformis</i> AB2002/2	1	0	1	2
<i>Arthrospira</i> sp. O9.13 F	1	0	2	2
<i>Spirulina platensis</i> SAG21.99	1	0	1	2
<i>Arthrospira platensis</i> str. Paracas	1	1	1	2
<i>Arthrospira</i> sp. PCC 8005 fenotyp P2	1	0	1	2
<i>Arthrospira</i> sp. PCC 8005 fenotyp P6	2	0	5	2
<i>Arthrospira</i> sp. PCC 9901	1	0	1	2
<i>Arthrospira</i> sp. LV	2	0	1	3
<i>Arthrospira</i> sp. BURMA	1	0	1	2
<i>Arthrospira</i> sp. Moz 1	1	0	1	1
<i>Łącznie izolatów</i>	12	1	15	20

7.10. Badanie właściwości przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych ekstraktów metanolowych i wodnych z suchej biomasy *Arthrospira*.

Dane literaturowe dowodzą, iż ekstrakty wodne oraz alkoholowe z mokrej biomasy *Arthrospira* wykazują właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze (*Wstęp* 4.1.6.1.2.). W celu stwierdzenia, czy sucha biomasa *Arthrospira* dostępna komercyjnie posiada podobne właściwości przeprowadzono badanie właściwości przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych ekstraktów metanolowych oraz wodnych uzyskanych z czterech produktów pochodzących z Chin, Pakistanu, Tajwanu oraz USA (*Metody* 6.12.).

7.10.1. Ekstrakty metanolowe i wodne.

Uzyskano ekstrakty metanolowe oraz wodne w stężeniach przedstawionych w Tabeli 23.

Tabela 23. Stężenia uzyskanych ekstraktów wodnych i metanolowych z czterech produktów z suchą biomasa *Arthrospira*.

<i>Pochodzenie preparatu</i>	<i>Stężenie ekstraktu [mg/ml]</i>	
	Ekstrakt metanolowy	Ekstrakt wodny
<i>Febico (Tajwan)</i>	126	130
<i>Green Essence (Pakistan)</i>	200	220
<i>Biogate Polden (Chiny)</i>	170	213
<i>Cyanotech (USA)</i>	220	70

7.10.2. Właściwości przeciwbakteryjne ekstraktów z suchej biomasy *Arthrospira*.

Żaden z uzyskanych ekstraktów, w żadnym ze stężeń nie zahamował wzrostu *E. coli* ATCC 8738 ani *S. aureus* ATCC 6538, po inkubacji zaobserwowano wzrost we wszystkich studzienkach przy pozytywnej kontroli żywności i jałowości podłoża.

7.10.3. Właściwości przeciwgrzybicze ekstraktów z suchej biomasy *Arthrospira*.

W przypadku ekstraktu metanolowego uzyskanego z preparatu z Chin, zaobserwowano jedynie ograniczenie wzrostu (mniejszy poziom zmętnienia w porównaniu do pozostałych studzienek) *C. albicans* ATCC II w stężeniach 170 mg/ml i 85 mg/ml. Pozostałe ekstrakty nie ograniczały ani nie hamowały wzrostu szczepu referencyjnego, przy pozytywnych kontrolach żywności i jałowości podłoża. W celu dokładnej weryfikacji działania przeciwbakteryjnego i przeciwgrzybiczego, należałoby w przyszłości powtórzyć powyższe analizy z wykorzystaniem mokrej biomasy *Arthrospira*.

8. DYSKUSJA.

Cyjanobakterie z rodzaju *Arthrospira* to z pewnością interesujące organizmy z uwagi na ich jadalny charakter, a także potencjał biotechnologiczny. Wykorzystywane są na całym świecie do produkcji biomasy, wodoru, a także w procesie bioremediacji (Furmaniak *et al.*, 2017). Mimo, iż w ostatnich trzydziestu latach wzrost zainteresowania tymi organizmami oraz liczba prowadzonych nad nim badań zwiększyła się znacząco, wciąż wiele zagadnień nie zostało wyjaśnionych.

Przez długi czas nie udało się opracować skutecznego protokołu transformacji komórek *Arthrospira*. Pierwsze próby podjęto z zastosowaniem sonifikacji, polimerazy Taq oraz ligacji z wektorem TA (Kawata *et al.*, 1998). W późniejszym czasie stawiano na systemy z elementami transpozycji, kompleksów kationowych liposomów, genu reporterowego *cat* oraz elektroporacji – jednak żaden z powyższych protokołów nie został odtworzony przez inne zespoły badawcze (Toyomizu *et al.*, 2001; Kawata *et al.*, 2004). Dopiero w 2017 roku grupa Jeamton *et al.* przedstawiła stabilną i efektywną metodę transformacji szczepu *Arthrospira platensis* C1 opartą na elektroporacji i inhibicji systemów R-M typu I. Problemy z opracowaniem skutecznej metody pozwalającej na modyfikacje genetyczne rodzaju *Arthrospira* skłoniły mnie do zgłębienia zagadnienia obecności i aktywności systemów chroniących komórki bakteryjne przed wnikaniem obcych kwasów nukleinowych.

Badania Zhao *et al.* (2006) zasugerowały wysoką aktywność systemów R-M u cyjanobakterii nitkowatych, do których należy rodzaj *Arthrospira*. Dodatkowo określono, że liczba genów potencjalnie kodujących systemy R-M jest znacznie większa w przypadku cyjanobakterii nitkowatych niż cyjanobakterii jednokomórkowych, prawdopodobnie ze względu na ich ekstremofilny charakter i wodne środowisko bytowania. Lyra *et al.* (2000) w swoich badaniach wskazali, że najbardziej rozpowszechnione cyjanobakteryjne endonukleazy typu II to *AvaI*, *AvaII* oraz *AsuII*.

W ramach tej pracy zidentyfikowano *in silico* oraz potwierdzono eksperymentalnie obecność czternastu genów kodujących systemy R-M typu I, osiemnaście genów kodujących dziewięć kompletnych systemów R-M typu II (w tym *AvaI* oraz *AsuII*), geny kodujące dwie samotne metylotransferazy typu II oraz pojedyncze geny kodujące systemy R-M typu III i IV, które jednak nie były obiektem dalszych badań.

W 2010 roku (Fujisawa *et al.*) w genomie *A. platensis* NIES-39 zidentyfikowano 7 genów potencjalnie kodujących systemy R-M typu I, a analizy porównawcze przeprowadzone w ramach w tej pracy uzupełniły ten wynik o kolejne 5 loci. Systemy R-M typu II wzbudzają

zdecydowanie większe zainteresowanie niż typu I, III czy IV, ze względu na ich specyfikę jak również szereg zastosowań w biologii molekularnej, dlatego też większa uwaga została skupiona na analizie ich loci w genomach *Arthrospira*.

Już w 1986 Kawamura *et al.* opublikowali swoje badania, w których zidentyfikowali nowy enzym restrykcyjny z szczepu *Spirulina platensis* subspecies *siamense* (*Arthrospira platensis*) nazwany *SpII* oraz dwa izoschizomery opisanych wcześniej enzymów *SpIII* (*Tth111I*) oraz *SpIII* (*HaeIII*). Jedenaście lat później zespół Tragut *et al.* (1995) scharakteryzował eksperymentalnie cztery enzymy restrykcyjne w szczepie *Spirulina platensis* Pacifica (*Arthrospira platensis* PCC 7345): *SpaI* (*Tth111I*), *SpaII* (*PvuI*), *SpaIII* (*PvuII*) oraz *SpaIV* (*HindIII*). Co ciekawe, zaledwie jeden determinant genetyczny wyżej przedstawionych systemów R-M został zidentyfikowany w genomach *Arthrospira* w ramach tej pracy – *SpaIV* (*HindIII*).

W celu wyjaśnienia rozbieżności wyników, postanowiono jeszcze raz zweryfikować obecność powyższych genów kodujących systemy R-M w genomach *Arthrospira*. Przykładowo, w bazie REBASE znajdziemy informacje, iż genom *A. platensis* NIES-39 posiada metylotransferazę *PvuI*, jednak nie posiada endonukleazy, jak sugerują to wcześniejsze badania. Możliwe są dwa wytłumaczenia. Po pierwsze, brak potwierdzenia obecności determinantów genetycznych może wynikać z zadanych parametrów analizy bioinformatycznej. Zastosowane w mojej analizie parametry identyfikacji w genomach poszczególnych sekwencji białkowych są bardziej restrykcyjne niż te stosowane w algorytmie platformy REBASE. Platforma REBASE generuje wyniki przedstawiające wszelkie ślady systemów R-M. W *Aneksie 5* (Ryciny 1-4) przedstawiono graficznie zidentyfikowane elementy systemów R-M wygenerowane z wykorzystaniem platformy REBASE dla czterech genomów *Arthrospira*. Przedstawione ryciny wykazują, że platforma REBASE określa obecność wszystkich możliwych motywów związanych z systemami R-M z przewagą ORF (otwarta ramka odczytu, ang. *Open Reading Frames*) o niskim podobieństwie do już dobrze scharakteryzowanych białek endonukleaz i metylotransferaz. Zazwyczaj są to pozostałości genów, które prawdopodobnie w przeszłości pełniły funkcję systemów R-M. Wyniki mojej analizy przedstawiają tylko kompletne geny, które mogą mieć odzwierciedlenie w fenotypie – wszystkie badane metylotransferazy w ramach tej pracy są funkcjonalne, o czym świadczą wyniki trawienia genomowego DNA *Arthrospira* odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi oraz zmiany ekspresji genów kodujących metylotransferazy w warunkach stresowych (*Wyniki*

7.3. i 7.5.). Dlatego, ślad genu kodującego endonukleazę *PvuI* znajduje się w genomie *A. platensis* NIES-39, jednak jego funkcjonalność jest wątpliwa.

Po drugie, warto wspomnieć, iż większość szczepów *Arthrospira* nie jest zdolna do wzrostu w warunkach aksenicznych (Subashchandrabose *et al.*, 2011; Shiraishi *et al.*, 2015). Dlatego, wyniki uzyskane w latach 80-tych oraz 90-tych dwudziestego wieku, gdzie nie opracowano jeszcze protokołów do izolacji i utrzymania czystych kultur (Choi *et al.*, 2008; Sena *et al.*, 2009), mogą być nieadekwatne, a dokładniej, scharakteryzowane enzymy mogą pochodzić z bakterii ko-egzystujących z szczepami *Arthrospira*, a nie z samych komórek *Arthrospira*. Opis badania bakterii ko-egzystujących z szczepami *Arthrospira* oraz ich właściwości zostanie rozwinięty w dalszej części dyskusji.

W pracy Zhao *et al.* (2006) zaobserwowano, że większość metylotransferaz zidentyfikowanych w genomie *Spirulina platensis* należy do tzw. „samotnych”, nie znaleziono korespondujących endonukleaz w sąsiadujących loci, co jest sprzeczne z wynikami mojej pracy. Jedynie dwie metylotransferazy z 11 systemów R-M nie mają korespondujących endonukleaz, pozostałe systemy są kompletne, a geny metylotransferaz i korespondujących endonukleaz znajdują się w bliskim sąsiedztwie w genomach (Wyniki 7.2.3., Rycina 4).

Sześć zidentyfikowanych systemów R-M charakteryzuje się uniwersalnością w genomach rodzaju *Arthrospira*, podczas gdy trzy prezentują specyficzność dla poszczególnych kładów: *HindIII* oraz *NheI* występuje tylko w klastrze ITS I, a metylotransferaza *SacII* występuje jedynie w klastrze ITS III. Wyjątkiem jest genom *A. platensis* str. Paraca, który prawdopodobnie ze względu na swoją znaczną niekompletność, nie został prawidłowo scharakteryzowany pod względem obecności poszczególnych genów R-M jak i CRISPR/Cas. „Surowe” dane (ang. *raw data*), czyli odczyty sekwenatora, które można by wykorzystać w mapowaniu genów, są niedostępne, mimo iż zespół KiZMF próbował je pozyskać od autorów genomu *A. platensis* str. Paraca. W niektórych przypadkach udało się potwierdzić obecność genów kodujących systemy R-M typu II eksperymentalnie metodą amplifikacji PCR (Wyniki 7.4.). Zbiorcze zestawienie wyników analizy *in silico* oraz eksperymentalnej znajdują się w Wynikach 7.2.3. (Tabela 11).

Trzynaście genomów *Arthrospira* posiada od dwóch do trzech kaset CRISPR, podobnie do innych rodzajów bakterii (Karimi *et al.*, 2018). W analizie genomicznej szczepu *A. platensis* C1 również zidentyfikowano regiony CRISPR jednak nie opublikowano liczby loci. W pracy Janssen *et al.* (2010) określono, iż *Arthrospira* sp. PCC 8005 posiada zaledwie 4 CRISPR, podczas gdy, analiza wykonana w tej pracy wykazała obecność 6 potwierdzonych loci CRISPR.

Analiza genomyczna *A. platensis* NIES-39 wykazała obecność 3 regionów CRISPR, jednak wyniki przedstawione w tej pracy sugerują obecność aż 9 loci CRISPR. Powodem takich odchyleń może być fakt, iż algorytmy stosowane do wyszukiwania loci CRISPR są stale udoskonalane, a bazy danych powiększane, co daje precyzyjniejszą detekcję swoistych struktur. Duże odchylenia w ilości loci CRISPR w genomie, przede wszystkim u *Arthrospira* sp. O9.13 F (zaledwie 3) oraz *A. platensis* str. Paraca (aż 17) mogą być tłumaczone niekompletnością tych genomów oraz błędami w assemblingu, spowodowanymi między innymi wysoką repetytywnością genomów.

Genomy *Arthrospira* są jedynymi z bardziej repetytywnych wśród bakterii, łącznie około 25% sekwencji genomu to różnego rodzaju powtórzenia. Elementy repetytywne identyfikowane wśród cyjanobakterii to powtórzenia tandemowe (ang. *tandemly repeated sequences*) oraz tzw. „rozrzucone powtórzenia” (ang. *interspersed repeats*), które głównie występują u eukariontów. U *Arthrospira* sp. PCC 8005 powtórzenia tandemowe osiągają wartość nawet 3% sekwencji genomu. Tak zwane „rozrzucone” powtórzone sekwencje w pewnych przypadkach mogą sięgać u *Arthrospira* nawet 8-16% sekwencji genomu. Ponadto, nawet 5% sekwencji genomu *Arthrospira* stanowią ruchome elementy genetyczne MGE (ang. *Mobile Genetic Elements*) (Morin, 2010).

Mimo, iż technologia sekwencjonowania nowej generacji (ang. *New Generation Sequencing*, NGS) generuje obszerne dane, wiele genomów nie jest w pełni poznanych z powodu trudności w assemblingu w obszarach elementów repetytywnych. Obecność elementów ruchomych oraz powtórzeń w genomie utrudnia jego składanie oraz generuje błędy powstałe w procesie assemblingu. Ma to znaczący wpływ na anotację genomów *Arthrospira* – część sekwencji genów może zostać utracona (Mascher & Stein 2014; de Bustos *et al.*, 2016). Przykładem może być operon wakuol gazowych *gvp*, składający się z genów *gvpA1–gvpC1–gvpA2–gvpC2–gvpA3–gvpC3–gvpN*, opisany u *Arthrospira*. W pracy Miklaszewska *et al.* (2012) został on zidentyfikowany z użyciem amplifikacji PCR, klonowania oraz sekwencjonowania klonowanych fragmentów operonu. Co ciekawe, obecność genów *gvpA1*, *gvpC1*, *gvpA2* oraz *gvpC2* nie została określona w ówczesnie dostępnych genomach *Arthrospira* sp. PCC 8005, *A. maxima* CS-328 i *A. platensis* NIES-39, co może być wynikiem błędów w assemblingu długich powtarzających się regionów (Miklaszewska *et al.*, 2012). Wspomniane wcześniej różnice w wynikach analiz *in silico* przeprowadzonych w ramach tej pracy, charakterystyka poszczególnych systemów R-M oraz różnice w liczbie loci CRISPR w

poszczególnych genomach, mogą wynikać właśnie z niedoskonałego assemblingu jako efektu wysokiej repetytywności genomów *Arthrospira*.

Zidentyfikowane regiony CRISPR należą do czterech typów systemów CRISPR: I-U, III-A, III-B oraz III-U, co więcej zazwyczaj co najmniej trzy różne typy znajdują się w każdym genomie (Makarova *et al.*, 2011). Według podziału na typy systemów CRISPR wg. Makarova *et al.* (2011) nie można określić przynależności do tylko jednego typu, ze względu na obecność różnych genów charakterystycznych dla różnych typów systemów CRISPR. Interesującym wynikiem jest zidentyfikowanie aż trzech wariantów genu *cas1* (*cas1.1*, *cas1.2*, *cas1.3*) oraz dwóch wariantów genu *cas2* (*cas2.1*, *cas2.2*), ponieważ zazwyczaj występują one w genomach pojedynczo (Karimi *et al.*, 2018). Podobny wynik uzyskano wcześniej dla genomu *A. platensis* NIES-39, gdzie już w 2010 określono obecność trzech genów *cas1* (Fujisawa *et al.*, 2010). Ich wyjątkowość potwierdza fakt, że nie zostały one znalezione w żadnym innym dostępnym genomie cyjanobakterii poza rodzajem *Arthrospira* (podobieństwo poniżej 20%). Zostały one jednak zanotowane w referencyjnych genomach *Arthrospira* ze względu na specyficzną strukturę oraz bezpośrednie sąsiedztwo z kasetami CRISPR. Potwierdza to ich unikalność dla rodzaju *Arthrospira*. Natomiast fakt, że są obecne we wszystkich analizowanych genomach z różnicami wynikającymi z pojedynczych polimorfizmów sugeruje, że są ściśle konserwowane w obrębie rodzaju.

Ciekawą obserwacją są zmiany w poziomie ekspresji genów kodujących systemy R-M typu II oraz CRISPR/Cas w warunkach stresowych (Wyniki 7.3.). Badania Badri *et al.* (2014) dotyczyły zmian ekspresji genów w warunkach stresowych szczepu *Arthrospira* sp. PCC 8005 poddanego działaniu promieniowania gamma. Należy wspomnieć, że była to pierwsza praca wykorzystująca technologie mikromacierzy, poprzednie prace transkryptomiczne wykorzystywały metodę qRT-PCR (ang. *quantitative reverse-transcriptase real-time PCR*) do analizy ekspresji genów (Huili *et al.*, 2012; Huili *et al.*, 2013; Badri *et al.* 2014).

Dzięki udostępnieniu danych transkryptomicznych na potrzeby moich badan, udało mi się poszerzyć analizy o geny kodujące systemy R-M typu II i związane z systemami CRISPR/Cas zidentyfikowane w tej pracy. Wspomniane loci nie były wcześniej analizowane, ponieważ grupa badawcza Badri analizowała jedynie geny zaanotowane w platformie MaGe.

W przypadku genów kodujących kompletne systemy R-M typu II nie zaobserwowano konsekwencji w zmianie ekspresji, część z nich była nadekspresjonowana, inne supresowane. Jednak w przypadku obydwu zidentyfikowanych *in silico* samotnych metylotransferaz, zaobserwowano supresję, która zwiększyła się wraz z dawką stosowanego promieniowania

jako czynnika stresowego. Nie zaobserwowano również żadnych prawidłowości w przypadku zmiany ekspresji genów związanych z systemami CRISPR/Cas. Geny kodujące białka Cas wykazały nadekspresję w obu dawkach promieniowania, z wyjątkiem genu *cas1.3*, który co ciekawe, w wyższej dawce promieniowania wykazał supresję. Geny związane z systemami CRISPR/Cas zaklasyfikowane do typu I-U (*csx10*) oraz III-A (geny *csm*) wykazały znaczną nadekspresję, jak również gen *cmr2*, który nie został zaklasyfikowany do żadnego typu, ale znajduje się w bliskim sąsiedztwie genu *csx10* w regionie CRISPR u *Arthrospira* (Wyniki 7.2.4.3.). W przypadku genów typu II-B (geny *cmr4* i *cmr6*) zaobserwowano supresję, jednak wartości FC różniły w zależności od stosowanej dawki promieniowania (Wyniki 7.3.).

Zaobserwowane zmiany w ekspresji badanych genów potwierdzają, iż muszą one mieć związek z ochroną komórki bakteryjnej w warunkach niesprzyjających. We wcześniejszych badaniach transkryptomicznych, prowadzonych w warunkach stresu temperaturowego czy solnego zaobserwowano zmianę ekspresji genów odpowiedzialnych między innymi za syntetazę glutationonową czy genów odpowiedzialnych za biosyntezę kwasów tłuszczowych (Jeamton *et al.*, 2008, Huili *et al.* 2012 i 2013). W pracy Badri *et al.* (2014), zaobserwowano również zmiany ekspresji genów związanych z naprawą DNA takich jak *recJ*, *recQ*, *recG*, *holB* oraz *gyrA*.

W dostępnej literaturze nie ma wielu wzmianek o fagach u *Arthrospira*: Jacquet *et al.* (2013) wyizolowali faga prawdopodobnie z rodziny cyjanopodowirusów z komercyjnej hodowli *Arthrospira* na południu Francji, a Peduzzi *et al.* (2014) w swoich badaniach wiązali nagłą lizę i rozpad komórek *Arthrospira* w jeziorach afrykańskich właśnie z infekcjami fagowymi. Jednak żadne późniejsze badania nie potwierdziły tych obserwacji. Zidentyfikowane w ramach tej pracy regiony fagowe są niekompletne, jednak sama ich obecność może świadczyć o istnieniu potencjalnych fagów infekujących rodzaj *Arthrospira*. Przypuszczalnie, ekstremofilne środowisko naturalnego występowania *Arthrospira* (wysokie zasolenie, pH alkaliczne), jest swoistym inhibitorem fagów, ponieważ ich białka mogą być denaturowane w tych warunkach (Jończyk *et al.*, 2011).

Przedstawione badania identyfikacyjne jak i sekwencji nukleotydowych genów kodujących systemy R-M typu I, II, CRISPR/Cas i genów kodujących szlaki biosyntezy metabolitów wtórnych, dzielą analizowane szczepy na dwa kłady – I i II (Wyniki 7.2.). Do tej pory dzielono rodzaj *Arthrospira* na trzy klastry na podstawie jedynie sekwencji 16S rRNA oraz ITS (tzw. klastry ITS I, II oraz III).

Badania wykazały, że ograniczona liczba markerów genetycznych w analizach taksonomicznych skutkuje niewiarygodnymi wynikami w pracach nad precyzyjną identyfikacją taksonów. W erze nowych, dostępniejszych metod sekwencjonowania genomów jak technologia NGS (Sekwencjonowanie Nowej Generacji, ang. *New Generation Sequencing*), badania taksonomiczne możliwe są z wykorzystaniem sekwencji całych genomów co daje bardziej kompleksowy obraz zróżnicowania genetycznego. W ramach tej pracy pula dostępnych genomów *Arthrospira* zwiększyła się do trzynastu, a także uzupełniono dane o sekwencje szczepów reprezentujące całą dotychczas zaobserwowaną zmienność i różnorodność w obrębie rodzaju, co może ułatwić zobrazowanie zróżnicowania genetycznego.

Wyniki na podstawie analizy genomowej przeprowadzonej w tej pracy pozwalają mi stwierdzić, że klastery ITS I oraz ITS III na poziomie genetycznym są bardzo zbliżone, tworząc wspólnie kład I, co sugerowały już wcześniej badania przeprowadzone przez Waleron *et al.* z użyciem siedmiu markerów molekularnych (wyniki nieopublikowane). Obserwacje te są również spójne z wynikami badań Baurain (2002) oraz Manen&Falquet (2002). Wspomniani autorzy również proponowali podział rodzaju *Arthrospira* na dwie grupy (nazwane w tej pracy kładami). Należy wspomnieć, że ich analiza opierała się na zaledwie jednym lub dwóch loci i mogła stanowić jedynie wstępną hipotezę. Niektóre zidentyfikowane geny prezentują specyficzność dla poszczególnych kładów, pozostałe natomiast są uniwersalne dla rodzaju i różnią się nielicznymi polimorfizmami.

W 2013 roku opisano nowy klastery ITS *Arthrospira* – klastery ITS III (Comte *et al.*), wyszczególniony na podstawie różnic w sekwencji ITS z jednym przedstawicielem *Arthrospira* sp. PCC 9901. W pracy Misztak *et al.* (2019) opisano nowy szczep posiadający również genotyp ITS III, a dokładniej posiadający dwa warianty ITS I.B/III – *Arthrospira* sp. O9.13 F. Jest to rzadki przypadek obecności dwóch różnych wariantów ITS w genomie *Arthrospira*, pierwsza taka obserwacja została opisana przez Baurain *et al.* (2002). Autorzy opisali szczep, który posiadał dwa warianty ITS, (II.A i II.B), był to szczep *A. platensis* PCC 7345 (II.A/II.B). Genom tego szczepu został zsekwencjonowany w ramach tej pracy doktorskiej. Możliwym wytłumaczeniem takiego zjawiska, jest niekompletna konwersja genów co skutkuje niejednorodnym wariantem ITS. Genomy szczepów *Arthrospira* sp. PCC 9001, *Arthrospira* sp. O9.13 F oraz *A. platensis* PCC 7345 zostały zsekwencjonowane i uwzględnione w analizach bioinformatycznych tej pracy.

Wyniki analizy sekwencji nukleotydowych oraz analiz filogenetycznych wskazują jednoznacznie na dychotomię rodzaju *Arthrospira*. Opisany klastery ITS III różni się od klastera I pod

względem genetycznym, jednak w zbyt małym stopniu, aby wyszczególnić go jako oddzielny takson. W obydwu przypadkach obecności dwóch różnych wariantów ITS w genomie – I.B/III (*Arthrospira* sp. O9.13 F) i II.A/II.B (*A. platensis* PCC 7345) – z użyciem proponowanego w tej pracy podziału na dwa kłady, jest on jednorodny. Szczep *A. platensis* PCC 7345 należy do kładu II (klaster ITS II.A/II.B), podczas gdy *Arthrospira* sp. O9.13 F do I (klaster ITS I.B/III). Należy jednak wspomnieć, że zaobserwowane różnice genetyczne w obrębie kladów nie mają odzwierciedlenia w fenotypach, m.in. wszystkie analizowane szczepy kładu I i II posiadają wspólne geny kodujące szlaki metabolitów wtórnych oraz regiony fagowe (Wyniki 7.2.7. i 7.2.8.).

Struktura genetyczna, a także zróżnicowanie rodzaju *Arthrospira* nie zostały jednoznacznie określone co skutkuje niekonsekwencją w nomenklaturze gatunkowej spotykaną w literaturze naukowej. Mimo, iż już pod koniec lat 70-tych dwudziestego wieku wykazano, że rodzaj *Arthrospira* i *Spirulina* znacząco się między sobą różnią, wciąż stosuje się te dwie nazwy wymiennie (Herdman *et al.*, 1979). Przykładowo, w Europie w publikacjach naukowych stosuje się nazwę *Arthrospira platensis*, podczas gdy azjatyckie grupy badawcze stosują nazwę *Spirulina platensis*, odwołując się do produktów zawierających biomasę *Arthrospira* sprzedawanych na całym świecie pod komercyjną nazwą „Spirulina”. Na ten problem zwraca uwagę również federacja producentów biomasy *Arthrospira* European Algae Biomass Association (EABA), ponieważ brak jednolitego nazewnictwa utrudnia wprowadzanie produktów na rynek i ich rejestrację.

Analiza genomiczna przedstawiona w tej pracy, poprzez wyraźną dychotomie rodzaju *Arthrospira*, wskazuje, że dwa wyróżnione kłady mogą reprezentować dwa gatunki *Arthrospira*. Jednak nowoczesne standardy wyznaczania gatunków prokariotycznych określają wymogi, w których należy wykazać różnice w fenotypie umożliwiające identyfikację, co w przypadku *Arthrospira* jest niewykonalne. Głównie dlatego, że *Arthrospira* to organizmy fototroficzne, dla których klasyczne testy biochemiczne profilowania metabolicznego nie mają zastosowania. Markery chemotaksonomiczne jak np. zawartość białka czy kwasów tłuszczowych w przypadku *Arthrospira* wykazują bardzo zbliżone profile, bez względu na gatunek czy przynależność do wyróżnionych dwóch genotypów (Ciferri, 1983; Muhling *et al.*, 2005). Dodatkowo, cechy morfologiczne określane przez botaników do rozróżniania poszczególnych gatunków, jak kolor trychomu, zawartość barwników czy kształt komórek wierzchołkowych, ulegają zmianie w zależności od warunków wzrostu (Wang & Zhao, 2005; Komarek *et al.*, 2013).

Należy również wspomnieć, że *Arthrospira* jest organizmem szeroko wykorzystywanym komercyjnie i hodowanym na całym świecie, co może znacznie utrudniać określenie rzeczywistego pochodzenia poszczególnych gatunków. Ze względu na homogeniczność fenotypową oraz brak wiarygodnych cech umożliwiających rozróżnienie gatunków *Arthrospira* między sobą, można jedynie zaproponować dwa genomogatunki (ang. *genomospecies*) korespondujące z kladami I oraz II. Oren i Ventura (2017) podsumowują aktualny stan od lat trwającej dyskusji nad jednorodnym nazewnictwem cyjanobakterii z zastosowaniem kodu botanicznego lub prokariotycznego. Po przeklasyfikowaniu cyjanobakterii do prokariota, nomenklatura cyjanobakteryjna wciąż nie została zharmonizowana i powoduje wiele nieścisłości w opisach taksonomicznych, konieczne jest wypracowanie konsensusowych rozwiązań w tej kwestii.

W drugiej części pracy przeprowadzono badania czystości i składu mikrobiologicznego 7 preparatów z suchą biomasą *Arthrospira* produkowaną na skalę przemysłową o różnym pochodzeniu. Suszona biomasa *Arthrospira*, ze względu na swoje wartości odżywcze produkowana i sprzedawana jest pod komercyjną nazwą „Spirulina” na całym świecie w aptekach, sklepach ze zdrową żywnością oraz dystrybuowana jest za pośrednictwem sklepów internetowych. Preparaty te będące produktami pochodzenia naturalnego zostały zakwalifikowane jako żywność specjalnego przeznaczenia medycznego, a najczęściej jako suplementy diety, co sprawia, że są powszechnie dostępne, ale nie podlegają żadnej kontroli jakości i trwałości. W świetle prawa europejskiego w procesie rejestracji oraz późniejszej dystrybucji suplementów diety, nie wymaga się określenia ich składu, wyników badań jakościowych, czystości czy trwałości (Bojarowicz & Dźwigulska, 2012). Właśnie, ze względu na bardzo niskie wymagania stawiane tym produktom, postanowiono w ramach niniejszej pracy zweryfikować ich jakość traktując jak produkty lecznicze i stosując normy Farmakopei Polskiej X.

Pierwsze alarmujące wyniki uzyskano podczas określenia CFU dla 1 g preparatu. Mimo, iż cyjanobakterie są prokariontami rosną one jedynie na specjalistycznych pożywkach w warunkach laboratoryjnych, a komórki *Arthrospira* poddane suszeniu, nie są w stanie się regenerować, dlatego nie były wykrywane w badaniu. Według Farmakopei Polskiej X dla doustnych produktów leczniczych zawierających surowce pochodzenia naturalnego, których nie poddaje się wstępnej obróbce zmniejszającej liczbę drobnoustrojów CFU/g nie powinno przekraczać 10^4 . Dla żywności, czyli *de facto* suplementów diety, dopuszcza się nawet 10^7

CFU/g w zależności od pochodzenia produktu. Dla trzech z siedmiu badanych preparatów normy dla żywności zostały przekroczone, co wskazuje na niedostateczne monitorowanie czystości mikrobiologicznej suplementów diety. Zakażenie mikroorganizmami mogło nastąpić na etapie hodowli lub suszenia czy pakowania preparatu.

Identyfikacja gatunkowa zanieczyszczeń wykazała obecność Gram-dodatnich laseczek, niestwarzających bezpośredniego zagrożenia dla zdrowia i życia człowieka. Interesującym wynikiem jest fakt, że CFU/g preparatu pochodzącego z Tajwanu (Febico) wynosiło zero. Prawdopodobną przyczyną mogło być zastosowanie środków konserwujących w preparacie, czego nie zadeklarował producent. Wyniki przeprowadzonego testu konserwacji wykazały, że użyty konserwant nie ma działania grzybobójczego, o czym świadczy pojawienie się pleśni w próbkach już po siódmej dobie inkubacji. Zahamowanie wzrostu szczepów testowych *E. coli* i *S. aureus* sugeruje obecność substancji konserwującej o działaniu przeciwbakteryjnym. Należałoby jednak przeprowadzić dodatkowe badania identyfikacyjne w celu określenia chemicznego składu zastosowanego konserwantu, aby wykluczyć jego szkodliwość dla ludzi. Konieczne byłoby również powtórzenie testu konserwacji, ze względu na jego pionierski charakter i metodologię zaadoptowaną z protokołu dla innych preparatów. Problemem była między innymi ograniczona rozpuszczalność suchej biomasy *Arthrospira* w wodzie i zjawisko „pęcznienia”, które należałoby uwzględnić w udoskonalonej metodologii testu konserwacji.

Poza określeniem CFU/g Farmakopea Polska X przewiduje również badanie potwierdzające lub wykluczające obecność *E. coli*, *S. aureus*, *Samonella* ssp. oraz bakterii Gram-ujemnych tolerujących żółć w preparacie. Badanie wykazało obecność mannitolododatnich gronkowców, jednak dalsza identyfikacja gatunkowa potwierdziła, że należą one do *Staphylococcus saproph. spp saproph* – mikroorganizmu wchodzącego w skład ludzkiej flory saprofitycznej i niezagrażającego zdrowiu konsumentów. Można zatem stwierdzić, że wykluczono obecność mikroorganizmów stwarzających zagrożenie dla zdrowia człowieka w badanych siedmiu produktach.

Przeprowadzono również badania sprawdzające wpływ ekstraktów metanolowych i wodnych z czterech preparatów „Spirulina”. W świetle rosnącej oporności mikroorganizmów na dostępne antybiotyki, poszukiwanie nowych związków o działaniu przeciwbakteryjnym i przeciwgrzybiczym jest koniecznością. Uważa się również, iż stosowanie związków o pochodzeniu naturalnym jest korzystniejsze, ze względu na łatwiejszą biodegradację i przyjazność dla środowiska. Badania Mala *et al.* (2009) oraz Santhanam *et al.* (2011) sugerują, że ekstrakty z biomasy *Arthrospira* mają właściwości antybakteryjne i przeciwgrzybicze.

Wyniki moich badań sugerują, że obróbka biomasy *Arthrospira* w procesie produkcyjnym, może mieć wpływ na utratę aktywności przeciwdrobnoustrojowych. Żaden z uzyskanych ekstraktów z proszku oraz tabletek komercyjnych nie hamował wzrostu referencyjnych szczepów bakteryjnych, natomiast jedynie ekstrakt metanolowy uzyskany z preparatu z Chin hamował w pewnym stopniu wzrost *C. albicans* II. Uzyskane maksymalne stężenie ekstraktu (170 mg/ml) prawdopodobnie było zbyt niskie, aby wykazać działanie grzybobójcze. Ekstrakty uzyskane z innych preparatów o wyższych stężeniach (200 mg/ml z preparatu z Pakistanu, 220 mg/ml z preparatu z USA) nie wykazały nawet działania hamującego wzrost grzybów. Ograniczenia dostępności prób do badań nie pozwoliły na uzyskanie ekstraktów o wyższym stężeniu.

Badanie opublikowane przez Vardaka *et al.* (2015) przedstawia wyniki analizy obecności bakterii w 31 preparatach z suchą biomasą *Arthrospira* dostępnych na greckim rynku. Autorzy przeprowadzili detekcję zanieczyszczeń na podstawie śladów DNA bakterii w materiale badanym. Wykryto 469 OTU (ang. *Operational Taxonomic Unit*) należące do rzędów *Actinobacteria*, *Bacteroides*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* oraz *Verrucomicrobia*. Dodatkowo, wykazano obecność innych cyjanobakterii, również tych powszechnie znanych jako toksyczne dla ludzi i zwierząt. Przedstawione wyniki nie tylko potwierdzają konieczność wprowadzenia kontroli jakości i czystości mikrobiologicznej preparatów „Spirulina”, ale również sugerują jak bogate jest konsorcjum mikrobiologiczne, które tworzą *Arthrospira* i bakterie koegzystujące, co postanowiłam zbadać.

W ramach tej pracy udało się wyhodować 45 izolatów bakteryjnych z sześciu preparatów „Spirulina” pochodzących z różnych krajów (Aneks 4 Tabela 1). Bardzo ciekawą obserwacją jest, że większość z 45 wyizolowanych bakterii symbiotycznych nie rośnie na zwykłych podłożach agarowych (TSA, LB). Konieczne było zastosowanie podłoży z ekstraktem z *Arthrospira* (Materiały 5.4.2), ponieważ *Arthrospira* prawdopodobnie wytwarza związki niezbędne do wzrostu bakterii z nią symbiotycznych. Tłumaczyłoby to również fakt, iż w badaniach czystości mikrobiologicznej wg. Farmakopei Polskiej X w preparacie firmy Febico (Tajwan) nie wykryto zanieczyszczeń bakteryjnych (CFU/g wynosiło 0), natomiast przy zastosowaniu pożywek z ekstraktem z sinic udało się wyizolować sześć szczepów należących do konsorcjum koegzystującego z *Arthrospira*.

Naturalne warunki bytowania *Arthrospira* są ekstremalne – wysokie zasolenie, pH powyżej 9 oraz w większości przypadków temperatura 35 °C, dlatego też m. in. wszystkie

wyizolowane szczepy bakteryjne wykazywały również wzrost na podłożu dla bakterii *Halomonas* z wysoką zawartością chlorku sodu.

Wyniki analizy sekwencji 16S rRNA dla 45 izolatów uzyskane w tej pracy wskazują, że należą one do czterech rodzajów: *Halomonas*, *Bacillus*, *Roseinatronobacter* oraz *Rhodobaca*. W niektórych przypadkach, podobieństwo sekwencji 16S rRNA wynosiło mniej niż 97%, co może oznaczać obecność nowych, nieopisanych wcześniej gatunków bakterii. Dane literaturowe wskazują, że wszystkie ze zidentyfikowanych rodzajów zostały jak dotąd wyizolowane z alkalicznych jezior lub są zdolne do wzrostu w wysokim pH oraz zasoleniu (Vreeland *et al.* 1980; Janto *et al.*, 2011; Boldareva *et al.*, 2007; Milford 2000).

Obfitość konsorcjum *Arthrospira* oraz jej niezdolność do wzrostu w monohodowlach może sugerować, że za część jej właściwości mogą odpowiadać bakterie symbiotycznie, a nie komórki cyjanobakteryjne. Przykładowo, dane literaturowe wskazują, że *Arthrospira* wspomaga wzrost flory bakteryjnej w jelitach człowieka (Parada *et al.*, 1998; Kordowska-Wiater *et al.* 2011), natomiast rodzajem o udowodnionych właściwościach probiotycznych jest *Bacillus* (Elshaghebe *et al.*, 2017). Zarówno rodzaj *Bacillus* jak i *Halomonas* zdolne są do produkowania ektoiny – cyklicznego aminokwasu chroniącego komórki i organella przed niekorzystnym wpływem środowiska (Li *et al.*, 2018; Stępniewska *et al.*, 2014). Ektoina jest osmoprotektantem, który chroni komórki przed działaniem wysokiego zasolenia w środowisku, co ma duże znaczenie ze względu na występowanie gatunków *Arthrospira* w ekosystemach o dużych wahaniami zasolenia. Dodatkowo, udowodniono, że ektoina ma pozytywny wpływ na zdrowie człowieka, między innymi chroni błonę śluzową jelita cienkiego poprzez zmniejszanie stężenia ceramidu, będącego mediatorem apoptozy i stresu oksydacyjnego (Stępniewska *et al.*, 2014).

Wyniki doświadczeń w tej pracy potwierdziły, że część z izolatów bakteryjnych przeżywa ekspozycję na wysokie dawki promieniowania gamma, co również może wpływać na odporność *Arthrospira* na różne formy promieniowania, w tym promieniowanie kosmiczne. *Arthrospira* sp. PCC 8005 jest jednym z organizmów przewidzianych jako element w sztucznym mikro-ekosystemie MELiSSA, który jest opracowywany na potrzeby długotrwałych podróży kosmicznych, takich jak wyprawa na Marsa (Hendrickx *et al.*, 2006). W wielu wcześniejszych pracach opisano odporność rodzaju *Arthrospira* na wysokie dawki promieniowania (Morin, 2010; Badri *et al.*, 2015). Natomiast, w ramach tej pracy wyizolowano 35 szczepów z hodowli *Arthrospira* poddanych działaniu promieniowania gamma w dawkach 2100 i 5000 Gy.

Wspomniana wcześniej ektoina produkowana przez rodzaje *Bacillus* oraz *Halomonas*, będące częścią konsorcjum *Arthrospira*, wykazuje również właściwości ochronne wobec DNA bakteryjnego. Hamuje ona wpływ rodników hydroksylowych na cząsteczkę DNA oraz przeciwdziała uszkodzeniom wywołanym przez promieniowanie jonizujące (Schröter *et al.*, 2017). Można zatem przypuszczać, że odporność na wysokie dawki promieniowania gamma hodowli *Arthrospira* wynika po części również z obecności związków produkowanych przez bakterie z nią ko-egzystujące.

Podsumowując wyniki w tej części badań, konieczne jest zgłębienie wiedzy na temat bakterii symbiotycznych *Arthrospira*, poznanie ich cech fizjologicznych, biochemicznych oraz genetycznych w celu zweryfikowania szeregu właściwości przypisywanych biomase *Arthrospira*.

9. PODSUMOWANIE I WNIOSKI KOŃCOWE.

- Zsekwencjonowano pięć genomów szczepów *Arthrospira*, w tym jednego pochodzącego z syberyjskiego jeziora, uzupełniono dostępną pulę danych o brakujące genotypy.
- Analiza genomiczna trzynastu genomów *Arthrospira* wykazała obecność czternastu determinantów genetycznych systemów R-M typu I, dziewięciu kompletnych systemów R-M typu II, dwóch samotnych metylotransferaz typu II oraz genów związanych z systemami CRISPR/Cas – *cas1.1*, *cas1.2*, *cas1.3*, *cas2.1*, *cas2.2*, *csx3*, *csx10*, *cmr4*, *cmr6*, *csm1*, *csm2*, *csm3*, *csm4*, *csm5*.
- Wszystkie zidentyfikowane metylotransferazy typu II są aktywne, co potwierdza wzmożoną aktywność systemów obronny przed egzogennym DNA w komórkach *Arthrospira*.
- Analiza transkryptomu szczepu *Arthrospira* sp. PCC 8005 poddanego działaniu promieniowania gamma wykazała znaczące zmiany w ekspresji genów związanych z obroną komórki przed egzogennym DNA, potwierdzających ich rolę w ochronie komórki w warunkach stresowych.
- Przedstawione wyniki analizy genomicznej potwierdzają dychotomie rodzaju *Arthrospira* i sugerują obecność jedynie dwóch gatunków *Arthrospira*, w miejsce 20 obecnie rozróżnianych na podstawie cech morfologicznych.
- Analiza czystości mikrobiologicznej siedmiu komercyjnych preparatów z suchą biomasą *Arthrospira* wykazała przekroczenie norm dla produktów leczniczych oraz żywności co sugeruje konieczność lepszej kontroli jakości suplementów diety z uwagi na bezpieczeństwo konsumentów.
- W procesie produkcyjnym, część z właściwości biomasy *Arthrospira* może zostać utracona, jak działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze ekstraktów metanolowych i wodnych.
- 45 izolatów uzyskanych z komercyjnych preparatów z suchą biomasą *Arthrospira* należą do rodzajów *Halomonas*, *Bacillus*, *Roseinatronobacter* oraz *Rhodobaca*.
- Bakterie stanowiące składnik konsorcjum *Arthrospira*, mogą odpowiadać za część właściwości prozdrowotnych oraz ochronnych przypisywanych komórkom *Arthrospira*.

10. BIBLIOGRAFIA.

1. Abed R. M. M., Dobretsov S., Sudesh K. 2009. Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology* 106 (2009), 1-12.
2. Ahmed E. A., Hafez E. H. A., Ismail A. F. M., Elsonbaty S. M., Abbas H. S., Salah El Din R. A. 2015. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Spirulina platensis* & *Nostoc* sp. *Global Advanced Research Journal of Microbiology* 4 (4), 36-49.
3. Arndt D., Grant J., Marcu A., Sajed T., Pon A., Liang Y., Wishart D.S. 2016. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Research* 44(16): 16-21.
4. Badri H., Monsieus P., Coninx I., Wattiez R., Leys N. 2015. Molecular investigation of the radiation resistance of edible cyanobacterium *Arthrospira* sp. PCC 8005. *Microbiology open*. 4, 187–207.
5. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A., Dvorkin M., Kulikov A. S. *et al.* 2012. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology* 19(5): 455-477.
6. Baurain D., Renquin L., Grubisic S., Scheldeman P., Belay A., Wilmotte A. 2002. Remarkable conservation of internally transcribed spacer sequences of *Arthrospira* ('Spirulina') (*Cyanophyceae*, *Cyanobacteria*) strains from four continents and of recent and 30-year old dried samples from Africa. *J Phycol.* 38, 384-393.
7. Behnsen J., Deriu E., Sassone-Corsi M., Raffatellu M. 2013. Probiotics: Properties, Examples, and Specific Applications. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3(3).
8. Bertani G., Weigle J. J. 1953. Host controlled variation in bacterial viruses. *Journal of Bacteriology* 65, 113-121.
9. Bickle T. A. 2004. Restricting restriction. *Molecular Microbiology* 51; 3-5.
10. Boetzer M., Henkel C. V., Jansen H. J., Butler D., Pirovano W. 2011. Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE. *Bioinformatics* 27(4): 578-579.

11. Boisvert S., Laviolette F., Corbeil J. 2010. Ray: simultaneous assembly of reads from a mix of high-throughput sequencing technologies. *Journal of Computational Biology* 17(11):1519-1533.
12. Bojarowicz H., Dźwigulska P. 2012. Suplementy diety. Część I. Suplementy diety a leki – porównanie wymagań prawnych. *Hygiea Public Health* 47(4), 427-432.
13. Boldareva E. N., Briantseva I. A., Tsapin A., Nelson K., Sorokin D., Turova V. A. *et al.* 2007. The new bacteriochlorophyll-a containing bacterium *Roseinatronobacter monicus* sp. Nov. From the hypersaline soda Mono Lake (California, United States). *Mikrobiologiya* 76(1): 95-106.
14. Bolger A. M., Lohse M., & Usadel, B. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* 1(30), 2114-2120.
15. Borowitz M. 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology* 70, 313-321.
16. Boyer S. L., Flechtner V. R., Johansen J. R. 2001. Is the 16S-23S r RNA Internal Transcribed Spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in cyanobacteria. *Molecular Biology and Evolution* 18 (6), 1057-1069.
17. Carrieri D., Ananyev G., Lenz O., Bryant D.A., Dismukes G.C. 2011. Contribution of a sodium ion gradient to energy conservation during fermentation in the cyanobacterium *Arthrospira (Spirulina) maxima* CS-328. *Applied and Environmental Microbiology*. 77, 7185–7194.
18. Castenholz R. W., Waterbury J. B. 1989. Oxygenic photosynthetic bacteria (sect. 19) Group I Cyanobacteria. W: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Red.: Stanley J. T., Bryant M. P., Pfenning, N. Baltimore, USA: William & Wilkins, str. 1710-1800.
19. Castenholz R. W., Wilmotte A., Herdman M., Rippka R., Waterbury J. B., Itman I. *et al.* 2001. „Phylum, b. X., *Cyanobacteria*, oxygenic photosynthetic bacteria” in *Bergey's Manual of Bacteriology*, 2nd Edn., Vol 1, eds G. M. Garrity, D. R. Boone, and R. W., Castenholz (New York, NY: Springer-Verlag), 473-597.

20. Castenholz RW, Rippka R, Herdman M, Wilmotte A. Subsection III. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015; 17:1-4.
21. Chaumont D. 1993. Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture. *Journal of Applied Phycology* 5, 593-604.
22. Cheevadhanarak S., Paithoonrangsarid K., Prommeenat P., Kaewngam W., Musigkain A., Tragoonrung S., Tabata S., Kaneko T., Chaijaruwanich J., *et al.* 2012. Draft genome sequence of *Arthrospira platensis* C1 (PCC9438). *Stand in Genomic Sci.* 6,43-53.
23. Chen H.W., Yang T.S., Chen M.J., Chang Y.C., Wang E.I.C., Lai C.L. *et al.* 2014. Purification and immunomodulating activity of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* cultured using power plant flue gas. *Proc Biochem.* 49, 1337-1344.
24. Cheung M. Y., Liang S., Lee J. 2012. Toxin-producing cyanobacteria in freshwater: a review of the problems, impact on drinking water safety, and efforts for protecting public health. *Journal of Microbiology*, 51 (1), 1-10.
25. Chikhi R., Medvedev P. 2013. Informed and Automated k-Mer Size Selection for Genome Assembly. *Bioinformatics* 00, 1-7.
26. Choi G., Bae M., Ahn C., Oh H. 2008. Induction of axenic culture of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* based on antibiotic sensitivity of contaminating bacteria. *Biotechnology Letter*, 30, 87-92.
27. Chojnacka K. 2007. Bioaccumulation of Cr(III) ions by Blue-Green algae *Spirulina* sp. Part I. A Comparison with Biosorption. *American Journal of Agriculture and Biological Sciences* 2 (4): 218-223.
28. Chojnacka K. & Noworyta A. 2004. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 34, 461-465.
29. Ciferri, O. 1983. *Spirulina*, the edible microorganism. *Microbiol Rev.* 47, 551-578.
30. Cohen, Z. & Vonshak A. 1991. Fatty acid composition of *Spirulina* and *Spirulina*-like cyanobacteria in relation to their chemotaxonomy. *Phytochem.* 30, 205-206.

31. Comte K., Coursin T., Carre-Mlouka A. 2013. A new genotype in the genus *Arthrospira* (*Oscillatoriales*, *Cyanobacteria*) revealed by a mosaic-like structure of the 16S-23SrRNA intergenic spacer region in strain PCC 9901. *Phycologia*. 52, 333-337.
32. Dadheech P.K., Ballot A., Casper P., Kotut K., Novelo E., Lemma B., Proeschold T., Krienitz L. 2010. Phylogenetic relationship and divergence among planktonic strains of *Arthrospira* (*Oscillatoriales*, *Cyanobacteria*) of African, Asian and American origin deduced by 16S-23S ITS and phycocyanin operon sequences. *Phycologia*. 49, 361-372.
33. De Bustos A., Cuadrado A., Jouve N. 2016. Sequencing of long stretches of repetitive DNA. *Nature Scientific Reports* 6, 36665.
34. De Philipis R. & Vincenzini M. 1998. Exocellulat polysaccharides from cyanobacteria and their posiiible applications. *FEMS Microbiological Reviews* 22, 151-175.
35. Desikachary, T.V., and Jeeji Bai, N. 1992. Taxonomic studies in *Spirulina*. SESHARDI, ETTA National Symposium, ed. Seshardi, C.V., and Jeeji Bai, N., (Madras:MCRC), 12-21.
36. Dong, S., Chen, J., Wang, S., Wu, Y., Hou, H., Li, M., and Yan, C. 2015. Draft genome sequence of cyanobacteria *Arthrospira* sp. TJSD091 isolated from seaside wetland. *Mar Genomics*. 24, 197-198.
37. Elshaghabee F. M. F., Rokana N., Gulhane R. D., Sharma C., Panwar H. 2017. *Bacillus* as Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. *Frontiers in Microbiology* 8, 1490.
38. Estevez-Fereira A. A., Cavalcanti J. H. F., Marcal Viera Vaz M. G., Alvarenga L. V., Nunes-Nesi A., Araujo W. L. 2017. Cyanobacterial nitrogenases: phylogenetic diveristy, regulation and functional predicts. *Genetics and Molecular Biology* 40 (1), 261-275.
39. Fakhry S., Sorrentini I., Ricca E., De Felice M., Baccigalupi L. 2008. Characterization of spore forming *Bacilli* isolated from the human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology* 105, 2178-2186.

40. Falquet J., Hurni J. P. 1997. The nutritional aspects of Spirulina. Antenna Foundation. Dostępne online: http://www.antenna.ch/wp-content/uploads/2017/03/aspectNut_UK.pdf (25 lipca 2017).
41. FAO (2016). The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to Food Security and Nutrition for All. Rome, 200.
42. Farmakopea Polska X (tom I–II, 2014, oraz suplement 2015) na podstawie Ph. Eur. 8 i jej suplementów, Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych.
43. Fujisawa T., Narikawa R., Okamoto S., Ehira S., Yoshimura H., Suzuki I. *et al.* 2010. Genomic structure of an Economically Important Cyanobacterium, *Arthrospira (Spirulina) platensis* NIES-39. DNA Research 17, 85–103.
44. Gemma C., Mesches M. H., Sepesi B., Choo K., Holmes D.B., Bickford P.C. 2002. Diets enriched in foods with high antioxidant activity reverse age-induced decreases in cerebellar beta-adrenergic function and increases in proinflammatory cytokines. Journal of Neurosciences. 22, 6114–6120.
45. Gong R., Ding Y., Huijun L., Chen Q., Liu Z. 2005. Lead biosorption and desorption by intact and pretreated *Spirulina maxima* biomass. Chemosphere 58 (2005) 125–130.
46. Guglielmi, G., Rippka, R., and Tandeau de Marsac, N. 1993. Main properties to justify the different taxonomic position of *Spirulina* spp. and *Arthrospira* spp. among *Cyanobacteria*. Bull Inst Oceanogr Monaco. 12, 13.
47. Gurevich A., Saveliev V. Vyahhi N. Tesler G. 2013. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. Bioinformatics 29(8): 1072–1075.
48. Haft D. H., Selengut J., Mongodin E. F., Nelson K. E. 2005. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exists in prokaryotic genomes. PLoS Computational Biology 1 (60).
49. Halfen L.N., Castenholz R.W. 1971. Gliding motility in the blue-green algae, *Oscillatoria princeps*. Journal of Phycology 7, 133–145.

50. Haselkorn R., Buikema W. J. 1992. Nitrogen fixation in cyanobacteria. W: Biological Nitrogen Fixation. Red.: Stacey G., Burris R. H., Evans H. J. New York: Routledge, Chapman & Hall, str. 166-190.
51. Hendrickx L., De Wever H., Hermans V., Mastroleo F., Morin N., Wilmotte A. *et al.* (2006), Microbial ecology of the closed artificial ecosystem MELiSSA (Micro-Ecological Life Support System Alternative): reinventing and compartmentalizing the Earth's food and oxygen regeneration system for long-haul space exploration missions. *Res Microbiol.* 157, 77-86. doi: 10.1016/j.resmic.2005.06.014.
52. Herdman M., Janvier M., Waterbury J.B., Rippka R., Stanier R.Y., Mandel M. 1979. Deoxyribonucleic acid base composition of cyanobacteria. *J Gen Microbiol.* 111, 63. doi: 10.1099/00221287-111-1-63.
53. Hernández-Corona A., Nieves I., Meckes M., Chamorro G., Barron B.L. 2002. Antiviral activity of *Spirulina maxima* against herpes simplex virus type 2. *Antiviral Research* 56, 279-285.
54. Huili W., Xiaokai Z., Meili L., Dahlgren R., Wei C., Jaiopen Z. *et al.* 2012. Proteomic analysis and qRT-PCR verification of temperature Response to *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *PLOS One* 8(12), e83485.
55. Huili W., Yang Y., Chen W., Ding L., Peizhen L., Xiaokai Z. 2013. Identification of differentially expressed proteins of *Arthrospira (Spirulina) platensis*-YZ under stress conditions by proteomics and qRT-PCR analysis. *Proteome Science* 11(1), 6.
56. Hsu P. D., Lander E. S., Zhang F. 2014. Development and Application of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell* 157, June 5.
57. Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A. 1987. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology* 169(12), 5429-5433.
58. Jansen R., Embden J. D., Gastra W., Schouls L. M. 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology* 43(6), 1565-1575.

59. Janssen T., Morin N., Mergeay M., Leroy B., Wattiez R., Vallaëys T. *et al.* 2010. Genome sequence of the edible Cyanobacterium *Arthrospira* sp. PCC 8005. *Journal of Bacteriology*. 192, 2465–2466. doi:10.1128/JB.00116-10.
60. Janto B., Ahmed A., Masahiro I., Liu J., Hicks D. B., Pagni S. *et al.* 2011. The genome of alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 reveals adaptations that support the ability to grow in an external pH range from 7.5 to 11.4. *Environmental Microbiology*, 13(12): 3289-3309.
61. Jeamton W., Mungpakdee S., Sirijuntarut M., Prommeenate P., Cheevadhanarak S., Tanticharen M. *et al.* 2008. A combined stress response analysis of *Spirulina platensis* in terms of global differentially expressed proteins, and mRNA levels stability of fatty acid biosynthesis genes. *FEMS Microbiology Letters* 281, 121-131.
62. Jeamton W., Dulsawat S., Tanticharoen M., Vonshak A., Cheevadhanarak S. 2017. Overcoming intrinsic restriction enzyme barriers enhances transformation efficiency in *Arthrospira platensis* C1. *Plant Cell Physiol.* 58 (4), 822-830.
63. Jeltsch A., & Jurkowska R. Z. 2016. DNA Methyltransferases – Role and Function. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 945.
64. Jończyk E., Kłak M., Międzybrodzki R., Górski A. 2011. The influence of external factors on bacteriophages. *Folia Microbiologica* 56(3), 191-200.
65. Juantorena A. U., Sebastian P. J., Santoyo E., Gamboa S. A., Lastres O. D., Sanchez-Escamilla D. *et al.* 2007. Hydrogen production employing *Spirulina maxima* 2342: A chemical analysis. *International Journal of Hydrogen Energy* 32, 3133–3136.
66. Jubie S., Dhanabal S.P., Chaitanya M.V. (2015). Isolation of methyl gamma linolenate from *Spirulina platensis* using flash chromatography and its apoptosis inducing effect. *BMC Complement Altern Med.* 15, 263.
67. Karhamnglou C., Prieto A. I., Khedkar S., Haase B., Gupta A., Benes V. *et al.* 2012. Genomics of DNA cytosine methylation in *Escherichia coli* reveals its role in stationary phase transcription. *Nature Communications* 3 (886).

-
68. Karimi Z., Ahmadi A., Najafi A., Ranjbar R. 2018. Bacterial CRISPR Regions: General Features and their Potential for Epidemiological Molecular Typing Studies. *The Open Microbiology Journal* 12, 59-70.
69. Kawamura M., Sakakibara M., Watanbe T, Kita K., Nobutsugu H., Obayashi A., Takagi M., Yano K. (1986). A news restriction endonuclease from *Spirulina platensis*. *Nucleic Acids Research* 14 (5).
70. Kawata Y., Yano S., Kojima H. 1998. Efficient library construction with a TA vector and its application to cloning of the phytoene synthase gene from the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Current Microbiology* 37, 289-291.
71. Kawata Y., Yano S., Kojima H., Toyomizu M. 2004. Transformation of *Spirulina platensis* strain C1 (*Arthrospira* sp. PCC9438) with Tn5 transposase-transposon DNA-cation liposome complex. *Maine Biotechnology (NY)*. 6, 355-363.
72. Khan M., Varadharaj S., Shobha J.C, Naidu M.U., Parinandi N.L., Kutala V.K., Kuppusamy P. 2006. C-phycoerythrin ameliorates doxorubicin-induced oxidative stress and apoptosis in adult rat cardiomyocytes. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 47, 9-20.
73. Khan Z., Bhadouria P., Bisen P.S. 2005b. Nutritional and therapeutic potential of *Spirulina*. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 6, 373-379.
74. Komarek J. Süßwasserflora von Mitteleuropa, Bd. 19/3: Cyanoprokaryota. 2. Teil / 2nd part: Oscillatoriales. Komarek J, Anagnostidis K, editors. Springer Spectrum; 2013. p. 343-353.
75. Koonin E., Makarova K. S., Zhang F. 2017. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Current Opinion in Microbiology* 37, 67-78.
76. Kordowska-Wiater M., Wasko A., Polak-Berecka M., Kubik-Komar A., Targonski, Z. 2011. *Spirulina* enhances the viability of *Lactobacillus rhamnosus* E/N after freeze-drying in a protective medium of sucrose and lactulose. *Letters in Applied Microbiology* 53, 79-83.
77. Krauze-Baranowska M. 2006. Lek roślinny czy suplement diety? Racjonalna fitoterapia. *Panacea* Nr 3 (16), strony: 6-7.

-
78. Kurd F. & Samavati, V. 2015. Water soluble polysaccharides from *Spirulina platensis*: extraction and in vitro anti-cancer activity. International Journal of Biological Macromolecules 74, 498-506.
79. Lane D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., eds., John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 115-175.
80. Lee J.B., Hayashi T., Hayashi K., Sankawa U. 2000. Structural analysis of calcium spirulan (Ca-SP)-derived oligosaccharides using electrospray ionization mass spectrometry. J Nat Prod. 63, 136-138. doi: 10.1021/np990348b.
81. Lee J.B., Hayashi T., Hayashi K., Sankawa, U. 2000. Structural analysis of calcium spirulan (Ca-SP)-derived oligosaccharides using electrospray Ionization mass spectrometry. Journal of Natural Products 63, 136-138.
82. Lee J.B., Hayashi T., Hayashi K., Sankawa U., Maeda M., Nemoto T., Nakanishi H. 1998. Further purification and structural analysis of calcium spirulan from *Spirulina platensis*. Journal of Natural Products 61, 1101-1104.
83. Lefort F., Calmin G., Crovadore J., Falquet J., Hurni J., Osteras M., Haldemann F., Farinellie L. 2014. Whole-genome shotgun sequence of *Arthrospira platensis* strain Paraca, a cultivated and edible cyanobacterium. Genome Announcements 2 (4).
84. Leonard J. & Compere P. 1967. *Spirulina platensis* (Gom.) Geitl., algue bleue de grande valeur alimentaire par sa richeseen proteins. Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique 37, 3-23.
85. Li B., Gao M.H., Zhang X.C., Chu X.M. 2006. Molecular immune mechanism of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* induces apoptosis in HeLa cells in vitro. Biotechnoly and Applied Biochemistry 43, 155-164.
86. Li B., Chu X.-M., Xu Y.-J., Yang F., Lv C.-Y., Nie S.-M. 2013. CD59 underlines the antiatherosclerotic effects of C-phycocyanin on mice. BioMed Research International 15, 729413.

-
87. Li P., Tian W., Jiang Z., Liang Z., Wu X., Du B. 2018. Genomic characterization and probiotic potency of *Bacillus* sp. DU-106, a highly effective producer of L-lactic acid isolated from fermented yogurt. *Frontiers in Microbiology* 9, 2216.
88. Lin S. & Liao Y. 2013. CISA: Contig Integrator for Sequence Assembly of Bacterial Genomes. *PLOS One* 8(3).
89. Lobner M., Walsted A., Larsen R., Bendtzen K., Nielsen C.H. 2008. Enhancement of human adaptive immune responses by administration of a high-molecular-weight polysaccharide extract from the cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *Journal of Medicinal Food* 11, 313-322.
90. Lyra C, Halme T, Torsti AM, Tenkanen T, Sivonen K. 2000. Site- specific restriction endonucleases in cyanobacteria. *Journal of Applied Microbiology* 89, 979 –991.
91. Makarova K. S., Haft D. H., Barrangou R., Brouns S. J. J., Charpentier E., Horvath P. *et al.* 2011. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews in Microbiology* 9(6): 467-477.
92. Mala R., Sarojini M., Saravanababu S., Umadevi G. 2009. Screening of antimicrobial activity of crude extracts of *Spirulina platensis*. *Journal of Cell & Tissue Research* 9, 1951-1955.
93. Manen J.F.& Falquet J. 2002. The *cpcB-cpcA* locus as a tool for the genetic characterization of the genus *Arthrospira* (*Cyanobacteria*): evidence for horizontal transfer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 861-867.
94. Marles R. J., Barrett M. L., Barnes J., Chavez M. L., Gardiner P., Ko R. *et al.* 2011. United States pharmacopeia safety evaluation of spirulina. *Critical reviews of Food Science and Nutrition* 51, 593-604.
95. Mascher M. & Stein N. 2014. Genetic anchoring of whole-genome shotgun assemblies. *Frontiers in Genetics* 5, 208.
96. Matveyev AV, Young KT, Meng A, Elhai J. 2001. DNA methyltrans- ferases of the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *Nucleic Acids Research* 29, 1491–1506.

-
97. Medema M. H., Blin K. Cimermancic P., de Jager V., Zakrzewski P., Fischbach M. A., *et al.* 2011. antiSMASH: Rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters. *Nucleic Acids Research* 39, 339-349.
98. Miklaszewska M., Waleron M., Waleron K. 2008. Charakterystyka jadalnej cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira*. *Biotechnologia* 3 (82), 103-118.
99. Miklaszewska M., Waleron M., Waleron K. 2012. Elucidation of the gas vesicle gene clusters in cyanobacteria of the genus *Arthrospira* (*Oscillatoriales*, *Cyanophyta*) and correlation with ITS phylogeny. *European Journal of Phycology* 47, 233-244.
100. Milford A. D., Achenbach L. A., Jug D. O., Madigan M. T. 2000. *Rhodobaca bogoriensis* gen. nov. and sp. nov. an alkaliphilic purple nonsulfur bacterium from African Rift Valley soda lakes. *Archives of Microbiology* 174 (1), 18-27.
101. Mishima T., Murata J., Toyoshima M., Fujii H., Nakajima M., Hayashi T. 1998. Inhibition of tumor invasion and metastasis by calcium spirulan (Ca-SP), a novel sulfated polysaccharide derived from a blue-green alga, *Spirulina platensis*. *Clinical & Experimental Metastasis*. 16, 541-550.
102. Mojica F. J., Diez-Villasenor C., Garcia-Martinez J., Soria E. 2005. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution* 60 (2), 174-182.
103. Morais de M. G., Vaz B. de S., Morais de E. G., Costa, J. A. V. 2014. Biological effects of *Spirulina* (*Arthrospira*) biopolymers and biomass in the development of nanostructured scaffolds. *BioMed Research International* 1-9.
104. Morin N. 2010a. Studies on the response to spaceflight related conditions in the cyanobacterium *Arthrospira* sp. PCC 8005 using a genomic approach. Praca doktorska, Uniwersytet w Liege, Belgia.

-
105. Morin N., Vallayes T., Hendrickx L., Leys N., Wilmotte A. 2010b. An efficient DNA isolation protocol for filamentous cyanobacteria of the genus *Arthrospira*. *Journal of Microbiological Methods* 80, 148-154.
106. Mruk I. & Kobayashi I. 2014. To be or not to be: regulation of restriction-modification systems and other toxin-antitoxin systems. *Nucleic Acids Research* 42(1), 70-86.
107. Muhling, M., Belay, A., and Whitton, B. (2005). Screening *Arthrospira* (Spirulina) strains for heterotrophy. *Journal of Applied Phycology* 17, 129-135.
108. Murata N., Deshnum P., Tasak Y. 1996. "Biosynthesis of gamma-linolenic acid in the edible cyanobacterium *Spirulina platensis*," w *Gamma-linolenic Acid: Metabolism and Its Role in Nutrition and Medicine*, 1st Edn, edytorzy Y. S. Huang and D. E. Mills (San Antonio, TX: AOCS Press; Urbana-Champaign), 22-32.
109. Namilova A. A., Popova V. V., Tsoglin L. N., Pronina N. A. 2005. The Effects of Copper and Zinc on *Spirulina platensis* Growth and Heavy Metal Accumulation in Its Cells. *Russian Journal of Plant Physiology* 52 (2), 229–234.
110. Nelissen B., Wilmotte A., Neefs J.M., De Wachter R. 1994. Phylogenetic relationships among filamentous helical cyanobacteria investigated on the basis of 16S ribosomal RNA gene sequence analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 17, 206-210.
111. Nemoto-Kawamura C., Hirahashi T., Nagai T., Yamada H., Katoh T., Hayashi O. 2004. Phycocyanin enhances secretory IgA antibody response and suppresses allergic IgE antibody response in mice immunized with antigen-entrapped biodegradable microparticles. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 50, 129-136.
112. Nielsen C.H., Balachandran P., Christensen O., Pugh N.D., Tamta H., Sufka K.J. *et al.* 2010. Enhancement of natural killer cell activity in healthy subjects by Immulina®, a *Spirulina* extract enriched for Braun-type lipoproteins. *Planta Medica* 76,1802-1808.

-
113. Ouhtit A., Ismail M.F., Othman A., Fernando A., Abdraboh M.E., El-Kott A.F. *et al.* 2014. Chemoprevention of rat mammary carcinogenesis by spirulina. *American Journal of Pathology* 184, 296-303.
114. Pabon M.M., Jernberg J.N., Morganti J., Contreras J., Hudson Ch. E., Klein R.L. *et al.* 2012. A spirulina-enhanced diet provides neuroprotection in an α -synuclein model of Parkinson's Disease. *PLoS One* 7, e45256.
115. Padyana A. K., Bhat V. B., Madyastha K. M., Rajashankar K. R., Ramakumar S. 2001. Crystal structure of a light-harvesting protein C-phyocyanin from *Spirulina platensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 282, 893-898.
116. Parada J. L., Zulpa de Caire G., Zaccaro de Mule M. C., Storni de Cano M. M. 1998. Lactic acid bacteria growth promoters from *Spirulina platensis*. *International Journal of Food Microbiology* 45, 225–228.
117. Pervushkin S.V., Voronin A.V., Kurkin V.A., Sokhina A.A., Shatalaev I.F. 2001. Proteins from *Spirulina platensis* biomass. *Chemistry of Natural Compounds* 37, 476-481.
118. Pingoud A. & Jeltsch A. 1997. Recognition and cleavage of DNA by type-II restriction endonucleases. *European Journal of Biochemistry* 246, 1–22.
119. Pourcel C., Salvignol G., Vergnaud G. 2005. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology* 151, 653-663.
120. Puyfoulhoux G., Rouanet J.M. Besançon P., Baroux B., Baccou J.C., Caporiccio B. 2001. Iron availability from iron-fortified spirulina by an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 49, 1625-1629.
121. Raksajit W., Satchasataporn K., Lehto K., Maenpaa P., Incharoensakdi A. 2012. Enhancement of hydrogen production by the filamentous non-heterocystous

- cyanobacterium *Arthrospira* sp. PCC 8005. international journal of hydrogen energy 37, 18791-18797.
122. Raven J. A. & Allen J. F. 2003. Genomics and chloroplast evolution: what did cyanobacteria do for plants? *Genome Biology* 4, 209.
 123. Rechter S., Konig T., Auerochs S., Thulke S., Walter H., Dornenburg H. *et al.* 2006. Antiviral activity of *Arthrospira*-derived spirulan-like substances. *Antiviral Research* 72, 197-206.
 124. Ripert G., Racedo S. M., Elie A. M., Jaccquot C., Bressollier P., Urdaci M. C. 2016. Secreted compounds of the probiotic *Bacillus clausii* strain O/C inhibit the cytotoxic effect induced by *Clostridium difficile* and *Bacillus cereus* toxins. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 60(6), 3445-3454.
 125. Roberts R. J., Vincze T., Posfai J., Macelis D. 2005. REBASE-restriction enzymes and DNA methyltransferases. *Nucleic Acids Research* 33, 230-232.
 126. Roberts R. J., Belfort M., Bestor T., Bhagwat A., Bickle T., Bitinaite J. *et al.* 2003. A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Research* 31 (7), 1805-1812.
 127. Saini, M.K. & Sanyal, S.N. 2015. Cell cycle regulation and apoptotic cell death in experimental colon carcinogenesis: intervening with cyclooxygenase-2 inhibitors. *Nutrition and Cancer* 67, 620-636.
 128. Santhanam J.S.a.P. 2011. Antipathogenic activity of spirulina powder. *Recent Research in Science and Technology* 3, 4.
 129. Sarada D.V.L., Kumar C.S., Rengasamy R. 2011. Purified C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* (Nordstedt) Geitler: a novel and potent agent against drug resistant bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27, 779-783.

130. Scheldeman P., Baurain D., Bouhy R., Scott M., Muhling M., Whitton B.A. *et al.* 1999. *Arthrospira* ('*Spirulina*') strains from four continents are resolved into only two clusters, based on amplified ribosomal DNA restriction analysis of the internally transcribed spacer. *FEMS Microbiology Letters* 172, 213-222.
131. Schlegel H. G. (2000). *Mikrobiologia ogólna*. Warszawa: PWN.
132. Seker A., Shahwan T., Eroglu A., Yilmaz S., Demirel Z., Dalay M. C. 2008. Equilibrium, thermodynamic and kinetic studies for the biosorption of aqueous lead(II), cadmium(II) and nickel(II) ions on *Spirulina platensis*. *Journal of Hazardous Materials* 154, 973–980.
133. Schröter M. A., Meyer S., Hahn M. B., Solomun T., Sturm H., Kunte H. J. 2017. Ectoine protects DNA from damage by ionizing radiation. *Scientific Reports* 7, 15272.
134. Shih, P.M., Wu, D., Latifi, A., Axen, S.D., Fewer, D.P., Talla, E. *et al.* 2013. Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 1053-1058.
135. Shimamatsu H. 2004. Mass production of *Spirulina*, an edible microalga. *Hydrobiologia* 512, 39-44.
136. Shiraishi H. 2015. Association of heterotrophic bacteria with aggregated *Arthrospira platensis* exopolysaccharides: implication in the induction of axenic cultures. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 79 (2), 331-341.
137. Shiraishi H. & Tabuse Y. 2013. The *ApII* restriction-modification system in an edible *Cyanobacterium*, *Arthrospira (Spirulina) platensis* NIES-39, recognizes the nucleotide sequence 5'-CTGCAG-3'. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 77, 782-788.
138. Song Q., Shun T., Peijun Z., Tseng C. K. 1993. Isolation of plasmid from the blue-green algae *Spirulina platensis*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 11, 285-288.

-
139. Stainer R. 1977. Phototrophic procaryotes: the cyanobacteria. *Annual Reviews of Microbiology* 31, 225-274.
140. Stevens D. A., Hamilton J. R., Johnson N., Kim K. K., Lee J. S. 2009. *Halomonas*, a newly recognized human pathogen causing infections and contamination in a dialysis center: tree new species. *Medicine (Baltimore)* 88(4), 244-9.
141. Stębowska Z., Kuźniar A., Pytlak A., Ciepielski J. 2014. Ektoina – przeciwstresowa cząsteczka przyszłości. *Kosmos* 63 (1), 25-35.
142. Subashchandrabose S. R., Ramakrishnan B, Megharaj M., Venkayeswarlu K., Naidu R. 2011. Consortia od cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential. *Biotechnology Advances* 29, 896-907.
143. Subhashini J., Mahipal S.V., Reddy M.C., Mallikarjuna Reddy M., Rachamallu A., Reddanna, P. 2004. Molecular mechanisms in C-phyococyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. *Biochemical Pharmacology* 68, 453-462.
144. Tam N. K., Uyen, N. Q., Hong H. A., Duc, L. H., Hoa, T. T., Serra, C. R., et al. 2006. The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. *Journal of Bacteriology* 188, 269- 2700.
145. Taton A., Grubisic S., Brambilla E., De Wit R., Wilmotte A. 2003. Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5157-5169.
146. Tomaselli L. „Morphology, Ultrastructure and Taxonomy of *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima* and *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*” w „*Spirulina platensis* (*Arthrospira*): Physiology, Cell-Biology and Biotechnology” editowane przez Vonshak A., 1997, Taylor&Francis.

-
147. Toyomizu M., Suzuki K., Kawata Y., Kojima H., Akiba Y. 2001. Effective transformation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* using electroporation. *Journal of Applied Phycology* 13, 209-214.
148. Tragut V., Xiao J., Borthakur D. 1995. Characterization of DNA restriction-modification systems in *Spirulina platensis* strain pacifica. *Journal of Applied Phycology* 7, 561-564.
149. Turnr S., Pryer K. M., Miao V. P., Palmer J. D. 1999. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukrtiotic Microbiology* 46(4), 327-338.
150. Van Eykelenburg C. 1980. Ecophysiological studies on *Spirulina platensis* Effect of temperature, light intensity and nitrate concentration on growth and ultrastucture. *Antonie van Leeuwenhoek* 46(2), 113-127.
151. Vasu K., Nagaraja V. 2013. Diverse functions of restriction-modification systems in addition to cellular defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 77 (1), 53-77.
152. Vonshak A., Tomaselli L. 2000. Ecology of Cyanobacteria, Edytorzy Whitton B. A., Potts M., 505-523. Kulwer Academic Publishers, Holandia.
153. Vonshak, A. 1997. *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-Biology and Biotechnology*. London: Taylor & Francis Ltd.
154. Vonshak, A. & Richmond, A. 1988. Mass production of the blue-green alga *Spirulina*: an overview. *Biomass* 15, 233-247.
155. Vonshak, A., Cheung, S.M., Chen, F. 2000. Mixotrophic growth modifies the response of *Spirulina (Arthrospira) platensis (Cyanobacteria)* cells to light. *Journal of Phycology* 36, 675-679.

-
156. Vonshak, A., Laorawat, S., Bunnag, B., Tanticharoen, M. 2014. The effect of light availability on the photosynthetic activity and productivity of outdoor cultures of *Arthrospira platensis* (*Spirulina*). *J Appl Phycol.* 26, 1309-1315. doi: doi:10.1007/s10811-013-0133-1.
157. Vreeland R. H., Lichtfield C. D., Martin E. L., Elliot E. 1980. *Halomonas elongate*, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 30, 485-495.
158. Walsby A. E. 1994. Gas vesicles. *Microbiological Reviews* 58, 94-144.
159. Wang Z. P. & Zhao Y. 2005. Morphological reversion of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* (*Cyanophyta*): From Linear to Helical. *Journal of Phycology* 41, 622-628.
160. Whitton B. A. & Potts M. 2000. *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
161. Wilmotte A., van der Auwera G., de Wachter R. 1993. Structure of the 16 S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis* HTF (*Mastigocladus laminosus* HTF) strain PCC7518, and phylogenetic analysis. *FEBS Letters* 317(1-2), 96-100.
162. Wood D.E., Salzberg S.L. 2014. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biology* 15, R46.
163. Zerbino D. R. & Birney E. 2008. Velvet: algorithms for *de novo* short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research* 18(5), 821-829.
164. Zhao F., Zhang, X., Liang C., Wu J., Bao Q., Qin S. 2006. Genome-wide analysis of restriction-modification system in unicellular and filamentous cyanobacteria. *Physiological Genomics* 24, 181-190.

ANEKS 1. Amplifikacja fragmentów genów metodą PCR.

1.1. Amplifikacja fragmentów genów z użyciem DNA *Arthrospira* jako matrycy w reakcji PCR.

1.1.1. Amplifikacja fragmentu genu *AsuIIR*.

Nazwa odczynnika	Stężenie końcowe	Etap reakcji	Temp.	Czas przebiegu etapu	
bufor do polimerazy	1 x stężony	Wstępna denaturacja	95°C	2 min.	} 36 cykli
dNTP's	0,2 mM	Denaturacja	95°C	45 sek.	
BSA	10 mg/ml	Przylączanie starterów	50°C	1 min.	
Glicerol	9,6%	Wydłużanie łańcucha DNA	72°C	1 min.	
MgCl ₂	2 mM	Końcowe wydłużanie łańcucha DNA	72°C	5 min.	
starter <i>AsuIIR</i> _F	10 pM	Przechowywanie mieszaniny	16°C	0 sek.	
starter <i>AsuIIR</i> _R	10 pM				
polimeraza DNA	1 U				
dejonizowana woda	Dopełniono do objętości 25 µl				

1.1.2. Amplifikacja fragmentu genu *AsuIIM*.

Nazwa odczynnika	Stężenie końcowe	Etap reakcji	Temp.	Czas przebiegu etapu	
bufor do polimerazy	1 x stężony	Wstępna denaturacja	95°C	2 min.	} 36 cykli
dNTP's	0,2 mM	Denaturacja	95°C	45 sek.	
BSA	10 mg/ml	Przylączanie starterów	56°C	1 min.	
Glicerol	9,6%	Wydłużanie łańcucha DNA	72°C	1 min.	
MgCl ₂	2 mM	Końcowe wydłużanie łańcucha DNA	72°C	5 min.	
starter <i>AsuIIM</i> _F	10 pM	Przechowywanie mieszaniny	16°C	0 sek.	
starter <i>AsuIIM</i> _R	10 pM				
polimeraza DNA	1 U				
dejonizowana woda	Dopełniono do objętości 25 µl				

1.1.3. Amplifikacja fragmentu genu *AvaIR*.

Nazwa odczynnika	Stężenie końcowe
bufor do polimerazy	1 x stężony
dNTP's	0,2 mM
BSA	10 mg/ml
Glicerol	9,6%
MgCl₂	2 mM
starter AvaIR_F	10 pM
starter AvaIR_R	10 pM
polimeraza DNA	1 U
dejonizowana woda	Dopełniono do objętości 25 µl

Etap reakcji	Temp.	Czas przebiegu etapu
Wstępna denaturacja	95°C	2 min.
Denaturacja	95°C	45 sek.
Przylączenie starterów	58°C	1 min.
Wydłużanie łańcucha DNA	72°C	1 min.
Końcowe wydłużanie łańcucha DNA	72°C	5 min.
Przechowywanie mieszaniny	16°C	0 sek.

} 36 cykli

1.1.4. Amplifikacja fragmentu genu *AvaIM*.

Nazwa odczynnika	Stężenie końcowe
bufor do polimerazy	1 x stężony
dNTP's	0,2 mM
BSA	10 mg/ml
Glicerol	9,6%
MgCl₂	2 mM
starter AvaIM_F	10 pM
starter AvaIM_R	10 pM
polimeraza DNA	1 U
dejonizowana woda	Dopełniono do objętości 25 µl

Etap reakcji	Temp.	Czas przebiegu etapu
Wstępna denaturacja	95°C	2 min.
Denaturacja	95°C	45 sek.
Przylączenie starterów	50°C	1 min.
Wydłużanie łańcucha DNA	72°C	1 min.
Końcowe wydłużanie łańcucha DNA	72°C	5 min.
Przechowywanie mieszaniny	16°C	0 sek.

} 36 cykli

1.1.5. Amplifikacja fragmnetu genu *NheIR*.

Nazwa odczynnika	Stężenie końcowe
bufor do polimerazy	1 x stężony
dNTP's	0,2 mM
BSA	10 mg/ml
Glicerol	9,6%
MgCl₂	2 mM
starter <i>NheIR</i>_F	10 pM
starter <i>NheIR</i>_R	10 pM
polimeraza DNA	1 U
dejonizowana woda	Dopełniono do objętości 25 µl

Etap reakcji	Temp.	Czas przebiegu etapu
Wstępna denaturacja	95°C	2 min.
Denaturacja	95°C	45 sek.
Przylączanie starterów	56°C	1 min.
Wydłużanie łańcucha DNA	72°C	1 min.
Końcowe wydłużanie łańcucha DNA	72°C	5 min.
Przechowywanie mieszaniny	16°C	0 sek.

} 36 cykli

1.1.6. Amplifikacja fragmentu genu *NheIM*.

Nazwa odczynnika	Stężenie końcowe
bufor do polimerazy	1 x stężony
dNTP's	0,2 mM
BSA	10 mg/ml
Glicerol	9,6%
MgCl₂	2 mM
starter <i>NheIM</i>_F	10 pM
starter <i>NheIM</i>_R	10 pM
polimeraza DNA	1 U
dejonizowana woda	Dopełniono do objętości 25 µl

Etap reakcji	Temp.	Czas przebiegu etapu
Wstępna denaturacja	95°C	2 min.
Denaturacja	95°C	45 sek.
Przylączanie starterów	58°C	1 min.
Wydłużanie łańcucha DNA	72°C	1 min.
Końcowe wydłużanie łańcucha DNA	72°C	5 min.
Przechowywanie mieszaniny	16°C	0 sek.

} 36 cykli

1.1.7. Amplifikacja fragmentu genu *HindIII*R.

Nazwa odczynnika	Stężenie końcowe
bufor do polimerazy	1 x stężony
dNTP's	0,2 mM
BSA	10 mg/ml
Glicerol	9,6%
MgCl ₂	2 mM
starter <i>HindIII</i> R_F	10 pM
starter <i>HindIII</i> R_R	10 pM
polimeraza DNA	1 U
dejonizowana woda	Dopełniono do objętości 25 µl

Etap reakcji	Temp.	Czas przebiegu etapu
Wstępna denaturacja	95°C	2 min.
Denaturacja	95°C	45 sek.
Przylączenie starterów	56°C	1 min.
Wydłużanie łańcucha DNA	72°C	1 min.
Końcowe wydłużanie łańcucha DNA	72°C	5 min.
Przechowywanie mieszaniny	16°C	0 sek.

} 36 cykli

1.1.8. Amplifikacja fragmentu genu *HindIII*M.

Nazwa odczynnika	Stężenie końcowe
bufor do polimerazy	1 x stężony
dNTP's	0,2 mM
BSA	10 mg/ml
Glicerol	9,6%
MgCl ₂	2 mM
starter <i>HindIII</i> M_F	10 pM
starter <i>HindIII</i> M_R	10 pM
polimeraza DNA	1 U
dejonizowana woda	Dopełniono do objętości 25 µl

Etap reakcji	Temp.	Czas przebiegu etapu
Wstępna denaturacja	95°C	2 min.
Denaturacja	95°C	45 sek.
Przylączenie starterów	56°C	1 min.
Wydłużanie łańcucha DNA	72°C	1 min.
Końcowe wydłużanie łańcucha DNA	72°C	5 min.
Przechowywanie mieszaniny	16°C	0 sek.

} 36 cykli

1.1.9. Amplifikacja fragmentu genu *SacIIR*.

Nazwa odczynnika	Stężenie końcowe
bufor do polimerazy	1 x stężony
dNTP's	0,2 mM
BSA	10 mg/ml
Glicerol	9,6%
MgCl₂	2 mM
starter SacIIR_F	10 pM
starter SacIIR_R	10 pM
polimeraza DNA	1 U
dejonizowana woda	Dopełniono do objętości 25 µl

Etap reakcji	Temp.	Czas przebiegu etapu
Wstępna denaturacja	95°C	2 min.
Denaturacja	95°C	45 sek.
Przylączanie starterów	56°C	1 min.
Wydłużanie łańcucha DNA	72°C	1 min.
Końcowe wydłużanie łańcucha DNA	72°C	5 min.
Przechowywanie mieszaniny	16°C	0 sek.

} 36 cykli

1.1.10. Amplifikacja fragmentu genu *SacIIM*.

Nazwa odczynnika	Stężenie końcowe
bufor do polimerazy	1 x stężony
dNTP's	0,2 mM
BSA	10 mg/ml
Glicerol	9,6%
MgCl₂	2 mM
starter SacIIM_F	10 pM
starter SacIIM_R	10 pM
polimeraza DNA	1 U
dejonizowana woda	Dopełniono do objętości 25 µl

Etap reakcji	Temp.	Czas przebiegu etapu
Wstępna denaturacja	95°C	2 min.
Denaturacja	95°C	45 sek.
Przylączanie starterów	56°C	1 min.
Wydłużanie łańcucha DNA	72°C	1 min.
Końcowe wydłużanie łańcucha DNA	72°C	5 min.
Przechowywanie mieszaniny	16°C	0 sek.

} 36 cykli

1.1.11. Amplifikacja fragmentu genu *cas1*.

Nazwa odczynnika	Stężenie końcowe
bufor do polimerazy	1 x stężony
dNTP's	0,2 mM
BSA	10 mg/ml
Glicerol	9,6%
MgCl₂	2 mM
starter cas1_F	10 pM
starter cas1_R	10 pM
polimeraza DNA	1 U
dejonizowana woda	Dopełniono do objętości 25 µl

Etap reakcji	Temp.	Czas przebiegu etapu
Wstępna denaturacja	95°C	2 min.
Denaturacja	95°C	45 sek.
Przylączanie starterów	54°C	1 min.
Wydłużanie łańcucha DNA	72°C	1 min.
Końcowe wydłużanie łańcucha DNA	72°C	5 min.
Przechowywanie mieszaniny	16°C	0 sek.

} 36 cykli

1.1.12. Amplifikacja fragmentu genu *cas2*.

Nazwa odczynnika	Stężenie końcowe
bufor do polimerazy	1 x stężony
dNTP's	0,2 mM
BSA	10 mg/ml
Glicerol	9,6%
MgCl₂	2 mM
starter cas2_F	10 pM
starter cas2_R	10 pM
polimeraza DNA	1 U
dejonizowana woda	Dopełniono do objętości 25 µl

Etap reakcji	Temp.	Czas przebiegu etapu
Wstępna denaturacja	95°C	2 min.
Denaturacja	95°C	45 sek.
Przylączanie starterów	58°C	1 min.
Wydłużanie łańcucha DNA	72°C	1 min.
Końcowe wydłużanie łańcucha DNA	72°C	5 min.
Przechowywanie mieszaniny	16°C	0 sek.

} 36 cykli

1.1.13. Amplifikacja fragmentu genu *cmr6*.

Nazwa odczynnika	Stężenie końcowe
bufor do polimerazy	1 x stężony
dNTP's	0,2 mM
BSA	10 mg/ml
Glicerol	9,6%
MgCl₂	2 mM
starter <i>cmr6</i>_F	10 pM
starter <i>cmr6</i>_R	10 pM
polimeraza DNA	1 U
dejonizowana woda	Dopełniono do objętości 25 µl

Etap reakcji	Temp.	Czas przebiegu etapu
Wstępna denaturacja	95°C	2 min.
Denaturacja	95°C	45 sek.
Przylączanie starterów	58°C	1 min.
Wydłużanie łańcucha DNA	72°C	1 min.
Końcowe wydłużanie łańcucha DNA	72°C	5 min.
Przechowywanie mieszaniny	16°C	0 sek.

} 36 cykli

1.1.14. Amplifikacja fragmentu genu *csn3*.

Nazwa odczynnika	Stężenie końcowe
bufor do polimerazy	1 x stężony
dNTP's	0,2 mM
BSA	10 mg/ml
Glicerol	9,6%
MgCl₂	2 mM
starter <i>csn3</i>_F	10 pM
starter <i>csn3</i>_R	10 pM
polimeraza DNA	1 U
dejonizowana woda	Dopełniono do objętości 25 µl

Etap reakcji	Temp.	Czas przebiegu etapu
Wstępna denaturacja	95°C	2 min.
Denaturacja	95°C	45 sek.
Przylączanie starterów	56°C	1 min.
Wydłużanie łańcucha DNA	72°C	1 min.
Końcowe wydłużanie łańcucha DNA	72°C	5 min.
Przechowywanie mieszaniny	16°C	0 sek.

} 36 cykli

1.1.15. Amplifikacja fragmentu genu *csm4*.

Nazwa odczynnika	Stężenie końcowe
bufor do polimerazy	1 x stężony
dNTP's	0,2 mM
BSA	10 mg/ml
Glicerol	9,6%
MgCl₂	2 mM
starter csm4_F	10 pM
starter csm4_R	10 pM
polimeraza DNA	1 U
dejonizowana woda	Dopełniono do objętości 25 µl

Etap reakcji	Temp.	Czas przebiegu etapu
Wstępna denaturacja	95°C	2 min.
Denaturacja	95°C	45 sek.
Przylączanie starterów	58°C	1 min.
Wydłużanie łańcucha DNA	72°C	1 min.
Końcowe wydłużanie łańcucha DNA	72°C	5 min.
Przechowywanie mieszaniny	16°C	0 sek.

} 36 cykli

1.1.16. Amplifikacja fragmentu genu *csm5*.

Nazwa odczynnika	Stężenie końcowe
bufor do polimerazy	1 x stężony
dNTP's	0,2 mM
BSA	10 mg/ml
Glicerol	9,6%
MgCl₂	2 mM
starter csm5_F	10 pM
starter csm5_R	10 pM
polimeraza DNA	1 U
dejonizowana woda	Dopełniono do objętości 25 µl

Etap reakcji	Temp.	Czas przebiegu etapu
Wstępna denaturacja	95°C	2 min.
Denaturacja	95°C	45 sek.
Przylączanie starterów	52°C	1 min.
Wydłużanie łańcucha DNA	72°C	1 min.
Końcowe wydłużanie łańcucha DNA	72°C	5 min.
Przechowywanie mieszaniny	16°C	0 sek.

} 36 cykli

1.1.17. Amplifikacja fragmentu *csm3-csm5*.

Nazwa odczynnika	Stężenie końcowe
bufor do polimerazy	1 x stężony
dNTP's	0,2 mM
BSA	10 mg/ml
Glicerol	9,6%
MgCl₂	2 mM
starter csm3_F	10 pM
starter csm5_R	10 pM
polimeraza DNA	1 U
dejonizowana woda	Dopełniono do objętości 25 µl

Etap reakcji	Temp.	Czas przebiegu etapu
Wstępna denaturacja	95°C	2 min.
Denaturacja	95°C	45 sek.
Przylączanie starterów	56°C	1 min.
Wydłużanie łańcucha DNA	72°C	1 min.
Końcowe wydłużanie łańcucha DNA	72°C	5 min.
Przechowywanie mieszaniny	16°C	0 sek.

} 36 cykli

Do każdej reakcji PCR dodano 1 µl genomowego DNA wyizolowanego z komórek *Arthrospira* o stężeniu minimum 50 ng/ µl. W kontroli negatywnej zamiast DNA dodany został 1 µl wody dejonizowanej.

1.2. Amplifikacja fragmentów genów z użyciem DNA szczepów bakteryjnych wyizolowanych z suplementów diety *Arthrospira* oraz suchej biomasy jako matrycy w reakcji PCR.

1.2.2. Amplifikacja fragmentu operonu ITS I.A.

Nazwa odczynnika	Stężenie końcowe
bufor do polimerazy	1 x stężony
dNTP's	0,2 mM
BSA	10 mg/ml
Glicerol	9,6%
MgCl₂	2 mM
starter 16SF	10 pM
starter CL_I_SUB_A	10 pM
polimeraza DNA	1 U
dejonizowana woda	Dopełniono do objętości 25 µl

Etap reakcji	Temp.	Czas przebiegu etapu
Wstępna denaturacja	95°C	3 min.
Denaturacja	95°C	45 sek.
Przylączanie starterów	70°C	2,5 min.
Denaturacja	90°C	45 sek.
Przylączanie starterow	65°C	45 sek.
Wydłużanie łańcucha DNA	72°C	2 min.
Końcowe wydłużanie łańcucha DNA	72°C	7 min.
Przechowywanie mieszaniny	16°C	0 sek.

} 12 cykli

} 21 cykli

1.2.3. Amplifikacja fragmentu operonu ITS I.B.

Nazwa odczynnika	Stężenie końcowe	Etap reakcji	Temp.	Czas przebiegu etapu	
bufor do polimerazy	1 x stężony	Wstępna denaturacja	95°C	3 min.	12 cykli
dNTP's	0,2 mM	Denaturacja	95°C	45 sek.	
BSA	10 mg/ml	Przylączanie starterów	70°C	2,5 min.	
Glicerol	9,6%	Denaturacja	90°C	45 sek.	21 cykli
MgCl ₂	2 mM	Przylączanie starterow	65°C	45 sek.	
starter 23S5'R	10 pM	Wydłużanie łańcucha	72°C	2 min.	
starter CL_I_SUB_B	10 pM	DNA			
polimeraza DNA	1 U	Końcowe wydłużanie	72°C	7 min.	
dejonizowana woda	Dopełniono do objętości 25 µl	łańcucha DNA			
		Przechowywanie mieszaniny	16°C	0 sek.	

1.2.4. Amplifikacja fragmentu operonu ITS II.A.

Nazwa odczynnika	Stężenie końcowe	Etap reakcji	Temp.	Czas przebiegu etapu	
bufor do polimerazy	1 x stężony	Wstępna denaturacja	95°C	3 min.	12 cykli
dNTP's	0,2 mM	Denaturacja	95°C	45 sek.	
BSA	10 mg/ml	Przylączanie starterów	70°C	2,5 min.	
Glicerol	9,6%	Denaturacja	90°C	45 sek.	21 cykli
MgCl ₂	2 mM	Przylączanie starterow	65°C	45 sek.	
starter 16SF	10 pM	Wydłużanie łańcucha	72°C	2 min.	
starter CL_II_SUB_A	10 pM	DNA			
polimeraza DNA	1 U	Końcowe wydłużanie	72°C	7 min.	
dejonizowana woda	Dopełniono do objętości 25 µl	łańcucha DNA			
		Przechowywanie mieszaniny	16°C	0 sek.	

1.2.5. Amplifikacja fragmentu operonu ITS II.B.

Nazwa odczynnika	Stężenie końcowe
bufor do polimerazy	1 x stężony
dNTP's	0,2 mM
BSA	10 mg/ml
Glicerol	9,6%
MgCl ₂	2 mM
starter 23S5'R	10 pM
starter CL_II_SUB_B	10 pM
polimeraza DNA	1 U
dejonizowana woda	Dopełniono do objętości 25 µl

Etap reakcji	Temp.	Czas przebiegu etapu
Wstępna denaturacja	95°C	3 min.
Denaturacja	95°C	45 sek.
Przylączanie starterów	70°C	2,5 min.
Denaturacja	90°C	45 sek.
Przylączanie starterow	65°C	45 sek.
Wydłużanie łańcucha DNA	72°C	2 min.
Końcowe wydłużanie łańcucha DNA	72°C	7 min.
Przechowywanie mieszaniny	16°C	0 sek.

12 cykli
21 cykli

1.2.6. Amplifikacja fragmentu operonu ITS III.

Nazwa odczynnika	Stężenie końcowe
bufor do polimerazy	1 x stężony
dNTP's	0,2 mM
BSA	10 mg/ml
Glicerol	9,6%
MgCl ₂	1,6 mM
starter 16SF	10 pM
starter CL_III	10 pM
polimeraza DNA	1 U
dejonizowana woda	Dopełniono do objętości 25 µl

Etap reakcji	Temp.	Czas przebiegu etapu
Wstępna denaturacja	94°C	3 min.
Denaturacja	94°C	45 sek.
Przylączanie starterów	74°C	2,5 min.
Denaturacja	90°C	45 sek.
Przylączanie starterow	60°C	45 sek.
Wydłużanie łańcucha DNA	72°C	2 min.
Końcowe wydłużanie łańcucha DNA	72°C	7 min.
Przechowywanie mieszaniny	16°C	0 sek.

12 cykli
22 cykle

1.2.7. Amplifikacja regionu 16S rRNA z użyciem starterów 27f i 1492r.

Nazwa odczynnika	Stężenie końcowe	Etap reakcji	Temp.	Czas przebiegu etapu	
bufor do polimerazy	1 x stężony	Wstępna denaturacja	95°C	4 min.	} 36 cykli
dNTP's	0,2 mM	Denaturacja	94°C	60 sek.	
BSA	10 mg/ml	Przylączanie starterów	55°C	60 sek.	
Glicerol	9,6%				
MgCl₂	2 mM	Wydłużanie łańcucha DNA	72°C	2 min.	
starter 27f	10 pM				
starter 1492r	10 pM	Końcowe wydłużanie łańcucha DNA	72°C	7 min.	
polimeraza DNA	1 U	Przechowywanie mieszaniny	16°C	0 sek.	
dejonizowana woda	Dopełniono do objętości 50 µl				

Do każdej reakcji PCR dodano 1 µl genomowego DNA wyizolowanego z izolatów bakterii symbiotycznych lub suchej biomasy *Arthrospira* o stężeniu minimum 50 ng/ µl. W kontroli negatywnej zamiast DNA dodany został 1 µl wody dejonizowanej.

1.3.

ANEKS 2 Tabela 1. Obecność zidentyfikowanych genów kodujących systemy R-M typu I w sześciu genomach *Arthrospira*, dla których dostępne są ORF w platformie MaGe.

Opis genu	<i>A. maxima</i> CS-328	<i>A. platensis</i> C1	<i>Arthrospira</i> sp. PCC 8005	<i>Arthrospira</i> sp. TJSD091	<i>A. platensis</i> NIES-39	<i>Arthrospira</i> sp. YZ
Enzym restrykcyjny typu I, białko specyficzności <i>EcoKI</i>	ARMACv1_290034	AFDXv1_50111	ARTHROv5_11150	ARTTJ_v1_390004	Brak wyniku	Brak wyniku
<i>hsdM</i> metylotransferaza DNA	ARMACv1_630013	AFXDv1_50093	ARTHROv5_11157	ARTTJ_v1_380110	Brak wyniku	Brak wyniku
R-M system typu I, podjednostka S	Fragment	Fragment	ARTHROv5_60700	Fragment	NIES39_A06660	Fragment
R-M system typu I, podjednostka R HsdR	ARMACv1_40057	AFXDv1_200353	ARTHROv5_60703	ARTTJ_v1_2460043	NIES39_A06620	AP285_02805
	ARMACv1_40056		ARTHROv5_60704	ARTTJ_v1_2460044		
R-M system typu I, podjednostka M HsdM	ARMACv1_40061	AFXDv1_200357	ARTHROv5_60699	ARTTJ_v1_2510043	NIES39_A6670	AP285_25580
Enzym typu I <i>EcoprI</i> , białko M HsdM	ARMACv1_60063	AFDXv1_26005	ARTHROv5_50209 ARTHROv5_11311	Brak wyniku	NIES39_L03180	Obecny
Enzym restrykcyjny typu I, podjednostka M	ARMACv1_40094	AFXDV1_530268	ARTHROv5_11613	Brak wyniku	NIES39_L03180	AP285_14290
R-M enzym typu I R	ARMACv1_290026	AFXDv1_30246	ARTHROv5_11160	ARTTJ_v1_1400037	Brak wyniku	Brak wyniku
Miejscowo-specyficzna dezoksyrybonukleaza typu z rodziny HsdR	ARMACv1_40090	AFXDv1_530187	ARTHROv5_11612	ARTTJ_v1_3450054	NIES39_C00380	AP285_14300
Miejscowo-specyficzna dezoksyrybonukleaza typu z rodziny HsdR	ARMACv1_630013	AFXDv1_530185	ARTHROv5_11612	ARTTJ_v1_3450052	NIES39_L04670	AP285_22405
Miejscowo-specyficzna dezoksyrybonukleaza typu z rodziny HsdR	ARMACv1_63013	AFXDv1_530184	ARTHROv5_11612	ARTTJ_v1_3450051	NIES39_L03180	AP285_20395
Miejscowo-specyficzna dezoksyrybonukleaza typu z rodziny HsdR	ARMACv1_60060	AFXDv1_26009	ARTHROv5_50203	ARTTJ_v1_1220001	NIES39_O03620	AP285_25580
Enzym R-M typu I, podjednostka S	Brak wyniku	AFXDv1_530190	Brak wyniku	Brak wyniku	NIES39_C00340	Fragment
Potencjalna endonukleaza restrykcyjna, podjednostka S	ARMACv1_40060	Fragment	Fragment	ARTTJ_v1_2510043	NIES39-A06660	Fragment

ANEKS 2 Tabela 2. Obecność zidentyfikowanych genów kodujących systemy R-M typu I w siedmiu genomach *Arthrospira*, dla których niedostępne są ORF w platformie MaGe

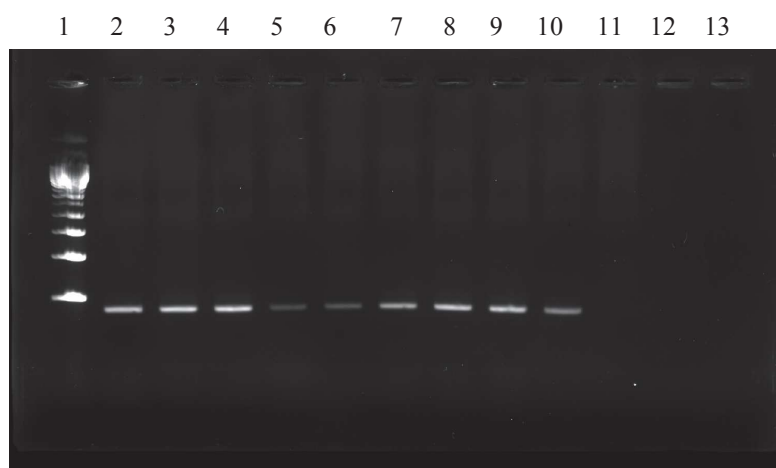
Opis genu	<i>Arthrospira</i> sp. TJSD092	<i>Arthrospira</i> sp. PCC 9901	<i>Arthrospira</i> sp. O9.13	<i>Arthrospira</i> sp. PCC 8006	<i>A. platensis</i> str. Paraca	<i>A. fusiformis</i> CCALA023	<i>A. platensis</i> PCC7345
Enzym restrykcyjny typu I, białko specyficzności <i>EcoKI</i>	fragment	Brak wyniku	fragment	Brak wyniku	Brak wyniku	Brak wyniku	Brak wyniku
hsdM metylotransferaza DNA	Obecny	Brak wyniku	obecny	Brak wyniku	Brak wyniku	Brak wyniku	Brak wyniku
R-M system typu I, podjednostka S	Fragment	Brak wyniku	Fragment	Fragment	Fragment	Fragment	Fragment
R-M system typu I, podjednostka R HsdR	Fragment	Brak wyniku	Fragment	Obecny	Obecny	Obecny	Obecny
R-M system typu I, podjednostka M HsdM	Obecny	Brak wyniku	Obecny	Obecny	Obecny	Obecny	Obecny
Enzym typu I <i>EcoprI</i> , białko M HsdM	Obecny	Brak wyniku	Obecny	Obecny	Obecny	Obecny	Obecny
Enzym restrykcyjny typu I, podjednostka M	Obecny	Brak wyniku	Obecny	Obecny	Obecny	Obecny	Obecny
R-M enzym typu I R	Obecny	Brak wyniku	Obecny	Brak wyniku	Brak wyniku	Brak wyniku	Brak wyniku
Miejscowo-specyficzna dezoksyrybonukleaza typu z rodziny HsdR	Obecny	Brak wyniku	Obecny	Obecny	Obecny	Obecny	Obecny
Miejscowo-specyficzna dezoksyrybonukleaza typu z rodziny HsdR	Obecny	Brak wyniku	Obecny	Obecny	Obecny	Obecny	Obecny
Miejscowo-specyficzna dezoksyrybonukleaza typu z rodziny HsdR	Obecny	Brak wyniku	Obecny	Obecny	Obecny	Obecny	Obecny
Miejscowo-specyficzna dezoksyrybonukleaza typu z rodziny HsdR	Obecny	Brak wyniku	Obecny	Obecny	Obecny	Obecny	Obecny
Enzym R-M typu I, podjednostka S	Brak wyniku	Brak wyniku	Brak wyniku	Brak wyniku	Brak wyniku	Fragment	Fragment
Potencjalna endonukleaza restrykcyjna, podjednostka S	Fragment	Brak wyniku	Fragment	Fragment	Fragment	Fragment	Fragment

ANEKS 2. Fotografia 1. Rozdział elektroforetyczny amplifikacji DNA fragmentu kodującego endonukleazę *AsuII*, wielkość produktu 578 pz.



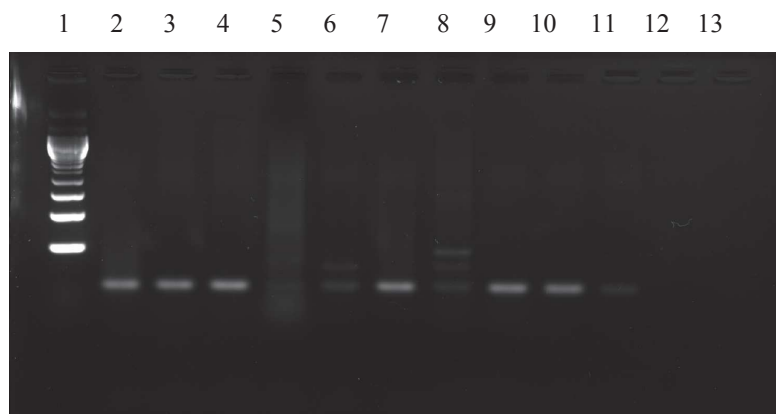
Rozdział elektroforetyczny wykonano w 1,0% żelu agarozowym. **1** – wzorzec masowy 500 bp; na ścieżki oznaczone 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 nanoszono 10 µl produktu PCR: **2** – *Arthrospira platensis* C1, **3** – *Arthrospira* sp. PCC 8005, **4** – *Arthrospira* sp. PCC 8006, **5** – *Arthrospira platensis* str. Paracas, **6** – *Arthrospira platensis* PCC 7345, **7** – *Arthrospira fusiformis* CCALA023, **8** – *Arthrospira* sp. PCC 9901, **9** – *Arthrospira* sp. O9.13 F, **10** – kontrola pozytywna, **11** – kontrola negatywna.

ANEKS 2. Fotografia 2. Rozdział elektroforetyczny amplifikacji DNA fragmentu kodującego metylotransferazę *AsuII*, wielkość produktu 594 pz.



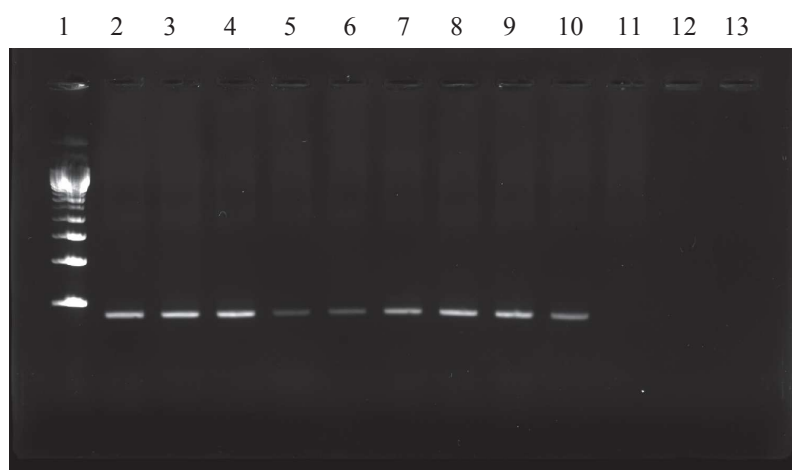
Rozdział elektroforetyczny wykonano w 1,0% żelu agarozowym. **1** – wzorzec masowy 500 bp; na ścieżki oznaczone 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 nanoszono 10 µl produktu PCR: **2** – *Arthrospira platensis* C1, **3** – *Arthrospira* sp. PCC 8005, **4** – *Arthrospira* sp. PCC 8006, **5** – *Arthrospira platensis* str. Paracas, **6** – *Arthrospira platensis* PCC 7345, **7** – *Arthrospira fusiformis* CCALA023, **8** – *Arthrospira* sp. PCC 9901, **9** – *Arthrospira* sp. O9.13 F, **10** – kontrola pozytywna, **11** – kontrola negatywna.

ANEKS 2. Fotografia 3. Rozdział elektroforetyczny amplifikacji DNA fragmentu kodującego endonukleazę *AvaI*, wielkość produktu 158 pz.



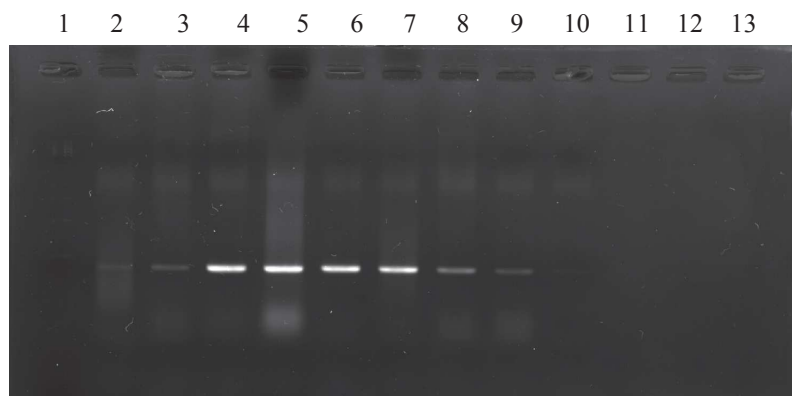
Rozdział elektroforetyczny wykonano w 1,0% żelu agarozowym. **1** – wzorzec masowy 500 bp; na ścieżki oznaczone 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 nanoszono 10 µl produktu PCR: **2** – *Arthrospira platensis* C1, **3** – *Arthrospira* sp. PCC 8005, **4** – *Arthrospira* sp. PCC 8006, **5** – *Arthrospira platensis* str. Paraca, **6** – *Arthrospira platensis* PCC 7345, **7** – *Arthrospira fusiformis* CCALA023, **8** – *Arthrospira* sp. PCC 9901, **9** – *Arthrospira* sp. O9.13 F, **10** – kontrola pozytywna, **11** – kontrola negatywna.

ANEKS 2. Fotografia 4. Rozdział elektroforetyczny amplifikacji DNA fragmentu kodującego metylotransferazę *AvaI*, wielkość produktu 409 pz.



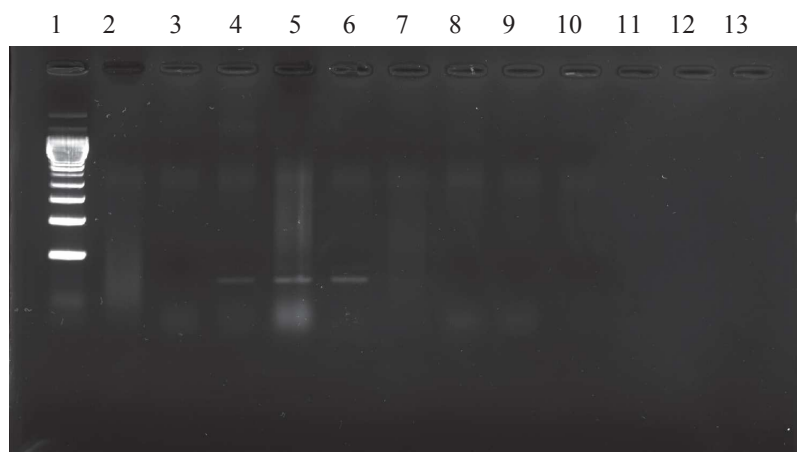
Rozdział elektroforetyczny wykonano w 1,0% żelu agarozowym. **1** – wzorzec masowy 500 bp; na ścieżki oznaczone 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 nanoszono 10 µl produktu PCR: **2** – *Arthrospira platensis* C1, **3** – *Arthrospira* sp. PCC 8005, **4** – *Arthrospira* sp. PCC 8006, **5** – *Arthrospira platensis* str. Paracas, **6** – *Arthrospira platensis* PCC 7345, **7** – *Arthrospira fusiformis* CCALA023, **8** – *Arthrospira* sp. PCC 9901, **9** – *Arthrospira* sp. O9.13 F, **10** – kontrola pozytywna, **11** – kontrola negatywna.

ANEKS 2. Fotografia 5. Rozdział elektroforetyczny amplifikacji DNA fragmentu kodującego endonukleazę *SacII*, wielkość produktu 263 pz.



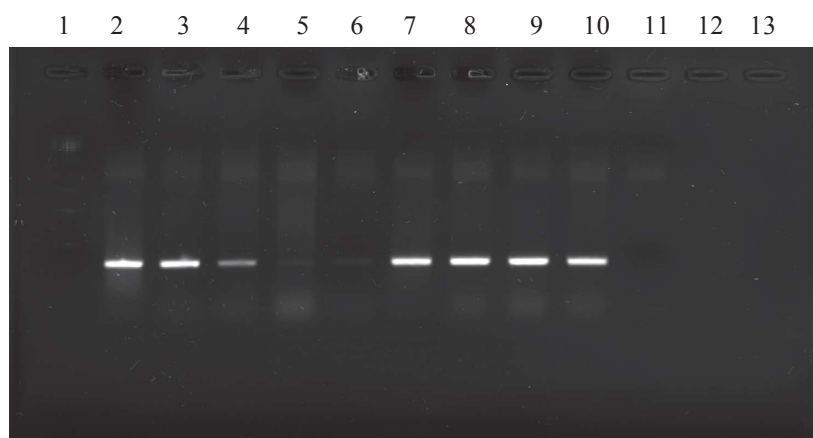
Rozdział elektroforetyczny wykonano w 1,0% żelu agarozowym. **1** – wzorzec masowy 500 bp; na ścieżki oznaczone 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 nanoszono 10 µl produktu PCR: **2** – *Arthrospira platensis* C1, **3** – *Arthrospira* sp. PCC 8005, **4** – *Arthrospira* sp. PCC 8006, **5** – *Arthrospira platensis* str. Paracas, **6** – *Arthrospira platensis* PCC 7345, **7** – *Arthrospira fusiformis* CCALA023, **8** – *Arthrospira* sp. PCC 9901, **9** – *Arthrospira* sp. O9.13 F, **10** – kontrola pozytywna, **11** – kontrola negatywna.

ANEKS 2. Fotografia 6. Rozdział elektroforetyczny amplifikacji DNA fragmentu kodującego metylotransferazę *SacII*, wielkość produktu 398 pz.



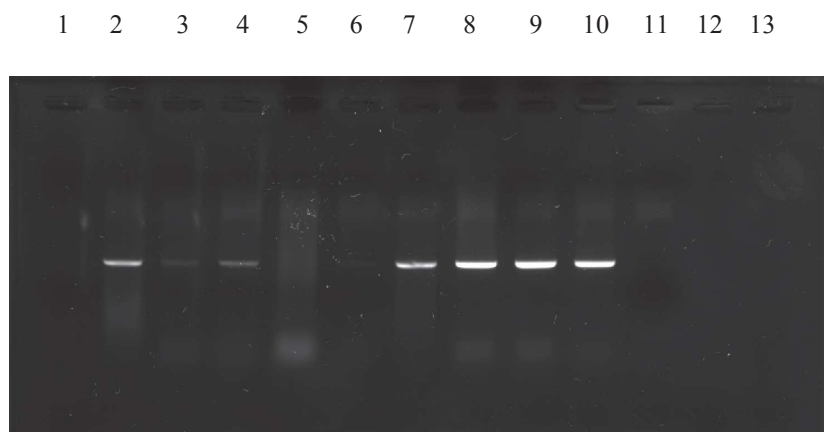
Rozdział elektroforetyczny wykonano w 1,0% żelu agarozowym. **1** – wzorzec masowy 500 bp; na ścieżki oznaczone 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 nanoszono 10 µl produktu PCR: **2** – *Arthrospira platensis* C1, **3** – *Arthrospira* sp. PCC 8005, **4** – *Arthrospira* sp. PCC 8006, **5** – *Arthrospira platensis* str. Paracas, **6** – *Arthrospira platensis* PCC 7345, **7** – *Arthrospira fusiformis* CCALA023, **8** – *Arthrospira* sp. PCC 9901, **9** – *Arthrospira* sp. O9.13 F, **10** – kontrola pozytywna, **11** – kontrola negatywna.

ANEKS 2. Fotografia 7. Rozdział elektroforetyczny amplifikacji DNA fragmentu kodującego endonukleazę *NheI*, wielkość produktu 321 pz.



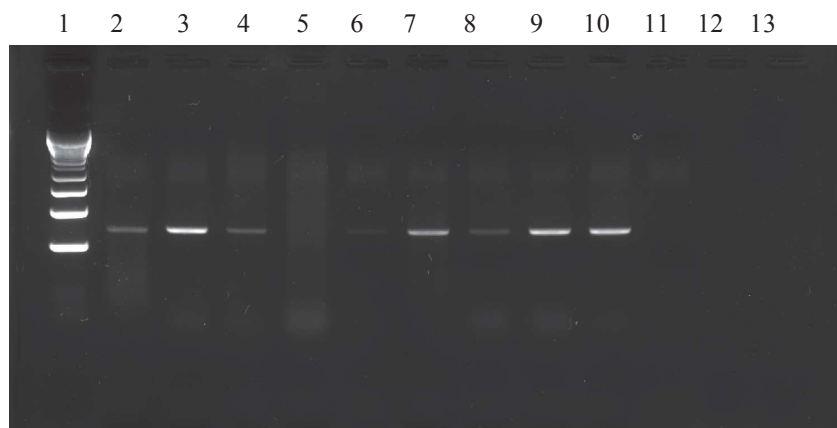
Rozdział elektroforetyczny wykonano w 1,0% żelu agarozowym. **1** – wzorzec masowy 500 bp; na ścieżki oznaczone 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 nanoszono 10 µl produktu PCR: **2** – *Arthrospira platensis* C1, **3** – *Arthrospira* sp. PCC 8005, **4** – *Arthrospira* sp. PCC 8006, **5** – *Arthrospira platensis* str. Paracas, **6** – *Arthrospira platensis* PCC 7345, **7** – *Arthrospira fusiformis* CCALA023, **8** – *Arthrospira* sp. PCC 9901, **9** – *Arthrospira* sp. O9.13 F, **10** – kontrola pozytywna, **11** – kontrola negatywna.

ANEKS 2. Fotografia 8. Rozdział elektroforetyczny amplifikacji DNA fragmentu kodującego metylotransferazę *NheI*, wielkość produktu 794 pz.



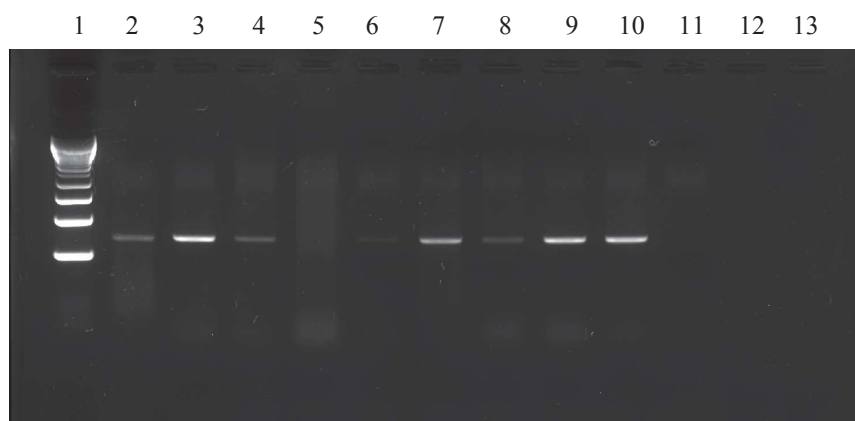
Rozdział elektroforetyczny wykonano w 1,0% żelu agarozowym. **1** – wzorzec masowy 500 bp; na ścieżki oznaczone 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 nanoszono 10 µl produktu PCR: **2** – *Arthrospira platensis* C1, **3** – *Arthrospira* sp. PCC 8005, **4** – *Arthrospira* sp. PCC 8006, **5** – *Arthrospira platensis* str. Paracas, **6** – *Arthrospira platensis* PCC 7345, **7** – *Arthrospira fusiformis* CCALA023, **8** – *Arthrospira* sp. PCC 9901, **9** – *Arthrospira* sp. O9.13 F, **10** – kontrola pozytywna, **11** – kontrola negatywna.

ANEKS 2. Fotografia 9. Rozdział elektroforetyczny amplifikacji DNA fragmentu kodującego endonukleazę *HindIII*, wielkość produktu 836 pz.



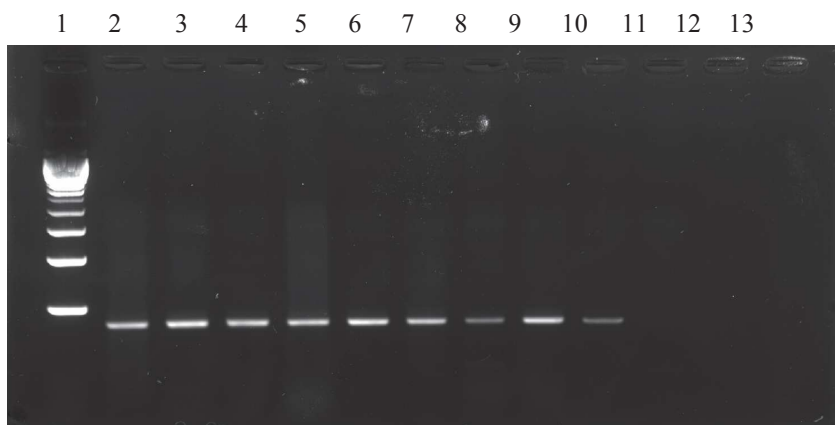
Rozdział elektroforetyczny wykonano w 1,0% żelu agarozowym. **1** – wzorzec masowy 500 bp; na ścieżki oznaczone 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 nanoszono 10 µl produktu PCR: **2** – *Arthrospira platensis* C1, **3** – *Arthrospira* sp. PCC 8005, **4** – *Arthrospira* sp. PCC 8006, **5** – *Arthrospira platensis* str. Paracas, **6** – *Arthrospira platensis* PCC 7345, **7** – *Arthrospira fusiformis* CCALA023, **8** – *Arthrospira* sp. PCC 9901, **9** – *Arthrospira* sp. O9.13 F, **10** – kontrola pozytywna, **11** – kontrola negatywna.

ANEKS 2. Fotografia 10. Rozdział elektroforetyczny amplifikacji DNA fragmentu kodującego metylotransferazę *HindIII*, wielkość produktu 724 pz.



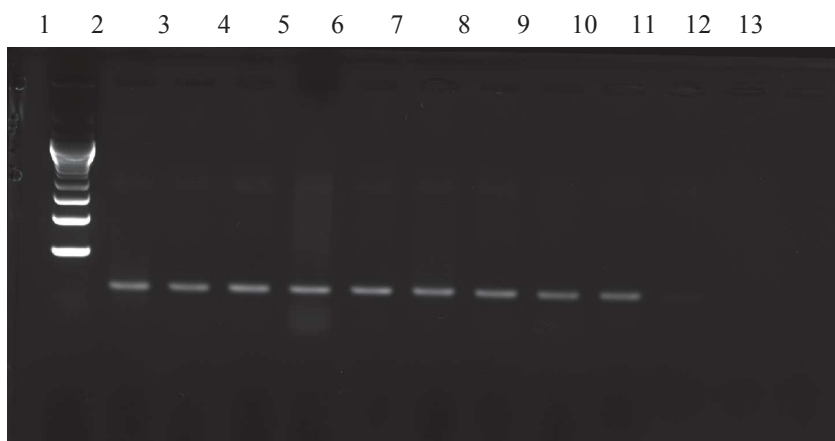
Rozdział elektroforetyczny wykonano w 1,0% żelu agarozowym. **1** – wzorzec masowy 500 bp; na ścieżki oznaczone 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 nanoszono 10 µl produktu PCR: **2** – *Arthrospira platensis* C1, **3** – *Arthrospira* sp. PCC 8005, **4** – *Arthrospira* sp. PCC 8006, **5** – *Arthrospira platensis* str. Paracas, **6** – *Arthrospira platensis* PCC 7345, **7** – *Arthrospira fusiformis* CCALA023, **8** – *Arthrospira* sp. PCC 9901, **9** – *Arthrospira* sp. O9.13 F, **10** – kontrola pozytywna, **11** – kontrola negatywna.

ANEKS 2. Fotografia 11. Rozdział elektroforetyczny amplifikacji DNA fragmentu kodującego białko Cas1.1, wielkość produktu 375 pz.



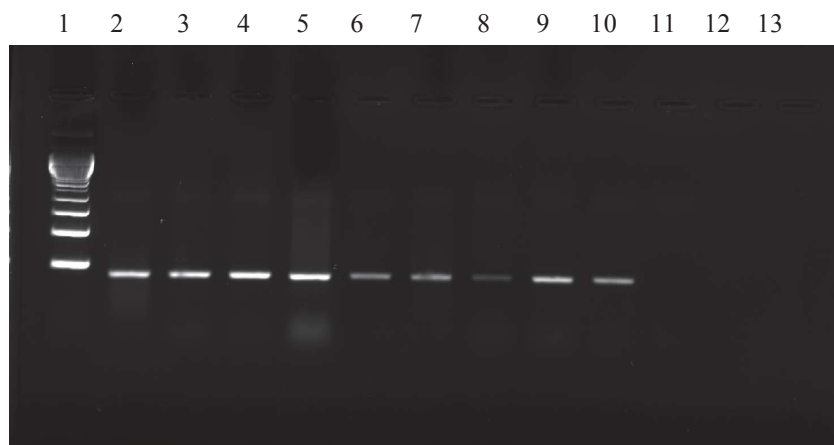
Rozdział elektroforetyczny wykonano w 1,0% żelu agarozowym. **1** – wzorzec masowy 500 bp; na ścieżki oznaczone 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 nanoszono 10 µl produktu PCR: **2** – *Arthrospira platensis* C1, **3** – *Arthrospira* sp. PCC 8005, **4** – *Arthrospira* sp. PCC 8006, **5** – *Arthrospira platensis* str. Paracas, **6** – *Arthrospira platensis* PCC 7345, **7** – *Arthrospira fusiformis* CCALA023, **8** – *Arthrospira* sp. PCC 9901, **9** – *Arthrospira* sp. O9.13 F, **10** – kontrola pozytywna, **11** – kontrola negatywna.

ANEKS 2. Fotografia 12. Rozdział elektroforetyczny amplifikacji DNA fragmentu kodującego białko Cas2.1, wielkość produktu 207 pz.



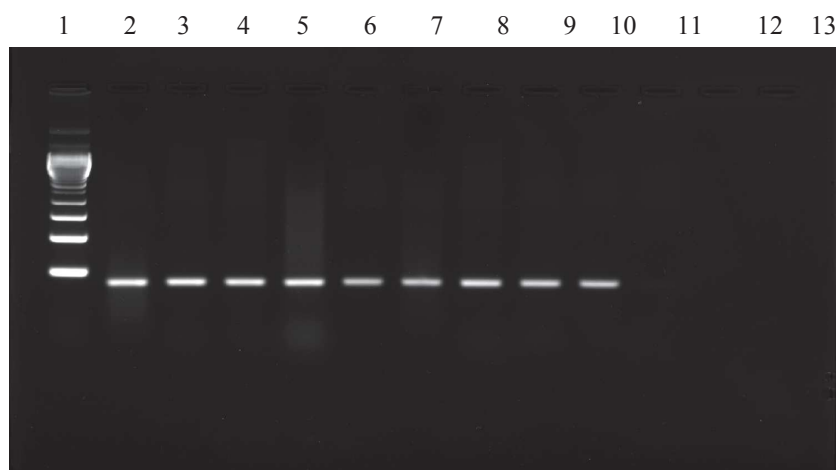
Rozdział elektroforetyczny wykonano w 1,0% żelu agarozowym. **1** – wzorzec masowy 500 bp; na ścieżki oznaczone 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 nanoszono 10 µl produktu PCR: **2** – *Arthrospira platensis* C1, **3** – *Arthrospira* sp. PCC 8005, **4** – *Arthrospira* sp. PCC 8006, **5** – *Arthrospira platensis* str. Paracas, **6** – *Arthrospira platensis* PCC 7345, **7** – *Arthrospira fusiformis* CCALA023, **8** – *Arthrospira* sp. PCC 9901, **9** – *Arthrospira* sp. O9.13 F, **10** – kontrola pozytywna, **11** – kontrola negatywna.

ANEKS 2. Fotografia 13. Rozdział elektroforetyczny amplifikacji DNA fragmentu kodującego białko Cmr6, wielkość produktu 428 pz.



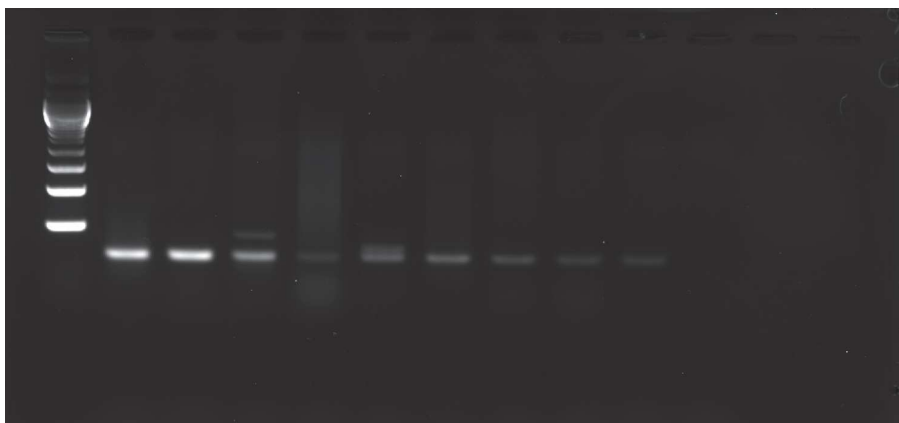
Rozdział elektroforetyczny wykonano w 1,0% żelu agarozowym. **1** – wzorzec masowy 500 bp; na ścieżki oznaczone 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 nanoszono 10 µl produktu PCR: **2** – *Arthrospira platensis* C1, **3** – *Arthrospira* sp. PCC 8005, **4** – *Arthrospira* sp. PCC 8006, **5** – *Arthrospira platensis* str. Paracas, **6** – *Arthrospira platensis* PCC 7345, **7** – *Arthrospira fusiformis* CCALA023, **8** – *Arthrospira* sp. PCC 9901, **9** – *Arthrospira* sp. O9.13 F, **10** – kontrola pozytywna, **11** – kontrola negatywna.

ANEKS 2. Fotografia 14. Rozdział elektroforetyczny amplifikacji DNA fragmentu kodującego białko Csm3, wielkość produktu 390 pz.



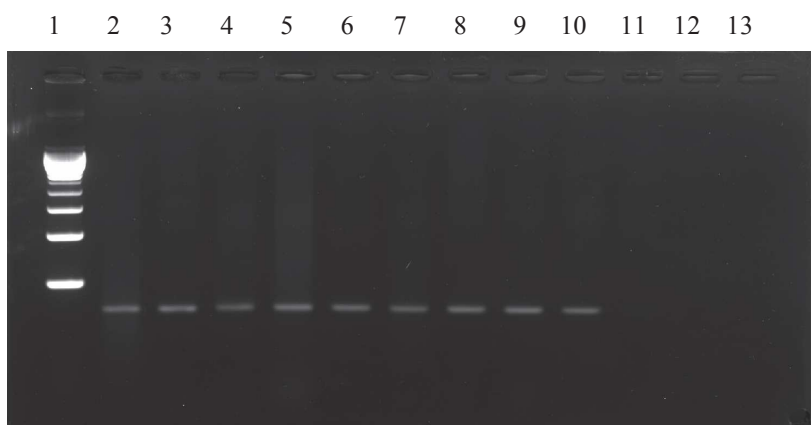
Rozdział elektroforetyczny wykonano w 1,0% żelu agarozowym. **1** – wzorzec masowy 500 bp; na ścieżki oznaczone 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 nanoszono 10 µl produktu PCR: **2** – *Arthrospira platensis* C1, **3** – *Arthrospira* sp. PCC 8005, **4** – *Arthrospira* sp. PCC 8006, **5** – *Arthrospira platensis* str. Paracas, **6** – *Arthrospira platensis* PCC 7345, **7** – *Arthrospira fusiformis* CCALA023, **8** – *Arthrospira* sp. PCC 9901, **9** – *Arthrospira* sp. O9.13 F, **10** – kontrola pozytywna, **11** – kontrola negatywna.

ANEKS 2. Fotografia 15. Rozdział elektroforetyczny amplifikacji DNA fragmentu kodującego białko Csm4, wielkość produktu 252 pz.



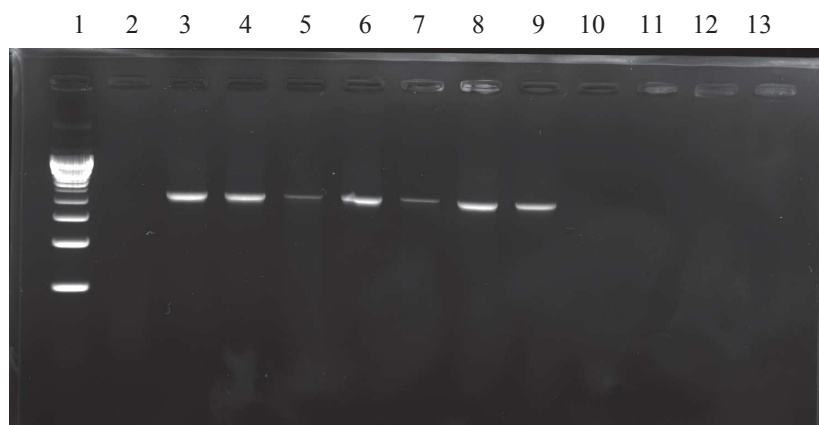
Rozdział elektroforetyczny wykonano w 1,0% żelu agarozowym. **1** – wzorzec masowy 500 bp; na ścieżki oznaczone 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 nanoszono 10 µl produktu PCR: **2** – *Arthrospira platensis* C1, **3** – *Arthrospira* sp. PCC 8005, **4** – *Arthrospira* sp. PCC 8006, **5** – *Arthrospira platensis* str. Paracas, **6** – *Arthrospira platensis* PCC 7345, **7** – *Arthrospira fusiformis* CCALA023, **8** – *Arthrospira* sp. PCC 9901, **9** – *Arthrospira* sp. O9.13 F, **10** – kontrola pozytywna, **11** – kontrola negatywna.

ANEKS 2. Fotografia 16. Rozdział elektroforetyczny amplifikacji DNA fragmentu kodującego białko Csm5, wielkość produktu 328 pz.



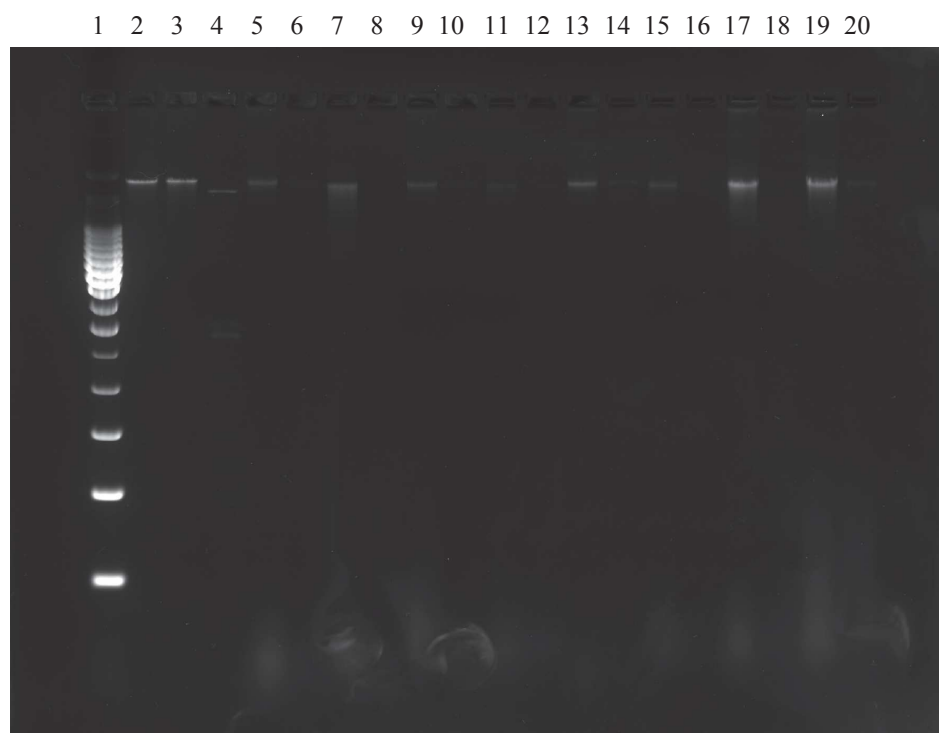
Rozdział elektroforetyczny wykonano w 1,0% żelu agarozowym. **1** – wzorzec masowy 500 bp; na ścieżki oznaczone 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 nanoszono 10 µl produktu PCR: **2** – *Arthrospira platensis* C1, **3** – *Arthrospira* sp. PCC 8005, **4** – *Arthrospira* sp. PCC 8006, **5** – *Arthrospira platensis* str. Paracas, **6** – *Arthrospira platensis* PCC 7345, **7** – *Arthrospira fusiformis* CCALA023, **8** – *Arthrospira* sp. PCC 9901, **9** – *Arthrospira* sp. O9.13 F, **10** – kontrola pozytywna, **11** – kontrola negatywna.

ANEKS 2. Fotografia 17. Rozdział elektroforetyczny amplifikacji DNA fragmentu kodującego fragment *csm3-csm5*, wielkość produktu 2229 pz.



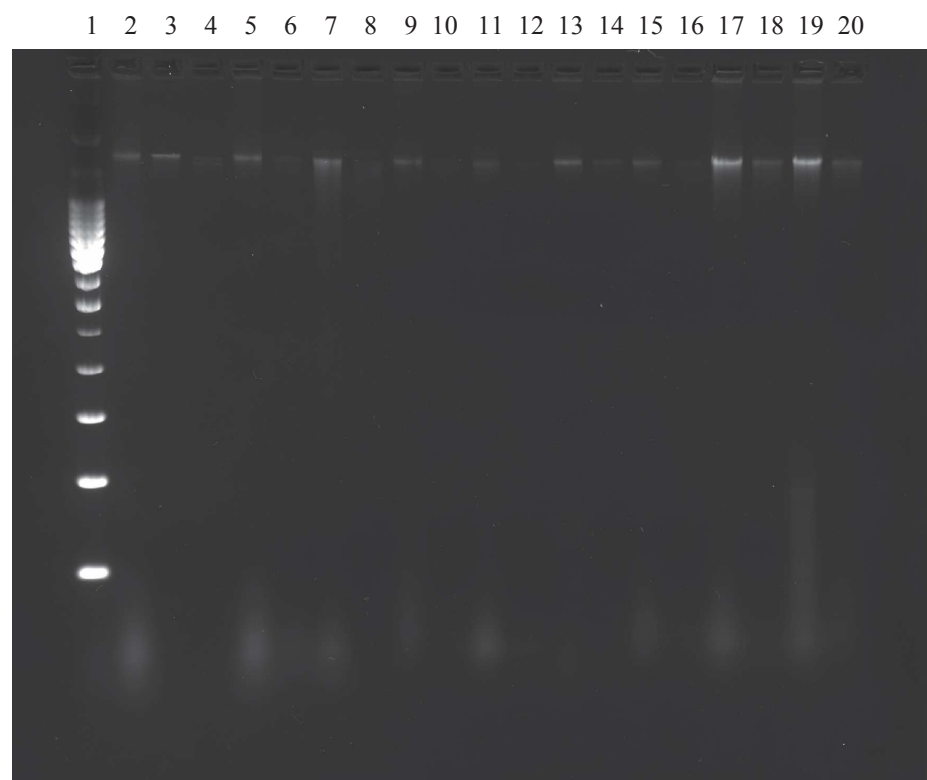
Rozdział elektroforetyczny wykonano w 1,0% żelu agarozowym. **1** – wzorzec masowy 500 bp; na ścieżki oznaczone 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 nanoszono 10 µl produktu PCR: **2** – *Arthrospira platensis* C1, **3** – *Arthrospira* sp. PCC 8005, **4** – *Arthrospira* sp. PCC 8006, **5** – *Arthrospira platensis* str. Paracas, **6** – *Arthrospira platensis* PCC 7345, **7** – *Arthrospira fusiformis* CCALA023, **8** – *Arthrospira* sp. PCC 9901, **9** – *Arthrospira* sp. O9.13 F, **10** – kontrola pozytywna, **11** – kontrola negatywna.

ANEKS 2. Fotografia 18. Zdjęcie rozdziału elektroforetycznego na żelu agarozowym analizy restrykcyjnej z użyciem enzymu *Bsh*NI.).



Rozdział elektroforetyczny wykonano w 1,2% żelu agarozowym. **1** – wzorzec masowy 500 bp; na ścieżki oznaczone **2, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19** nanoszono 2 µl genomowego DNA: **2** – DNA faga Λ , **5** – *Arthrospira platensis* PCC9438, **7** – *Arthrospira* sp. PCC 8005, **9** – *Arthrospira* sp. PCC 8006, **11** – *Arthrospira platensis* Paracas P0, **13** – *Arthrospira platensis* PCC 7345, **15** – *Arthrospira fusiformis* CCALA023, **17** – *Arthrospira* sp. PCC 9901, **19** – *Arthrospira* sp. O9.13 F; na ścieżkę **3** naniesiono kontrolę negatywną – DNA faga lambda inkubowane z buforem enzymu restrykcyjnego; na ścieżki **4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20** naniesiono 20 µl mieszaniny reakcyjnej z enzymem ***Bsh*NI**: **4** – DNA faga Λ , **6** – *Arthrospira platensis* PCC9438, **8** – *Arthrospira* sp. PCC 8005, **10** – *Arthrospira* sp. PCC 8006, **12** – *Arthrospira platensis* Paracas P0, **14** – *Arthrospira platensis* PCC 7345, **16** – *Arthrospira fusiformis* CCALA023, **18** – *Arthrospira* sp. PCC 9901, **20** – *Arthrospira* sp. O9.13 F.

ANEKS 2. Fotografia 19. Zdjęcie rozdziału elektroforetycznego na żelu agarozowym analizy restrykcyjnej z użyciem enzymu *Pfl23II*.



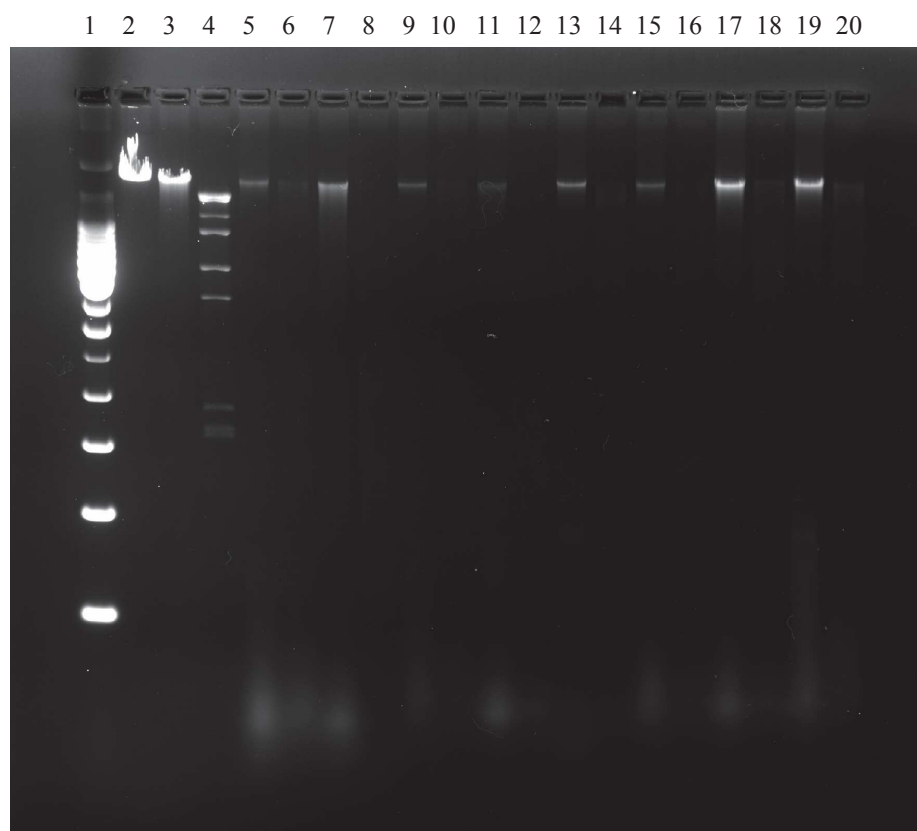
Rozdział elektroforetyczny wykonano w 1,2% żelu agarozowym. **1** – wzorzec masowy 500 bp; na ścieżki oznaczone 2, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 nanoszono 2 µl genomowego DNA: **2** – DNA faga Λ , **5** – *Arthrospira platensis* PCC9438, **7** – *Arthrospira* sp. PCC 8005, **9** – *Arthrospira* sp. PCC 8006, **11** – *Arthrospira platensis* Paracas P0, **13** – *Arthrospira platensis* PCC 7345, **15** – *Arthrospira fusiformis* CCALA023, **17** – *Arthrospira* sp. PCC 9901, **19** – *Arthrospira* sp. O9.13 F; na ścieżkę **3** naniesiono kontrolę negatywną – DNA faga lambda inkubowane z buforem enzymu restrykcyjnego; na ścieżki 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 naniesiono 20 µl mieszaniny reakcyjnej z enzymem *Pfl23II*: **4** – DNA faga Λ , **6** – *Arthrospira platensis* PCC9438, **8** – *Arthrospira* sp. PCC 8005, **10** – *Arthrospira* sp. PCC 8006, **12** – *Arthrospira platensis* Paracas P0, **14** – *Arthrospira platensis* PCC 7345, **16** – *Arthrospira fusiformis* CCALA023, **18** – *Arthrospira* sp. PCC 9901, **20** – *Arthrospira* sp. O9.13 F.

ANEKS 2. Fotografia 20. Zdjęcie rozdziału elektroforetycznego na żelu agarozowym analizy restrykcyjnej z użyciem enzymu *Bsp*143I.



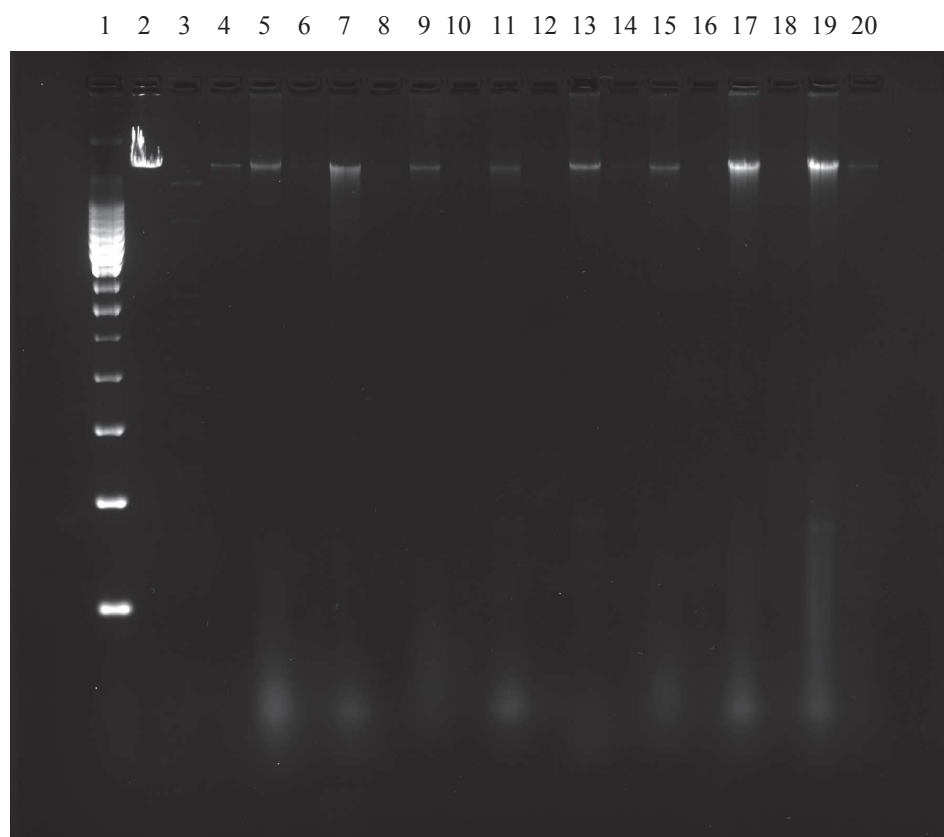
Rozdział elektroforetyczny wykonano w 1,2% żelu agarozowym. **1** – wzorzec masowy 500 bp; na ścieżki oznaczone **2, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19** nanoszono 2 µl genomowego DNA: **2** – DNA faga Λ , **5** – *Arthrospira platensis* PCC9438, **7** – *Arthrospira* sp. PCC 8005, **9** – *Arthrospira* sp. PCC 8006, **11** – *Arthrospira platensis* Paracas P0, **13** – *Arthrospira platensis* PCC 7345, **15** – *Arthrospira fusiformis* CCALA023, **17** – *Arthrospira* sp. PCC 9901, **19** – *Arthrospira* sp. O9.13 F; na ścieżkę **3** naniesiono kontrolę negatywną – DNA faga lambda inkubowane z buforem enzymu restrykcyjnego; na ścieżki **4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20** naniesiono 20 µl mieszaniny reakcyjnej z enzymem ***Bsp*143I**: **4** – DNA faga Λ , **6** – *Arthrospira platensis* PCC9438, **8** – *Arthrospira* sp. PCC 8005, **10** – *Arthrospira* sp. PCC 8006, **12** – *Arthrospira platensis* Paracas P0, **14** – *Arthrospira platensis* PCC 7345, **16** – *Arthrospira fusiformis* CCALA023, **18** – *Arthrospira* sp. PCC 9901, **20** – *Arthrospira* sp. O9.13 F.

ANEKS 2. Fotografia 21. Zdjęcie rozdziału elektroforetycznego na żelu agarozowym analizy restrykcyjnej z użyciem enzymu *Eco88I*.



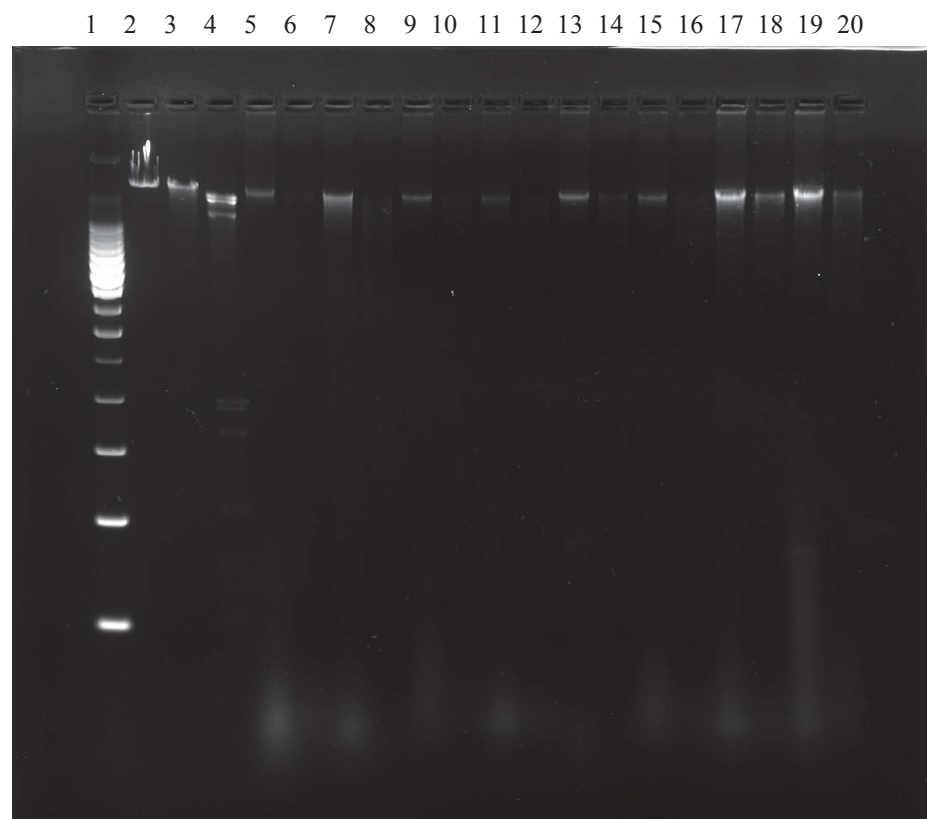
Rozdział elektroforetyczny wykonano w 1,2% żelu agarozowym. **1** – wzorzec masowy 500 bp; na ścieżki oznaczone 2, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 nanoszono 2 µl genomowego DNA: **2** – DNA faga Λ , **5** – *Arthrospira platensis* PCC9438, **7** – *Arthrospira* sp. PCC 8005, **9** – *Arthrospira* sp. PCC 8006, **11** – *Arthrospira platensis* Paracas P0, **13** – *Arthrospira platensis* PCC 7345, **15** – *Arthrospira fusiformis* CCALA023, **17** – *Arthrospira* sp. PCC 9901, **19** – *Arthrospira* sp. O9.13 F; na ścieżkę **3** naniesiono kontrolę negatywną – DNA faga lambda inkubowane z buforem enzymu restrykcyjnego; na ścieżki 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 naniesiono 20 µl mieszaniny reakcyjnej z enzymem *Eco88I*: **4** – DNA faga Λ , **6** – *Arthrospira platensis* PCC9438, **8** – *Arthrospira* sp. PCC 8005, **10** – *Arthrospira* sp. PCC 8006, **12** – *Arthrospira platensis* Paracas P0, **14** – *Arthrospira platensis* PCC 7345, **16** – *Arthrospira fusiformis* CCALA023, **18** – *Arthrospira* sp. PCC 9901, **20** – *Arthrospira* sp. O9.13 F.

ANEKS 2. Fotografia 22. Zdjęcie rozdziału elektroforetycznego na żelu agarozowym analizy restrykcyjnej z użyciem enzymu *Hin*1I.



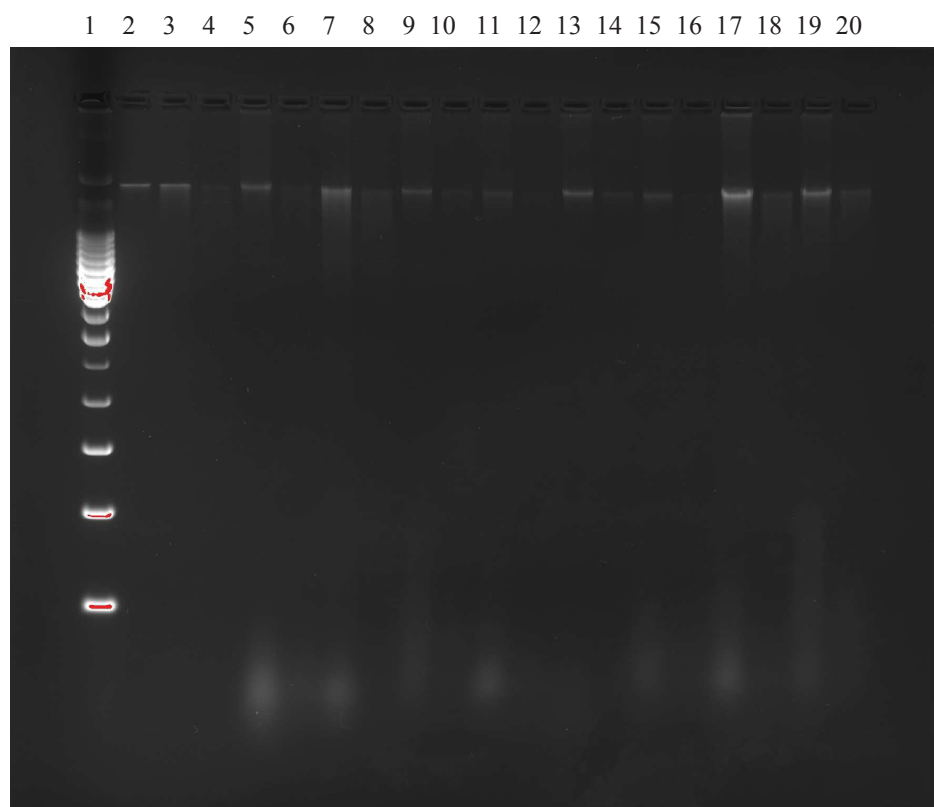
Rozdział elektroforetyczny wykonano w 1,2% żelu agarozowym. **1** – wzorzec masowy 500 bp; na ścieżki oznaczone **2, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19** nanoszono 2 µl genomowego DNA: **2** – DNA faga Λ , **5** – *Arthrospira platensis* PCC9438, **7** – *Arthrospira* sp. PCC 8005, **9** – *Arthrospira* sp. PCC 8006, **11** – *Arthrospira platensis* Paracas P0, **13** – *Arthrospira platensis* PCC 7345, **15** – *Arthrospira fusiformis* CCALA023, **17** – *Arthrospira* sp. PCC 9901, **19** – *Arthrospira* sp. O9.13 F; na ścieżkę **4** naniesiono kontrolę negatywną – DNA faga lambda inkubowane z buforem enzymu restrykcyjnego; na ścieżki **4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20** naniesiono 20 µl mieszaniny reakcyjnej z enzymem *Hin*1I: **3** – DNA faga Λ , **6** – *Arthrospira platensis* PCC9438, **8** – *Arthrospira* sp. PCC 8005, **10** – *Arthrospira* sp. PCC 8006, **12** – *Arthrospira platensis* Paracas P0, **14** – *Arthrospira platensis* PCC 7345, **16** – *Arthrospira fusiformis* CCALA023, **18** – *Arthrospira* sp. PCC 9901, **20** – *Arthrospira* sp. O9.13 F.

ANEKS 2. Fotografia 23. Zdjęcie rozdziału elektroforetycznego na żelu agarozowym analizy restrykcyjnej z użyciem enzymu *Mph*1103I.



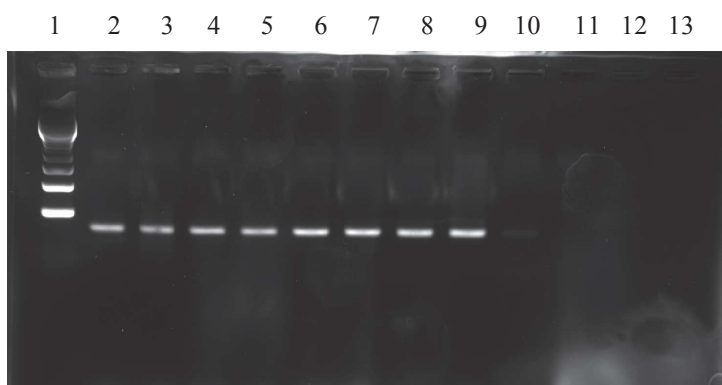
Rozdział elektroforetyczny wykonano w 1,2% żelu agarozowym. **1** – wzorzec masowy 500 bp; na ścieżki oznaczone 2, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 nanoszono 2 µl genomowego DNA: **2** – DNA faga Λ , **5** – *Arthrospira platensis* PCC9438, **7** – *Arthrospira* sp. PCC 8005, **9** – *Arthrospira* sp. PCC 8006, **11** – *Arthrospira platensis* Paracas P0, **13** – *Arthrospira platensis* PCC 7345, **15** – *Arthrospira fusiformis* CCALA023, **17** – *Arthrospira* sp. PCC 9901, **19** – *Arthrospira* sp. O9.13 F; na ścieżkę **3** naniesiono kontrolę negatywną – DNA faga lambda inkubowane z buforem enzymu restrykcyjnego; na ścieżki 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 naniesiono 20 µl mieszaniny reakcyjnej z enzymem ***Mph*1103I**: **4** – DNA faga Λ , **6** – *Arthrospira platensis* PCC9438, **8** – *Arthrospira* sp. PCC 8005, **10** – *Arthrospira* sp. PCC 8006, **12** – *Arthrospira platensis* Paracas P0, **14** – *Arthrospira platensis* PCC 7345, **16** – *Arthrospira fusiformis* CCALA023, **18** – *Arthrospira* sp. PCC 9901, **20** – *Arthrospira* sp. O9.13 F.

ANEKS 2. Fotografia 24. Zdjęcie rozdziału elektroforetycznego na żelu agarozowym analizy restrykcyjnej z użyciem enzymu *NheI*.



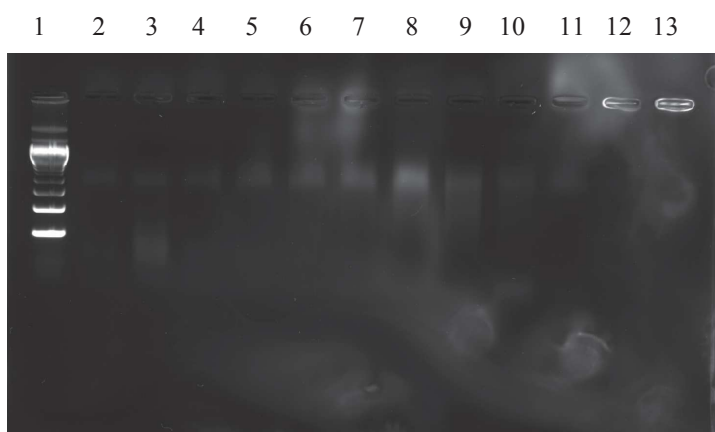
Rozdział elektroforetyczny wykonano w 1,2% żelu agarozowym. **1** – wzorzec masowy 500 bp; na ścieżki oznaczone 2, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 nanoszono 2 µl genomowego DNA: **2** – DNA faga Λ , **5** – *Arthrospira platensis* PCC9438, **7** – *Arthrospira* sp. PCC 8005, **9** – *Arthrospira* sp. PCC 8006, **11** – *Arthrospira platensis* Paracas P0, **13** – *Arthrospira platensis* PCC 7345, **15** – *Arthrospira fusiformis* CCALA023, **17** – *Arthrospira* sp. PCC 9901, **19** – *Arthrospira* sp. O9.13 F; na ścieżkę **3** naniesiono kontrolę negatywną – DNA faga lambda inkubowane z buforem enzymu restrykcyjnego; na ścieżki 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 naniesiono 20 µl mieszaniny reakcyjnej z enzymem *NheI*: **4** – DNA faga Λ , **6** – *Arthrospira platensis* PCC9438, **8** – *Arthrospira* sp. PCC 8005, **10** – *Arthrospira* sp. PCC 8006, **12** – *Arthrospira platensis* Paracas P0, **14** – *Arthrospira platensis* PCC 7345, **16** – *Arthrospira fusiformis* CCALA023, **18** – *Arthrospira* sp. PCC 9901, **20** – *Arthrospira* sp. O9.13 F.

ANEKS 2. Fotografia 25. Rozdział elektroforetyczny amplifikacji DNA wyizolowanego z suplementów diety *Arthrospira* z Indii oraz Mongolii regionów ITS I.A.



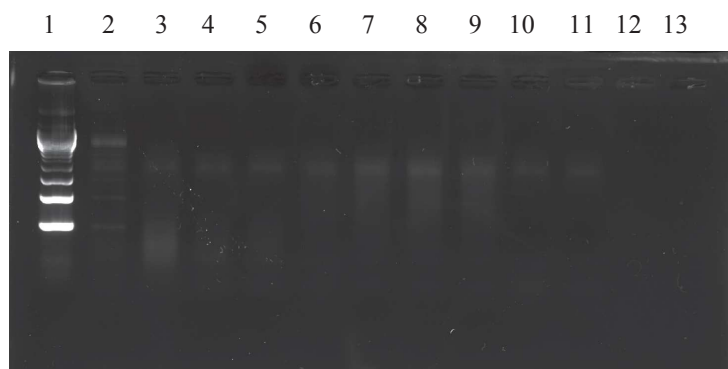
Rozdział elektroforetyczny wykonano w 1,0% żelu agarozowym. **1** – wzorzec masowy 500 bp; na ścieżki oznaczone 2-10 nanoszono 10 µl produktu PCR: **2** – Indie 1, **3** – Indie 2, **4** – Indie 3, **5** – Indie 4, **6** – Mongolia 1, **7** – Mongolia 2, **8** – Mongolia 3, **9** – Mongolia 4, **10** – Kontrola pozytywna *Arthrospira platensis* PCC 9438, **11** – kontrola negatywna.

ANEKS 2. Fotografia 26. Rozdział elektroforetyczny amplifikacji DNA wyizolowanego z suplementów diety *Arthrospira* z Indii oraz Mongolii regionów ITS I.B.



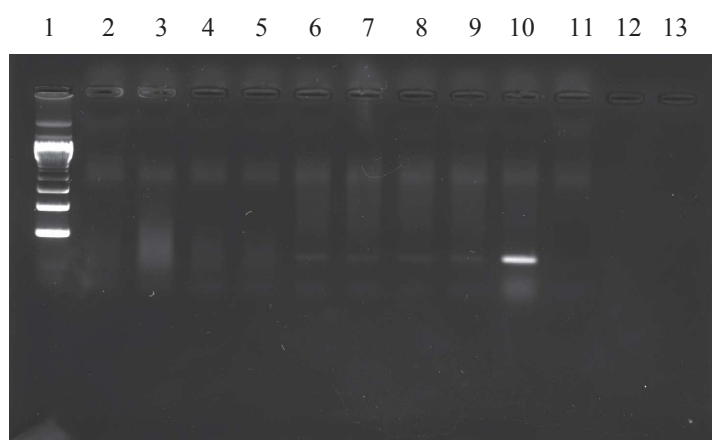
Rozdział elektroforetyczny wykonano w 1,0% żelu agarozowym. **1** – wzorzec masowy 500 bp; na ścieżki oznaczone 2-10 nanoszono 10 µl produktu PCR: **2** – Indie 1, **3** – Indie 2, **4** – Indie 3, **5** – Indie 4, **6** – Mongolia 1, **7** – Mongolia 2, **8** – Mongolia 3, **9** – Mongolia 4, **10** – Kontrola pozytywna *Arthrospira* sp. PCC 8005, **11** – kontrola negatywna.

ANEKS 2. Fotografia 27. Rozdział elektroforetyczny amplifikacji DNA wyizolowanego z suplementów diety *Arthrospira* z Indii oraz Mongolii regionów ITS II.A.



Rozdział elektroforetyczny wykonano w 1,0% żelu agarozowym. **1** – wzorzec masowy 500 bp; na ścieżki oznaczone 2-10 nanoszono 10 µl produktu PCR: **2** – Indie 1, **3** – Indie 2, **4** – Indie 3, **5** – Indie 4, **6** – Mongolia 1, **7** – Mongolia 2, **8** – Mongolia 3, **9** – Mongolia 4, **10** – Kontrola pozytywna *Arthrospira* sp. CCALA030, **11** – kontrola negatywna.

ANEKS 2. Fotografia 28. Rozdział elektroforetyczny amplifikacji DNA wyizolowanego z suplementów diety *Arthrospira* z Indii oraz Mongolii regionów ITS II.B.



Rozdział elektroforetyczny wykonano w 1,0% żelu agarozowym. **1** – wzorzec masowy 500 bp; na ścieżki oznaczone 2-10 nanoszono 10 µl produktu PCR: **2** – Indie 1, **3** – Indie 2, **4** – Indie 3, **5** – Indie 4, **6** – Mongolia 1, **7** – Mongolia 2, **8** – Mongolia 3, **9** – Mongolia 4, **10** – Kontrola pozytywna *Arthrospira fusiformis* CCALA023, **11** – kontrola negatywna.

ANEKS 2. Fotografia 29. Rozdział elektroforetyczny amplifikacji DNA wyizolowanego z suplementów diety *Arthrospira* z Indii oraz Mongolii regionów ITS III.



Rozdział elektroforetyczny wykonano w 1,0% żelu agarozowym. **1** – wzorzec masowy 500 bp; na ścieżki oznaczone 2-7 nanoszono 10 µl produktu PCR: **2** – Indie 2, **3** – Indie 4, Mongolia 3, **5** – Mongolia 4, **6** – Kontrola pozytywna *Arthrospira* sp. PCC 9901, **7** – kontrola negatywna.

ANEKS 3. Tabela 1. Zmiana ekspresji genów szczepu *Arthrospira* sp. PCC 8005 poddanego działaniu promieniowania gamma w dawce 3200 Gy i 5000 Gy, FC - fold change; PV - p-value; ig - region międzygenowy (ang. Intergenic Region). Kolor zielony oznacza supresję genu, kolor czerwony nadekspresję względem kontroli.

	<i>gen</i>	<i>ORF Arthrospira sp. PCC 8005</i>	<i>T_FC_3200Gy</i>	<i>T_PV_3200Gy</i>	<i>T_FC_5000Gy</i>	<i>T_PV_5000Gy</i>
geny systemów R-M typu II	<i>AsuIIM</i>	ARTHROv5_10253	-0,169040923	0,60071712	-0,025085962	0,936732433
	<i>AsuIIR</i>	ARTHROv5_10254	0,101949997	0,704027064	0,264606408	0,218750378
	<i>AvaIIIR</i>	ARTHROv5_10379	0,254199485	0,606810528	-0,306593963	0,458470042
	<i>AvaIIIR</i>	ARTHROv5_10380	-0,070691228	0,860220797	0,172647046	0,558591499
	<i>AvaIIIM</i>	ARTHROv5_10381	-0,623430141	0,152281253	-0,14622352	0,717109776
	<i>NheIM</i>	ARTHROv5_10855	0,427983455	0,72600083	0,712580909	0,459079178
	<i>NheIR</i>	ARTHROv5_10857	-0,352355448	0,778516087	0,139837519	0,897245057
	<i>SplIR</i>	ARTHROv5_11169	-1,089729283	0,266990498	1,073386047	0,218790401
	<i>SplIM</i>	ARTHROv5_11170	-1,330881839	0,431944089	1,256100762	0,394084187
	<i>HindIIIM</i>	ARTHROv5_11224	-0,568146798	0,23061455	-0,058557749	0,90232124
	<i>HindIIIR</i>	ARTHROv5_11225	-0,087307076	0,866181476	0,077785395	0,849358699
	<i>HgiCIM</i>	ARTHROv5_40640	0,762072509	0,112925536	0,557034767	0,187285665
	<i>HgiCIR</i>	ARTHROv5_40641	-0,752010299	0,201503843	-0,045495673	0,940270902
	<i>BinIR</i>	ARTHROv5_60389	-0,127498725	0,84379776	-1,489668538	0,008238633
	<i>MboIR</i>	ARTHROv5_60398	-0,301269545	0,635965499	-0,924175713	0,088563186
	<i>AvaIR</i>	ARTHROv5_60568	0,446116866	0,289098957	0,297264548	0,422854352
	<i>AvaIR</i>	ARTHROv5_60569	0,477876482	0,451713091	1,207318496	0,040996661
	<i>AvaIM</i>	ARTHROv5_60570	0,541944452	0,421802469	1,773460755	0,010100149
	<i>AcyIM</i>	ARTHROv5_60966	0,05986536	0,889722352	-0,250900372	0,409934427
	<i>AcyIR</i>	ARTHROv5_60967	-0,583077775	0,423772373	0,259592274	0,696472016

geny CRISPR/Cas	<i>gen</i>	<i>ORF Arthrospira sp. PCC 8005</i>	<i>T_FC_3200Gy</i>	<i>T_PV_3200Gy</i>	<i>T_FC_5000Gy</i>	<i>T_PV_5000Gy</i>
	<i>cas1.3</i>	ARTHROv5_11910	2,003965039	0,134517757	-0,341613093	0,78548822
	<i>cas1.3</i>	ARTHROv5_11910_ARTHROv5_11911_ig	0,826886108	0,22318778	-0,171554763	0,790325784
	<i>cas1.3</i>	ARTHROv5_11911	0,098972012	0,872611856	0,009578854	0,98547484
	<i>cmr6</i>	ARTHROv5_11916	-0,932858359	0,183271022	0,064993026	0,928046361
	<i>cmr4</i>	ARTHROv5_11918	-0,377544832	0,704558962	-0,082578115	0,928491792
	<i>cmr4</i>	ARTHROv5_11920	-0,081161925	0,962805226	-1,176507643	0,300356711
	<i>cmr2</i>	ARTHROv5_11922	0,877491232	0,087540492	-0,007141863	0,988942142
	<i>cas2.2</i>	ARTHROv5_40675_ARTHROv5_40676_ig	2,711654131	0,013743083	1,93945497	0,031204271
	<i>cas2.1</i>	ARTHROv5_40676	2,757699029	0,004902025	1,740591926	0,020548412
	<i>cas1.2</i>	ARTHROv5_40678	1,885168913	0,02737537	1,165125354	0,098917618
	<i>cas1.1</i>	ARTHROv5_40678_ARTHROv5_40679_ig	0,285468176	0,408597611	0,216917325	0,473571403
	<i>csm3</i>	ARTHROv5_40690	0,701124631	0,261061891	1,807497569	0,00668177
	<i>csm3</i>	ARTHROv5_40690_ARTHROv5_40691_ig	0,744320671	0,605563396	2,360684431	0,062538548
	<i>csx10</i>	ARTHROv5_40692	0,734100311	0,15421149	0,858853817	0,070381312
	<i>csm3</i>	ARTHROv5_40693	0,352503017	0,4715652	0,797768746	0,071219124
	<i>cmr2</i>	ARTHROv5_40694	0,870521621	0,136009486	1,440316607	0,013823144
	<i>csm5</i>	ARTHROv5_40716	0,522107672	0,416063242	1,189140336	0,046792742
	<i>csm4</i>	ARTHROv5_40717	0,640650314	0,183271022	1,403955813	0,006495736
	<i>csm3</i>	ARTHROv5_40718	0,368546751	0,693264453	1,992437033	0,017953012
	<i>csm2</i>	ARTHROv5_40719	0,122480769	0,921895677	2,849215968	0,005916005
	<i>csm2</i>	ARTHROv5_40719_ARTHROv5_40720_ig	1,199533289	0,033775695	2,25321838	0,000792064
	<i>csm1</i>	ARTHROv5_40720	0,331956451	0,467556178	0,089360228	0,836303422
	<i>csm1</i>	ARTHROv5_40720_ARTHROv5_40721_ig	0,178273006	0,75356875	0,631754559	0,157659299

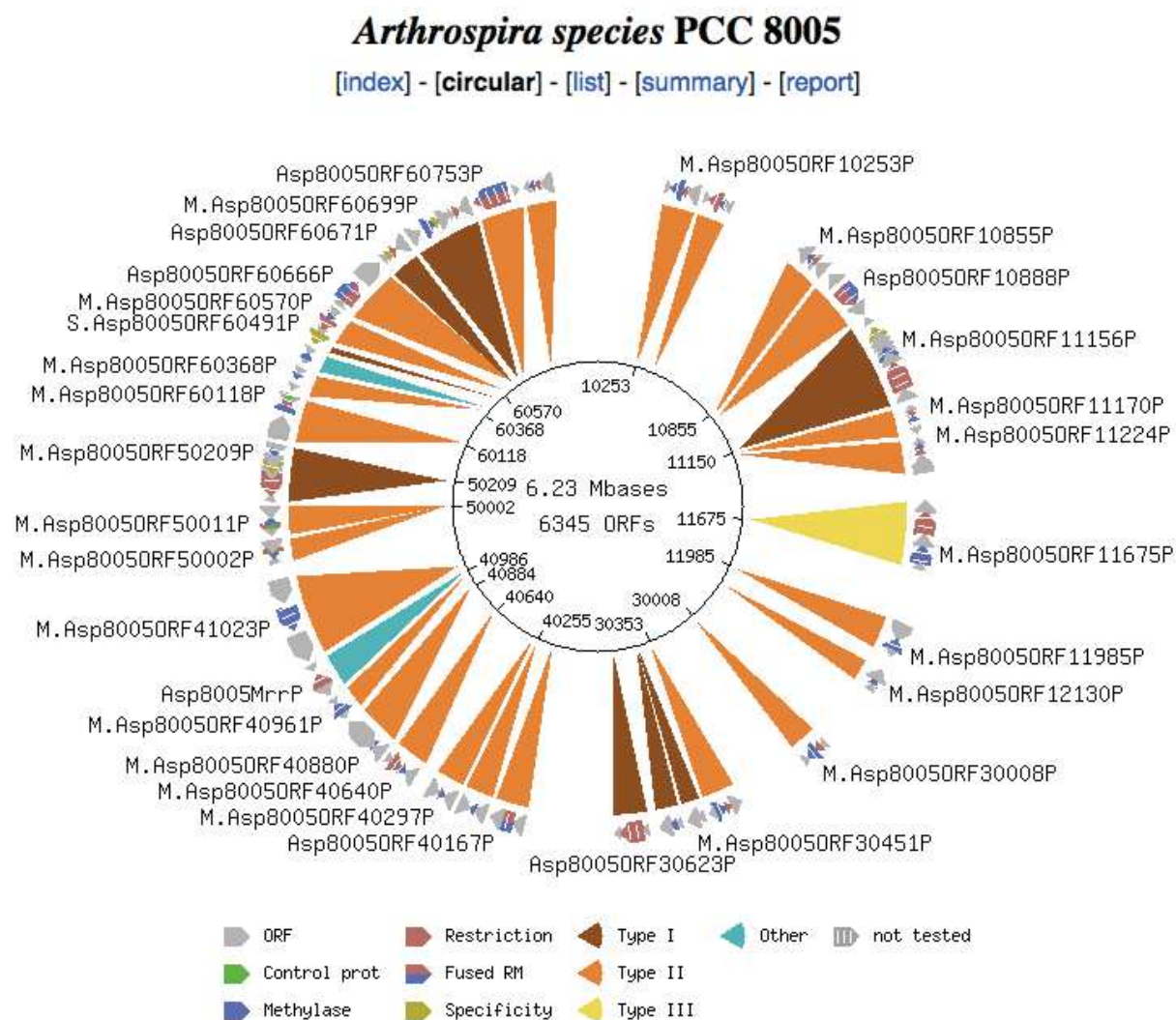
ANEKS 4. Tabela 1. Charakterystyka morfologiczna, biochemiczna i genetyczna 45 izolatów bakteryjnych uzyskanych z siedmiu preparatów z suchą biomasą *Arthrospira* dostępnych na polskim rynku, n/w – nie wykonano.

Nr izolatu	Akronim	Pochodzenie (firma produkująca, kraj)	Wzrost na podłożu z ksylozą	Wzrost na podłożu z ramnozą	Wzrost na podłożu MYP Agar	Wzrost na podłożu MacConkeya	Wzrost na podłożu Chapmana	Wzrost na podłożu Halomonas Medium	Obraz w barwieniu Grama	Analiza sekwencyjna fragmentu 16S rRNA
1	CHIN 1	Biogate Polden, Chiny	+	+	n/w	-	+	+	Gram (+) laseczki	85,3% <i>Bacillus horkoshii</i> strain FJAT-29190
2	CHIN 2	Biogate Polden, Chiny	+	+	n/w	-	+	+	Gram (+) laseczki	74,2% <i>Bacillus</i> sp. NT N86
3	CHIN 3	Biogate Polden, Chiny	+	+	n/w	-	+	+	Gram (-) pałeczka	64,3% <i>Rhodobaca barguzinensis</i> VKM B-2406
4	CHIN 4	Biogate Polden, Chiny	+	+	n/w	-	+	+	nieokreślony	99,5% <i>Roseinatronobacter</i> sp. LC05P24
5	CHIN 5	Biogate Polden, Chiny	+	+	n/w	-	+	+	Gram (-) pałeczki	99,6% <i>Roseinatronobacter</i> sp. LC05P24
6	CHIN 6	Biogate Polden, Chiny	+	+	n/w	-	+	+	Gram (-) pałeczki	88,6% <i>Roseinatronobacter</i> sp. MOL1.10
7	CHIN 7	Biogate Polden, Chiny	+	+	n/w	-	+	+	Gram (+) laseczki	98% <i>Bacillus pseudofirmus</i>
8	CHIN 8	Biogate Polden, Chiny	+	+	n/w	-	+	+	Gram (+) laseczki	99,8% <i>Bacillus</i> sp. LCP66
9	US 1	Cyanotech, USA	+	+	n/w	-	+	+	Gram (+) laseczki	93% <i>Bacillus agaradhaerens</i> strain NPST-R/ <i>Bacillus</i> sp. S2
10	US 2	Cyanotech, USA	+	+	n/w	-	+	+	Gram (-) laseczki	99,0% <i>Bacillus pseudofirmus</i> MM4
11	US 3	Cyanotech, USA	+	+	n/w	-	+	+	Gram (+) laseczki	99,8% <i>Bacillus agaradhaerens</i> FJAT-44719
12	US 4	Cyanotech, USA	+	+	n/w	-	+	+	Gram (+) laseczki	88,2 % <i>Bacillus</i> sp. MAR809
13	US 5	Cyanotech, USA	+	+	n/w	-	-	+	Gram (+) pałeczki	87,8 % <i>Roseinatronobacter</i> sp. MOL1.10
14	MON 1	Norland, Mongolia	+	+	n/w	-	+	+	Gram (+) pałeczki	93,7% <i>Roseinatronobacter</i> sp. LC05P24
15	MON 2	Norland, Mongolia	+	+	n/w	-	-	+	Gram (+) laseczki	69,3% <i>Roseinatronobacter</i> sp. LC05P24

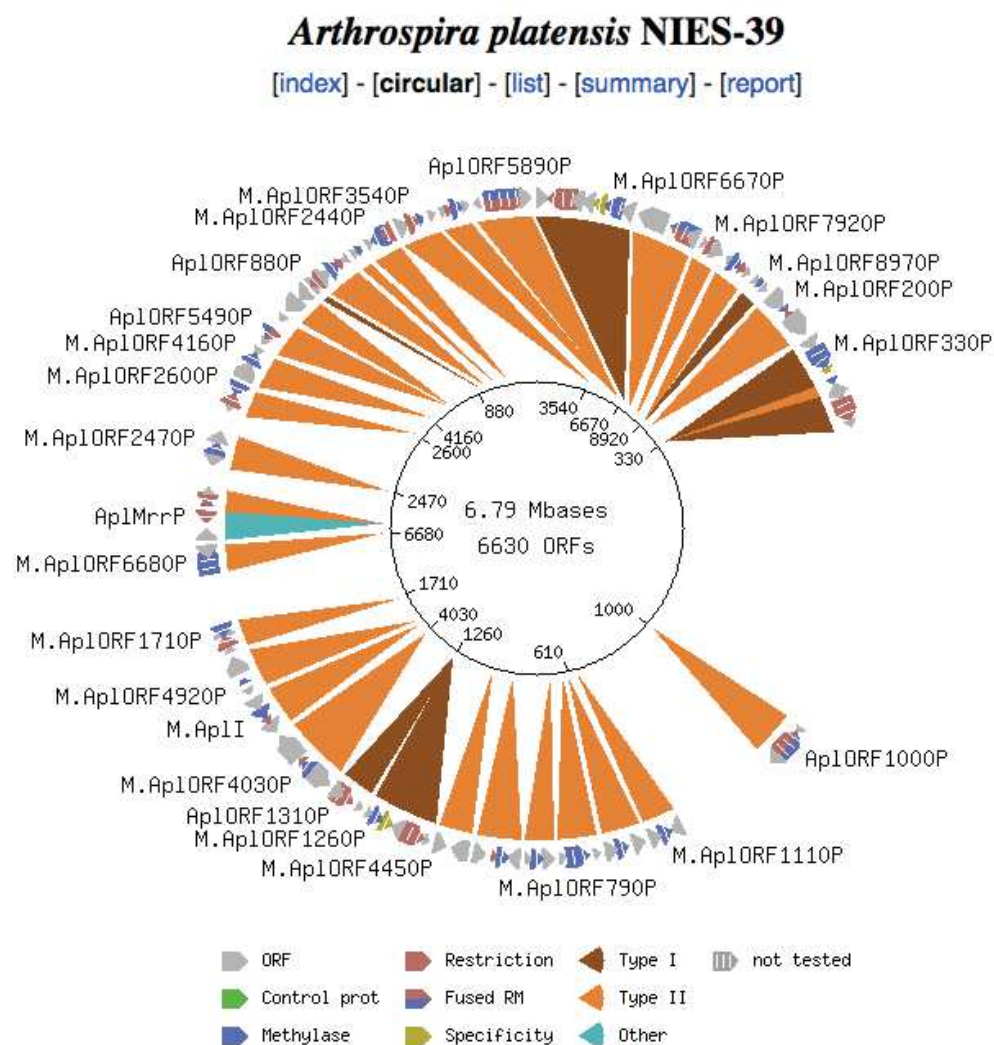
<i>Nr izolatu</i>	<i>Akronim</i>	<i>Pochodzenie (firma produkująca, kraj)</i>	<i>Wzrost na podłożu z ksylozą</i>	<i>Wzrost na podłożu z ramnozą</i>	<i>Wzrost na podłożu MYP Agar</i>	<i>Wzrost na podłożu MacConkeya</i>	<i>Wzrost na podłożu Chapmana</i>	<i>Wzrostu na podłożu Halomonas medium</i>	<i>Obraz w barwieniu Grama</i>	<i>Analiza sekwencyjna fragmentu 16S rRNA</i>
16	MON 3	Norland, Mongolia	+	+	n/w	-	+	+	Gram (+) laseczki	98,9% <i>Bacillus sp.</i> LCP66
17	MON 4	Norland, Mongolia	+	+	n/w	-	+	+	Gram (+) laseczki	99,8% <i>Bacillus sp.</i> G47
18	MON 5	Norland, Mongolia	+	+	n/w	-	+	+	nieokreślony	99,9% <i>Bacillus sp.</i> JAMB-602
19	IND A1	Parry Nutraceuticals, Indie	+	+	+	n/w	+	+	Gram (-) pałeczki	98,4% Uncultured bacterium clone TX1A_64
20	IND A2	Parry Nutraceuticals, Indie	+	+	+	n/w	+	+	Gram (-) pałeczki	98,6% <i>Halomonas sp.</i> Ap-5
21	IND A3	Parry Nutraceuticals, Indie	+	+	+	n/w	+	+	Gram (-) pałeczki	97,2% Uncultured bacterium clone TX1A_64
22	IND B1	Parry Nutraceuticals, Indie	+	+	+	n/w	+	+	Gram (-) pałeczki	99,3% <i>Halomonas sp.</i> Ap-5
23	IND B2	Parry Nutraceuticals, Indie	+	+	+	n/w	+	+	Gram (-) pałeczki	97% <i>Halomonas sp.</i> Ap-5
24	IND B3	Parry Nutraceuticals, Indie	+	+	+	n/w	+	+	Gram (-) pałeczki	98,7% <i>Halomonas sp.</i> Ap-5
25	IND C1	Parry Nutraceuticals, Indie	+	+	+	n/w	+	+	Gram (-) pałeczki	97,7% <i>Halomonas sp.</i> Ap-5
26	IND C2	Parry Nutraceuticals, Indie	+	+	+	n/w	+	+	Gram (-) pałeczki	99,0% <i>Halomonas sp.</i> Ap-5
27	IND C3	Parry Nutraceuticals, Indie	+	+	+	n/w	+	+	Gram (-) pałeczki	99,0% <i>Halomonas sp.</i> Ap-5
28	IND D1	Parry Nutraceuticals, Indie	+	+	+	n/w	+	+	Gram (-) pałeczki	94,6% Uncultured bacterium clone TX1A_64

<i>Nr izolatu</i>	<i>Akronim</i>	<i>Pochodzenie (firma produkująca, kraj)</i>	<i>Wzrost na podłożu z ksylozą</i>	<i>Wzrost na podłożu z ramnozą</i>	<i>Wzrost na podłożu MYP Agar</i>	<i>Wzrost na podłożu MacConkeya</i>	<i>Wzrost na podłożu Chapmana</i>	<i>Wzrostu na podłożu Halomonas medium</i>	<i>Obraz w barwieniu Grama</i>	<i>Analiza sekwencyjna fragmentu 16S rRNA</i>
29	IND D3	Parry Nutraceuticals, Indie	+	+	+	n/w	+	+	Gram (-) pałeczki	97,3% Halomonas sp. LAR05P7
30	PAK A2	Green Essence, Pakistan	+	+	+	n/w	+	+	Gram (-) pałeczki	99,1% Halomonas sp. Ap-5
31	PAK A3	Green Essence, Pakistan	+	+	+	n/w	+	+	Gram (-) pałeczki	95,0% Halomonas sp. LAR05P7
32	PAK B1	Green Essence, Pakistan	+	+	+	n/w	+	+	Gram (-) pałeczki	99,7% Uncultured bacterium clone TX1A_64
33	PAK B2	Green Essence, Pakistan	+	+	+	n/w	+	+	Gram (+) pałeczki	96,9% Uncultured bacterium clone TX1A_64
34	PAK B3	Green Essence, Pakistan	+	+	+	n/w	+	+	Gram (+) pałeczki	97,2% Halomonas sp. Ap-5
35	PAK C1	Green Essence, Pakistan	+	+	+	n/w	+	+	Gram (+) pałeczki	98,2% Halomonas sp. LAR05P7
36	PAK C2	Green Essence, Pakistan	+	+	+	n/w	+	+	Gram (-) pałeczki	93,8% Halomonas campaniensis strain HN22
37	PAK C3	Green Essence, Pakistan	+	+	+	n/w	+	+	Gram (-) pałeczki	99,1% Halomonas sp. Ap-5
38	PAK D1	Green Essence, Pakistan	+	+	+	n/w	+	+	Gram (-) pałeczki	99,0% Halomonas sp. Ap-5
39	PAK D2	Green Essence, Pakistan	+	+	+	n/w	+	+	Gram (-) pałeczki	98,8% Halomonas sp. Ap-5
40	PAK D3	Green Essence, Pakistan	+	+	+	n/w	+	+	Gram (-) pałeczki	98,2% Halomonas sp. Ap-5
41	TAJ A2	Febico, Tajwan	+	+	+	n/w	+	+	Gram (-) pałeczki	99,1% Halomonas sp. Ap-5
42	TAJ A3	Febico, Tajwan	+	+	+	n/w	+	+	Gram (-) pałeczki	99,7% Uncultured bacterium clone TX1A_64
43	TAJ B1	Febico, Tajwan	+	+	+	n/w	+	+	Gram (-) pałeczki	98,2% Halomonas sp. Ap-5
44	TAJ B2	Febico, Tajwan	+	+	+	n/w	+	+	Gram (-) pałeczki	99,0% Halomonas sp. Ap-5
45	TAJ C3	Febico, Tajwan	+	+	+	n/w	+	+	Gram (-) pałeczki	98,9% Halomonas sp. Ap-5

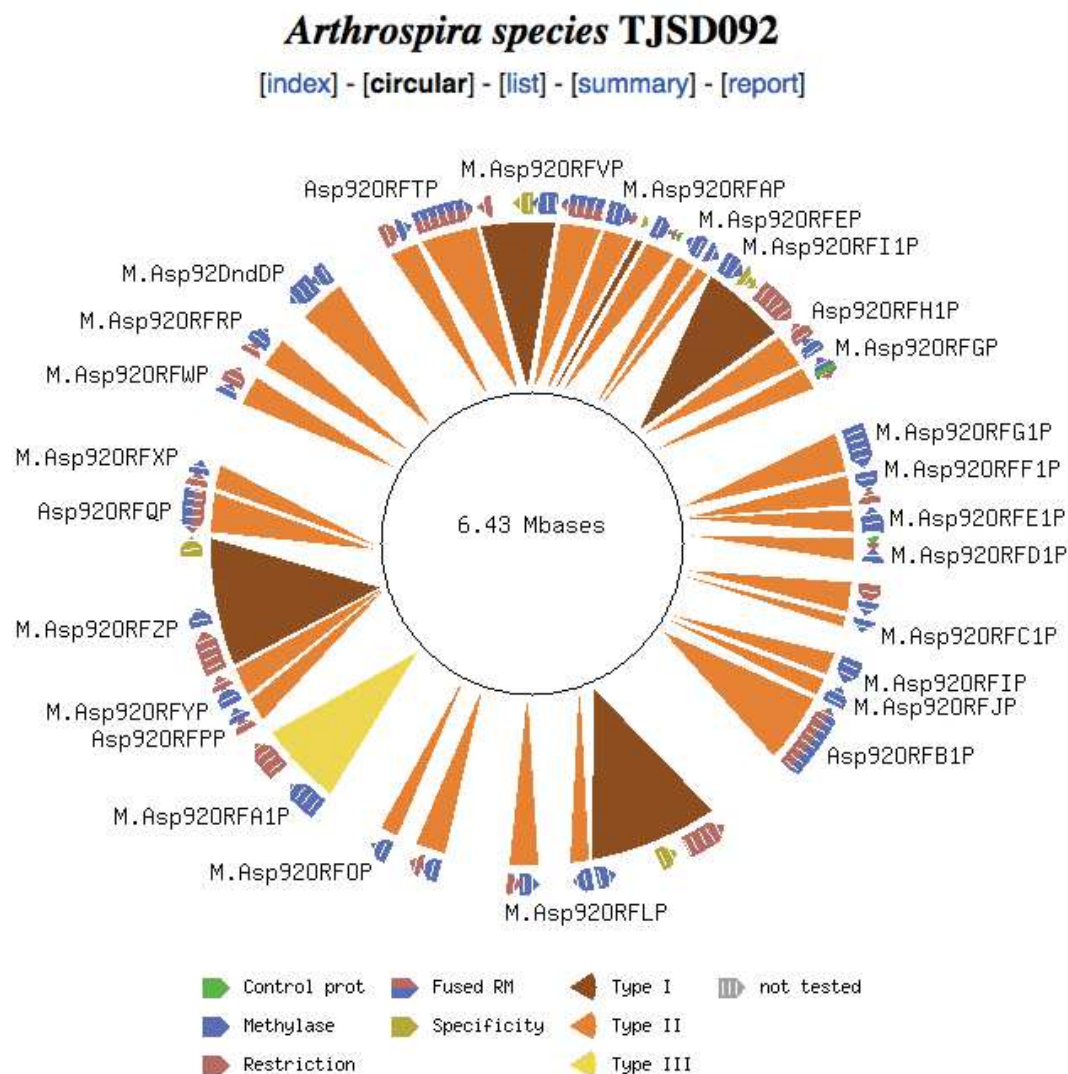
ANEKS 5. Rycina 1. Graficzne przedstawienie zidentyfikowanych elementów systemów R-M wygenerowane z wykorzystaniem platformy REBASE dla genomu *Arthrospira* sp. PCC 8005. Kolor szary przedstawia zidentyfikowane ORF o niskim podobieństwie, hipotetyczny element R-M; zielony – białka regulatorowe; niebieski – metylotransferazy; różowy endonukleazy; różowo-niebieski – metylotransferazę wraz z endonukleazą; zielono-żółty – białka specyficzności; brązowy – R-M typu I; pomarańczowy – R-M typu II; żółty – R-M typu III; błękitny – inne struktury.



ANEKS 5. Rycina 2. Graficzne przedstawienie zidentyfikowanych elementów systemów R-M wygenerowane z wykorzystaniem platformy REBASE dla genomu *Arthrospira platensis* NIES-39. Kolor szary przedstawia zidentyfikowane ORF o niskim podobieństwie, hipotetyczny element R-M; zielony – białka regulatorowe; niebieski – metylotransferazy; różowy endonukleazy; różowo-niebieski – metylotransferazę wraz z endonukleazą; zielono-żółty – białka specyficzności; brązowy – R-M typu I; pomarańczowy – R-M typu II; żółty – R-M typu III; błękitny – inne struktury.



ANEKS 5. Rycina 3. Graficzne przedstawienie zidentyfikowanych elementów systemów R-M wygenerowane z wykorzystaniem platformy REBASE dla genomu *Arthrospira* sp. TJSD092. Kolor szary przedstawia zidentyfikowane ORF o niskim podobieństwie, hipotetyczny element R-M; zielony – białka regulatorowe; niebieski – metylotransferazy; różowy endonukleazy; różowo-niebieski – metylotransferazę wraz z endonukleazą; zielono-żółty – białka specyficzności; brązowy – R-M typu I; pomarańczowy – R-M typu II; żółty – R-M typu III; błękitny – inne struktury.



ANEKS 5. Rycina 4. Graficzne przedstawienie zidentyfikowanych elementów systemów R-M wygenerowane z wykorzystaniem platformy REBASE dla genomu *Arthrospira platensis* YZ. Kolor szary przedstawia zidentyfikowane ORF o niskim podobieństwie, hipotetyczny element R-M; zielony – białka regulatorowe; niebieski – metylotransferazy; różowy endonukleazy; różowo-niebieski – metylotransferazę wraz z endonukleazą; zielono-żółty – białka specyficzności; brązowy – R-M typu I; pomarańczowy – R-M typu II; żółty – R-M typu III; błękitny – inne struktury.

Arthrospira platensis YZ

[index] - [circular] - [list] - [summary] - [report]

