

ZDZISŁAW SIKORA

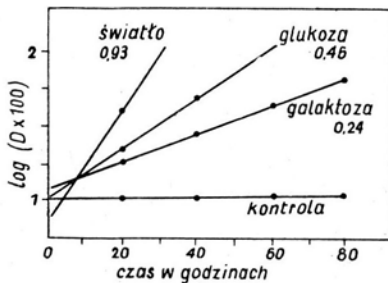
## HETEROTROFICZNY WZROST GLONÓW

Zielone glony, w tym liczne gatunki z rodzaju *Scenedesmus* i *Chlorella*, posiadają sprawnie działający aparat fotosyntetyczny i na świetle wykorzystują  $\text{CO}_2$  do syntezy związków organicznych. Jednakże w ciemności, czy też w słabym oświetleniu lub przy deficycie  $\text{CO}_2$  większość z nich może wzrastać na organicznych źródłach węgla. Są one heterotrofami względnymi, bowiem w zależności od warunków bytowania mogą być tak auto- jak i heterotrofami i łatwo przechodzą z jednej formy odżywiania w drugą. Mówiąc o wymaganiach odżywczych tych organizmów traktujemy nie tyle o konieczności dostarczenia im połączeń organicznych, co o zdolności wykorzystania przez nie tych związków.

### Charakterystyka heterotroficznego wzrostu glonów

Najpełniejsze dane posiadamy o wykorzystaniu przez glony węglowodanów i ich pochodnych, jak również o charakterze asymilacji i dysasymilacji tych związków. W hodowlach glonów w ciemności węglowodany stosuje się jako źródło węgla i energii. Ze wszystkich substancji organicznych węglowodany są wykorzystywane w największym stopniu, dlatego omówienie cech heterotroficznego wzrostu glonów ograniczymy do tych związków.

Dla większości heterotroficznych organizmów glukoza jest związkiem najlepiej wykorzystywanym (ryc. 1), dlatego w badaniach nad ich wymaganiami odżywczymi stosuje się ją jako pierwsze próbne źródło węgla. Istnieje problem czy wszystkie



Rys. 1. Krzywa wzrostu *Chlorella pyrenoidosa* mierzona gęstością optyczną (D). Wzrost w  $25^\circ\text{C}$  przy przewietrzaniu 5%  $\text{CO}_2$ , na świetle, w ciemności (kontrola) i w ciemności z dodatkiem cukrów. Liczby obok krzywych reprezentują przyrost kultury w jednostce czasu. (Samejima i Myers 1958)

podobne, zbliżone budową związki są równie dobrze przyswajalne. Glukoza, mannoza i fruktoza posiadają podobną budowę pomiędzy 3 a 6 atomem łańcucha węglowego. Ponadto w słabo zasadowych roztworach, a więc w pH niefizjologicznym, przechodzą one w siebie wzajemnie poprzez wspólną enolową formę. Mimo tego związki te nie są przyswajalne w równym stopniu poprzez poszczególne gatunki mikroorganizmów. W wypadku oligosacharydów charakter wiązania glikozydowego oraz reszty cukrowe mogą mieć wpływ na przyswajanie ich przez heterotrofy.

Tabela 1

Wykorzystanie cukrów i związków pochodnych przez glony w ciemności

Substraty	<i>Chlorella vulgaris</i> , (1)	<i>Chlorella pyrenoidosa</i> (2)	<i>Chlorella ellipsoidea</i> (2)	<i>Chlorella vulgaris</i> (3)	<i>Chlorella</i> sp. szczep 620 (3)	<i>Scenedesmus</i> sp. szczep D <sub>3</sub> (2)	<i>Scenedesmus</i> uszczep 449 (4)	<i>Scenedesmus</i> uszczep 633 (4)
glukoza	+	+	+	+	+	+	+	+
fruktoza	+	?	?	+	+	+	—	—
galaktoza	+	+	+	?	—	+	+	—
mannoza	—	—	—	—	+	+	+	+
ksyloza	—	?	?	—	—	—	—	—
arabinoza	—	?	?	—	—	—	?	—
ryboza	—	—	—	?	—	—	—	—
sacharoza	—	—	—	+	+	+	+	+
maltoza	—	?	?	+	+	+	+	+
laktoza	+	—	—	?	+	+	+	+
cellobioza	+	—	—	—	—	—	—	—
mannitol	—	—	—	—	—	—	?	+
glicerol	—	—	—	?	—	—	?	+
dekstryny	—	—	—	—	—	—	+	+
skrobia	—	—	—	—	—	—	?	+
aldehyd glicerynowy	—	—	—	—	—	—	—	—
dwuhydroksy-aceton	—	—	—	—	—	—	—	—
glukozy-1-fosforan	—	—	—	—	—	—	—	—
glukozy-6-fosforan	—	—	—	—	—	—	—	—
fruktozy fosforan	—	—	—	—	—	—	—	—
fruktozy-1,6-dwufosf.	—	—	—	—	—	—	—	—

Klucz: + wzrost obecny, — brak wzrostu, ? wzrost wątpliwy.

1. Neish, 1951, 2. Samejima i Myers, 1958, 3. Sikora i Wierna, 1966 i Sikora, 1967, 4. Sikora i Wierna, 1965.

Tabela 1 przedstawia dane z szeregu źródeł odnośnie heterotroficznego wzrostu szeregu gatunków *Chlorella* i *Scenedesmus* na cukrach i związkach pochodnych. Wszystkie badane organizmy charakteryzują się wykorzystaniem glukozy, chociaż pewne szczepy *Chlorella vulgaris* nie są zdolne do wzrostu na tym cukrze (Finkle i wsp. 1950, Awiłow 1965). Dla grzybów glukoza jest również uniwersalnym źródłem węgla, lecz np. *Diplodia macrospora* rośnie tylko na dwucukrach, nie wzrastając na podłożach z glukozą lub innymi heksozami. Wilson (1942) stwierdził, że w obecności biotyny cukry proste mogą być wykorzystane przez ten grzyb. Dlatego przy braku wzrostu na jakimś substracie organicznym nie można wyciągać wniosku, że jest on nieprzyswajalny, bowiem za nieobecność wzrostu odpowiedzialny może być brak jakiegoś czynnika wzrostowego.

Pozostałe cukry tak heksozy, jak i disacharydy, są przyswajalne przez mniejszą liczbę gatunków i nie każdy z nich przyswaja je z tą samą łatwością. Ani jeden z badanych glonów nie wzrastał na pentozach i fosfocukrach oraz na aldehydzie glicerynowym i dwuhydroksyacetonie (triozy). Alkoholocukry wykorzystywane były tylko przez jeden szczep *Scenedesmus*. Związki wysokocząsteczkowe, takie jak dekstryny i skrobia mogą być wykorzystane przez niektóre glony. Jest kwestią niewyjaśnioną czy tak duże cząsteczki mogą wnikać nierozłożone do wnętrza komórek. U grzybów i bakterii stwierdzono wydzielanie do środowiska depolimeraz rozkładających związki wielkocząsteczkowe. Dotychczasowe badania nad enzymatyką glonów nie wykluczają podobnej ewentualności u tej grupy roślin.

Pentozy mogą być wykorzystane przez niektóre glony, jak to podają Griffiths i wsp. (1960) dla *Chlorella vulgaris*, szczep Brannon I (tab. 2).

Reasumując można stwierdzić, że żaden ze związków organicznych nie zapewnia maksimum rozwoju wszystkich organizmów. Zdolność przyswajania danego substratu przez glony jest swoista i charakterystyczna dla danego organizmu.

Tabela 2

Wykorzystanie glukozy na jednostkę przyrostu biomasy *Scenedesmus obliquus* w różnych intensywnościach światła. Hodowla w ciągu 7 dni, temperatura 23°C, pH = 5,5—6,0 (Minjewa 1962).

Intensywność oświetlenia w luksach	Przyrost biomasy w mg/100 ml	Wykorzystanie glukozy w mg na 100 ml	Stosunek wykorzystania glukozy do przyrostu biomasy
0	52	147	2,83
50	141	381	2,70
100	213	468	2,19
300	330	562	1,70
500	440	668	1,52
700	375	565	1,51
2000	450	575	1,28
7000	400	503	1,26

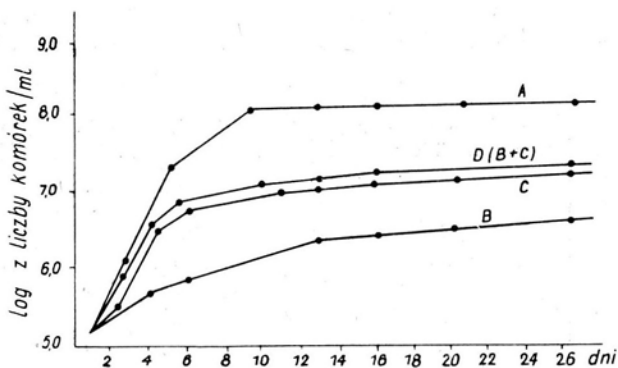
## Czynniki wpływające na wykorzystanie danego substratu

Wykorzystanie związków organicznych w czasie heterotroficznego wzrostu, oprócz omówionego już wpływu rodzaju użytego związku oraz budowy i wielkości jego cząstek, zależy jest od wielu czynników.

Jednym z nich jest światło, które wywiera olbrzymi wpływ na stopień wykorzystania węglowodanów przez glony. Mechanizm tego działania może być różny i zależy jest od natężenia światła (tab. 2) czy też jego składu spektralnego. Z kolei fotosynteza działa konkurencyjnie na proces wykorzystania tych związków z podłoża, a jej przebiegowi towarzyszy synteza różnych związków organicznych niezbędnych do rozwoju roślinnych komórek.

Stosując wzrastające natężenia światła można określić zróżnicowaną zdolność organizmów do heterotroficznego wzrostu w warunkach konkurencyjnego przyswajania dwóch źródeł węgla — organicznego i gazowego. Przy dużych intensywnościach światła glony osiągają maksimum wzrostu i dodatek glukozy pozostaje bez wpływu na jego poziom. Przy obniżaniu intensywności światła obserwuje się względny wzrost zużycia glukozy, tak iż szybkość wzrostu kultur zostaje doprowadzona do maksimum. Przy natężeniu światła 700—2000 luksów ustala się równowaga pomiędzy procesem wykorzystania związków węgla organicznego z podłoża a szybkością fotosyntezy. W tych warunkach szybkość wzrostu kultury rosnącej mikсотroficznie zbliżona jest do sumy szybkości wzrostu auto- i heterotroficznie rosnących kultur.

Na pożywkach z glukozą, przy niskich intensywnościach światła i słabym dostępie  $\text{CO}_2$  kultury glonów przechodzą z mikсотroficznego typu odżywiania na heterotroficzny. W tym typie heterotroficznego wzrostu, gdy światło i  $\text{CO}_2$  są obecne lecz w minimum, wykorzystanie cukrów jest o wiele większe niż w ciemności. Wzrost w tych warunkach nie jest sumą wartości wzrostu na glukozie w ciemności i wartości wzrostu zachodzącego na poczet fotosyntezy, bo ta jest minimalna (ryc. 2).



Rys. 2. Wzrost *Chlorella vulgaris*, szczep nr 336 w temp. 27°C na świetle (400 luks)+1% glukoza (A), kontrola mineralna na świetle (B), oraz z 1% glukozą w ciemności (C). Rzędne w skali logarytmicznej;  $\log D = \log(B+C)$

Ponieważ w tych warunkach wartości wzrostu są duże, wskazuje to na zwiększenie wykorzystania glukozy. Tłumaczy się to obecnością pewnych czynników wzrostowych, które mogą powstawać w komórkach tylko na świetle i ich synteza jest prawdopodobnie związana z procesem fotosyntezy (Samejima i Myers 1958, Müntz 1965).

Porównanie wartości wzrostu na cukrach w ciemności i na świetle, w obecności cukrów lecz przy słabym oświetleniu i niedostatku  $\text{CO}_2$ , pozwala lepiej wyodrębnić związki organiczne przyswajalne w różnym stopniu lub w ogóle nieprzyswajalne. Uzyskane dane można zastosować jako test fizjologiczny służący do różnicowania i selekcji glonów (Minjewa 1961, Awiłow 1963 i 1965, Sikora i Wierna 1965 i 1966).

Znany jest fakt wpływu mieszaniny źródeł węgla na wzajemne zwiększenie ich przyswajalności a tym samym powiększenie wartości heterotroficznego wzrostu. Samejima i Myers (1958) stwierdzili, że dodatek do glukozy innych cukrów nie zmienia jej wykorzystania przez *Chlorella pyrenoidosa*. Gdy tempo wzrostu na glukozie =  $\frac{1}{2}$  a na galaktozie  $\frac{1}{4}$  tempa wzrostu na świetle, to zastosowanie jednocześnie obydwóch cukrów nie podwyższa ich wykorzystania. Podobne doświadczenie wykonał Lindberg (1963) nad *Ophiostoma multiannulatum*. Grzyb ten nie rośnie na galaktozie jako jedynym źródle węgla. Dodatek do tego cukru glukozy podwyższa wzrost kultury o około 50% w porównaniu ze wzrostem na samej glukozie. Horr (1936) stwierdził, że grzyb *Aspergillus niger* lepiej zużywa galaktozę w obecności glukozy. W wypadku więc ubogich źródeł węgla spotykamy zwiększenie, lub brak wpływu na wzrost, w zależności od użytego związku organicznego i badanego organizmu. Korzystne oddziaływanie mieszanin ubogich źródeł węgla na wzrost mikroorganizmów tłumaczone jest powstaniem związków pośrednich, które pozwalają lepiej wykorzystywać komórkom dane substraty.

O stopniu przyswajalności danego związku organicznego mogą decydować jego zmiany spowodowane cieplną sterylizacją. Griffiths i wsp. (1960) przebadali wpływ różnych sposobów wyjaławiania związków organicznych na stopień ich wykorzystania przez kultury *Chlorella*. Dane z ich pracy przedstawia tab. 3. Sterylizacja na zimno lub temperaturą wpływa na wykorzystanie związków organicznych w niejednakowym stopniu, w zależności od rodzaju użytego związku. W badaniach nad grzybami stwierdzono, że każdy gatunek reaguje odrębnie i swoiście na zmianę właściwości cukrów wywołaną ich cieplną sterylizacją. Stwierdzono np. brak wzrostu gatunku *Cytophaga* na podłożu z glukozą ogrzaną do  $50^\circ\text{C}$  (Stanier 1942).

Istotnym czynnikiem w heterotroficznym wzroście jest stężenie związku organicznego. Podawane przez wielu autorów optymalne stężenia stosowanych węglowodanów są zbliżone do ich 1% roztworów (por. tab. 4). Jedynie związki, które w większych stężeniach działają hamująco na wzrost glonów stosuje się w mniejszych stężeniach. Np. pentozy dają lepsze wyniki przy zastosowaniu 0,25% roztworów, a takie alkohole jak metanol czy etanol jeszcze mniejszych stężeń. By móc porównywać między sobą wartości wzrostu osiągnięte na różnych źródłach węgla

Tabela 3

Wzrost *Chlorella vulgaris*, Brannon I, na różnie wyjaławianych 1% cukrach i alkoholach, w ciemności, w ciągu 10 dni, w temp. 25°C. Wartość wzrostu podano w liczbie komórek 1 mm<sup>3</sup>. Początkowe inoculum 100 komórek/mm<sup>3</sup>. (Griffiths i wsp. 1960).

Cukry i alkoholocukry	Pożywka w całości autoklawo- wana	Badane substancje „etryzo- wane“
d-glukoza	16350 ± 940	16400 ± 880
d-galaktoza	6033 ± 900	3666 ± 230
d-fruktoza	4875 ± 450	2730 ± 130
d-mannoza	3400 ± 880	3590 ± 330
d-ksyloza	3280 ± 90	3125 ± 160
l-arabinoza	5350 ± 670	3950 ± 650
l-sorboza	2550 ± 70	2140 ± 50
l-ramnoza	3800 ± 450	2950 ± 150
sacharoza	11760 ± 820	7480 ± 180
maltoza	11000 ± 920	3450 ± 240
laktoza	6590 ± 400	2340 ± 200
rafinoza	5890 ± 460	1950 ± 150
mannitol	4080 ± 110	2575 ± 190
sorbitol	6530 ± 890	2000 ± 160
α-metyl glukoza	12050 ± 300	3900 ± 180
nieorganiczna kontrola	2230 ± 250	2060 ± 240

Tabela 4

Wartości wzrostu kultur *Chlorella vulgaris*, szczep 366, na świetle i w ciemności na różnych stężeniach glukozy. Czas hodowli 16 dni, temp. 27°C, natężenie światła 400 luks. Wartości wzrostu podano w milionach komórek/ml

Stężenie glukozy	Światło	Ciemność
100 mg %	66,00	7,80
250 mg %	133,50	8,30
500 mg %	146,25	8,50
750 mg %	152,00	8,60
1000 mg %	146,00	8,80
1500 mg %	137,60	8,20
2000 mg %	140,00	7,90
3000 mg %	128,30	7,80
nieorganiczna kontrola	33,10	0,80

stosuje się ich jednakowe, ekwiwalentne stężenia. Przyjęto wychodzić w pracach porównawczych z optymalnego stężenia glukozy a więc z 1% roztworów.

Oprócz wymienionych czynników wpływających w istotny sposób na przebieg heterotroficznego wzrostu należy podkreślić także rolę warunków hodowli, a szczególnie takie czynniki, jak dostęp tlenu, skład mineralny pożywki i jej wartość pH.

Skład mineralny pożywek nie jest obojętny dla wielkości przyrostów w warunkach heterotrofizmu. Stwierdzono, że dla wzrostu na glukozie najwydatniejszym źródłem azotu jest mocznik. Jego rozkład bowiem, podobnie jak i soli amonowych, wymaga mniej energii niż redukcja azotanów (Samejima i Myers 1958).

Dobre zbuforowanie pożywki jest niezbędnym warunkiem wzrostu kultur glonów na węglowodanach. Minjewa (1962) stwierdziła małą zależność wzrostu *Chlorella* na glukozie od wartości pH, bowiem jest prawie jednakowy w zakresie od 5,3 do 9,3. Lecz w pewnych warunkach dochodzi do wzmożenia fermentacji glukozy, przy jednoczesnym wydzielaniu dużych ilości kwasu mlekowego do pożywki. Powoduje to duży spadek wartości pH i na pożywkach niezbuforowanych wzrost kultury zostaje wstrzymany. Wzrost na fruktozie jest ściśle uzależniony od wartości pH pożywki, a ponadto cukier ten sterylizowany łącznie z solami pożywki w autoklawie powoduje bardzo duży wzrost kwasowości podłoża, dlatego stwierdza się bardzo często brak wzrostu na tym związku. Stwierdzono duże wahania wartości pH pożywek w czasie heterotroficznego wzrostu glonów, o wiele większe niż w autotroficznych kulturach. Dlatego niezbędne jest stosowanie w heterotroficznych hodowlach buforów o dużej pojemności buforowej (Sikora 1967).

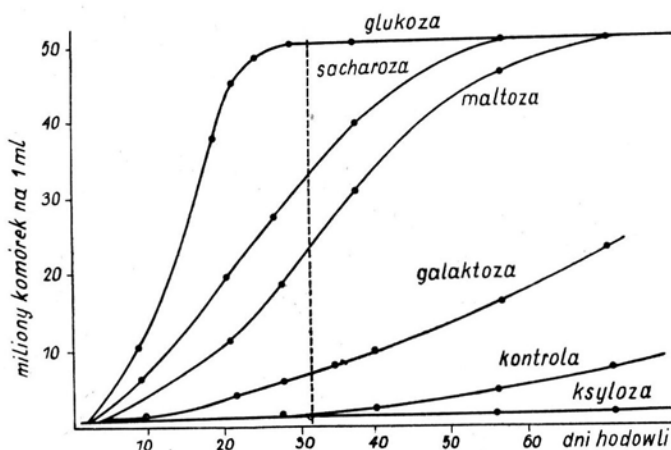
#### Ocena wartości heterotroficznego wzrostu glonów

Wzrost kultur mikroorganizmów oceniać można kilkoma kryteriami. Należą do nich takie pojęcia, jak: 1) tempo wzrostu, określające przyrost biomasy w jednostce czasu, 2) wydajność wzrostu, określająca końcowy efekt wzrostu mierzony w fazie stacjonarnej po zakończeniu wzrostu kultury, oraz tzw. 3) współczynnik ekonomiczny wzrostu określający stosunek wyhodowanej biomasy do ilości zużytego związku organicznego.

Istnieje problem, które z kryteriów przyjąć za najistotniejsze przy ocenie wzrostu na danym związku. Aby otrzymać pełny obraz wykorzystania związku organicznego przez dany organizm potrzebne są wszystkie kryteria. Natomiast dla orientacyjnego uchwycenia różnic pomiędzy poszczególnymi organizmami w ich cechach heterotroficznego wzrostu wystarcza zazwyczaj jedno kryterium. Określanie w tym przypadku tempa wzrostu wydaje się najkorzystniejsze, bowiem daje pośrednio obraz innych cech heterotroficznego wzrostu.

Przyjęcie określania wzrostu danym kryterium narzuca sposób prowadzenia obserwacji i rejestracji wyników doświadczenia. Gdy mierzy się tylko tempo wzrostu wystarcza wykonywać kilkunastogodzinne lub kilkudniowe doświadczenia, w odstępach czasu dowolnie wybranych, odnosząc uzyskane dane do kontroli, którą jest wzrost na świetle lub na glukozie jako najwydajniejszym źródle węgla (ryc. 1). Badając wartości wzrostu jego końcową wydajnością prowadzi się hodowlę tak długo, aż osiąga się fazę stacjonarną. Czas, w którym wzrost kultury na glukozie osiąga tą fazę, przyjmuje się za termin zakończenia hodowli na wszystkich innych badanych związkach organicznych. Otrzymany w ten sposób obraz zróżnicowanego

wzrostu badanego organizmu na poszczególnych związkach organicznych jest obrazem zdolności wykorzystania danego związku jak i jego wydajności (ryc. 3). Współczynnik ekonomiczny wzrostu określa się przez zbadanie bilansu węgla w kulturze. Oblicza się go dzieląc przyrost suchej masy kultury przez ilość zużytego związku organicznego, lub przedstawia się go jako procent węgla przyswojonego:  $\text{węgiel komórki} \times 100 / \text{przyswojony węgiel substratu}$ . Na ogół glony o dobrej wydajności wzrostu zamieniają mniej niż połowę masy cukru obecnego w pożywce na materiał komórkowy.

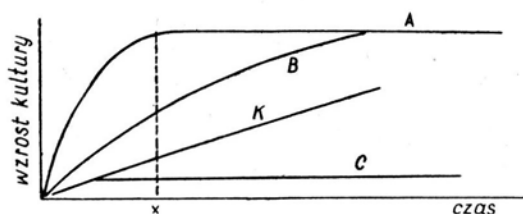


Ryc. 3. Wzrost *Scenedesmus obliquus*, szczep 449, w ciemności, na różnych cukrach jako jedynych źródłach węgla. Linia przerywana — wartość wzrostu osiągnięta w 32 dni hodowli, gdy wzrost na glukozie osiąga fazę stacjonarną

Rozpatrując krytycznie liczne prace o przyswajalności różnych węglowodanów przez mikroorganizmy, liczni autorzy podkreślają konieczność ujednoczenia stosowanych kryteriów oceny wzrostu, celem możliwości porównywania uzyskanych wyników. Za niewystarczające uznaje się pomiary wzrostu na danym substracie tylko kilkugodzinne. Dla całkowitej oceny przyswajania różnych związków organicznych konieczne jest przebadanie tak tempa wzrostu, jak i wydajności końcowej kultur mikroorganizmów. Wtedy bowiem otrzymuje się pełny obraz wykorzystania, danego substratu (Lilly i Barnett 1959). Dla każdego badanego organizmu ustala się odrębny czas hodowli, a każdy badany cukier stosuje się w ilościach węgla ekwiwalentnych dla ilości glukozy. Za słuszością takiego ujęcia przemawia fakt, że w ten sposób różnicuje się w pełni związki pod względem ich zdolności zapewniania wzrostu. Jeżeli porównamy dwa różne substraty zapewniające różny stopień rozwoju kultur glonów (ryc. 4), to widać, że związek mniej wydajny zapewnia mniejsze tempo wzrostu (krzywa B), lecz po dłuższym czasie wydajność wzrostu kultury na tym substracie osiągnie poziom równy wartości wzrostu na związku bardziej wydajnym (krzywa A na ryc. 4, oraz ryc. 3). Oceniając wzrost w czasie t



otrzymujemy obraz zróżnicowanego wykorzystania tych związków. Tylko w wypadku gdy dany substrat działa hamująco na wzrost (krzywa C na ryc. 4) przedłużanie czasu hodowli pozostaje bez wpływu, bo wzrost zostaje zatrzymany i to zawsze na poziomie poniżej wartości kontroli. Gdy nie udaje się osiągnąć wydajności wzrostu na związku ze słabym tempem wzrostu (B) poziomu równego glukozie (A) nawet po dłuższym czasie to odpowiedzialne za to będą warunki hodowli. Poprzez dobranie optymalnych warunków dla wzrostu na danym substracie udaje się podwyższyć jego przyswajalność. Lecz przy porównywaniu wzrostu na różnych substratach winno się stosować identyczne warunki hodowli. W związku z tym, przy porównywaniu przyswajania różnych substratów rezygnuje się z określania ich całkowitej wydajności wzrostu a ustala się tylko wartość ich tempa wzrostu w odniesieniu do substancji standardowej. Pozwala to stosować identyczne warunki hodowli dla wszystkich testowanych substancji.



Ryc. 4. Schematyczne przedstawienie wzrostu glonu na trzech różnych związkach organicznych zapewniających różne tempa wzrostu (A, B, C) i kontroli mineralnej (K)

Badania nad przyswajalnością przez glony związków organicznych pozwalają poznać mechanizm tego procesu, a jednocześnie scharakteryzować poszczególne gatunki pod względem cech heterotroficznego wzrostu. W tych przypadkach, gdy cechy te są stałe i niezienne nawet w różnych warunkach hodowli, mogą być one uwarunkowane genetycznie. Określanie tych cech pozwala różnicować formy nawet blisko spokrewnione i trudne do rozróżnienia metodami morfologii opisowej (Kessler i Soeder 1962, Parker i wsp. 1961).

Wyniki prac nad zdolnością przyswajania przez glony różnych związków organicznych mogą znaleźć zastosowanie także w produkcji. Glony o dużej wydajności heterotroficznego wzrostu można stosować do oczyszczania ścieków oraz do hodowli na odpadowych produktach przemysłu przetworów spożywczych.

Instytut Zootechniki w Krakowie,  
Pracownia Algologiczna w Zatorze

#### LITERATURA CYTOWANA

- Awiłow J. A., 1963. Ispolsowania razlicznych istocznikow uglewodorow wodoroslami roda *Chlorella* w tiemnotie. Wiestnik Leningradzkiego Uniwersiteta, 15: 62—68.  
Awiłow J. A., 1965. Uswjienie niekotorych uglewodorow wodoroslami roda *Chlorella*, Woprosy Mikrobiologii, 19: 131—136.

- Finkle B. J., Appleman D., Fleischer, F. K., 1950. Growth of *Chlorella vulgaris* in the dark, *Science*, 111: 309.
- Griffiths D. J., Thresher C. L., Street H. E., 1960. The heterotrophic nutrition of *Chlorella vulgaris* (Branon No 1 strain), *Annals of Botany*, 24: 93.
- Hoor W. H., 1936. Utilization of galactose by *Aspergillus niger* and *Penicillium glaucum*, *Plant Physiol.*, 11: 81—99.
- Kessler E., Soeder C. J., 1962. Biochemical contributions to taxonomy of the genus *Chlorella*, *Nature*, 194: 1096.
- Lindberg M., 1963. Galactose as a carbon source for the growth of *Ophiostoma multiannulatum*, *Physiologia plantarum*, 16: 661.
- Lilly V. G., Barnett H. L., 1959. Fizjologia grzybów, PWRiL, Warszawa.
- Minjewa L. A., 1961. Ispolowania razlicznych organiczeskich sojedynieji kulturami *Chlorella vulgaris* i *Scenedesmus obliquus*, *Mikrobiologija*, 33: 4.
- Minjewa L. A., 1962. Wlijanje pH na awtotrofnoje i gieterotrofnoje pitanje *Chlorella vulgaris* i *Scenedesmus obliquus*, *Mikrobiologija*, 33, 233—240.
- Minjewa L. A., 1962. Wlijanje intensywnosti swiata na awtotrofnoje i gieterotrofnoje pitanje *Chlorella vulgaris* i *Scenedesmus obliquus*, *Mikrobiologija*, 31, 411.
- Müntz K., 1965. Vergleichende Untersuchungen über die Stickstoff-und Glucose-Aufnahme von *Chlorella* aus Nährlösungen in Abhängigkeit von den Durchmischungs-Bedingungen. *Z. Allgem. Mikrobiol.*, 5: 362—377.
- Neish A. C., 1951. Carbohydrate nutrition of *Chlorella vulgaris*, *Canad. J. Botany*, 29: 68.
- Parker B. C., Deason T. R., Bold H. C., 1961. Facultative heterotrophy in some chlorococcaceam algae, *Science*, 133: 761—763.
- Samejima H., Myers J., 1958. On the heterotrophic growth of *Chlorella pyrenoidosa*, *J. Gen. Microbiol.*, 18: 107—117.
- Sikora Z., Wierna W., 1966. Heterotroficzny wzrost dwóch szczepów *Scenedesmus* na różnych organicznych źródłach węgla (w rękopisie).
- Sikora Z., Wierna W., 1966. Heterotroficzny wzrost szczepów *Chlorella* na różnych organicznych źródłach węgla (w rękopisie).
- Sikora Z., 1967. Znaczenie wartości pH pożywek w heterotroficznych kulturach glonów (w rękopisie).
- Stanier R. Y., 1942. The Cytophaga group: a contribution to the biology of myxobacteria, *Bact. Revs.*, 6: 143—196.
- Wilson E. E., 1942. Physiological studies on two species of *Diplodia parasitic* on corn, *Phytopatology*, 32: 130—140.