

Percoll 密度勾配を用いた遠心分離によるイシクラゲの細胞外多糖 (EPS) 除去細胞の単離法

小杉真貴子^{1*}・菓子野康浩²・工藤 栄^{1,3}・伊村 智^{1,3}

Establishment of an isolation method of *Nostoc commune* cells free from extracellular polysaccharides (EPS) using Percoll centrifugation

Makiko Kosugi^{1*}, Yasuhiro Kashino², Sakae Kudoh^{1,3} and Satoshi Imura^{1,3}

(2012年7月3日受付; 2012年8月17日受理)

Abstract: The terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune* Vaucher ex Bornet et Flahault occurs worldwide, including in Japan and Antarctica. *N. commune* has a large amount of extracellular polysaccharides (EPS) that hold moisture and protect the cells and at the same time accumulate light-blocking substances which is believed to play an important part in adaptation to a severe environment. To evaluate the photoadaptation processes in *N. commune* and clarify the role(s) of EPS under ambient environmental condition at Antarctica, separation of cells from EPS is necessary. High yield is a prerequisite for the use of only small amount of natural *N. commune* from Antarctica. For this purpose, we developed a separation method by improving the Percoll density gradient centrifugation method using an EPS-coated field-grown *Nostoc* population. We established the most suitable condition to separate naked cells from EPS at high yield retaining high photosynthetic activity. The method is composed of centrifugation of cell homogenated *N. commune* in 10% (v/v) Percoll to separate cells efficiently from EPS followed by fractionating centrifugation to remove impurities using the gradient of Percoll (80% and 50%, v/v).

要旨: 陸生ラン色細菌のイシクラゲ (*Nostoc commune*) は南極や日本にも生育する汎存種である。イシクラゲの細胞の周りに存在する細胞外多糖 (EPS) は、水分保持や細胞の保護に役立つと共に遮光性物質を蓄積しており、これが苛酷な環境への適応に重要な役割を果たしていると考えられている。南極産の貴重なイシクラゲを材料にしてこの仮説を検証するためには、EPS を除去した細胞を高収率で回収する必要がある。そこで、これまでに報告のある EPS 除去方法を改良し、Percoll を用いた遠心分離で細胞の回収率向上を図った。その結果、イシクラゲ破碎懸濁液に 10% 濃度の Percoll を混合して遠心することで EPS を効率良く除去で

¹ 情報・システム研究機構国立極地研究所. National Institute of Polar Research, Research Organization of Information and Systems, Midori-cho 10-3, Tachikawa, Tokyo 190-8518.

² 兵庫県立大学大学院生命理学研究科. Graduate School of Life Science, University of Hyogo, 3-2-1 Koto, Kamigori-cho, Ako-gun, Hyogo 678-1297.

³ 総合研究大学院大学複合科学研究科極域科学専攻. Department of Polar Science, School of Multidisciplinary Sciences, The Graduate University for Advanced Studies (SOKENDAI), Midori-cho 10-3, Tachikawa, Tokyo 190-8518.

* Corresponding author. E-mail: kosugi.makiko@nipr.ac.jp

きることが分かった。更に細胞画分を80%と50%のPercollに上層して遠心することで他の不純物の除去が達成され、少量のイシクラゲを生理学実験に用いるのに適した細胞単離法が確立された。

1. はじめに

昭和基地周辺の露岩域に大きな群落を作って生育する光合成生物のひとつとして、ラン色細菌のイシクラゲ (*Nostoc commune* Vaucher ex Bornet et Flahault) が知られている (Ohtani, 1986)。イシクラゲの細胞の周りに存在する細胞外多糖 (EPS: extracellular polysaccharides) は乾燥重量の60%以上を占め (Hill *et al.*, 1994, 1997)、水分の保持や乾燥状態での細胞の保護に重要な役割を果たし、さらにそこに強光から身を守るための遮光性物質を蓄積する (Proteau *et al.*, 1993; Tamaru *et al.*, 2005)。南極のイシクラゲと日本のものでは、吸光スペクトルに大きな差が見られ、南極に生育するイシクラゲは遮光性物質、特に紫外線遮光物質を多量に蓄積している (Kosugi *et al.*, 2010)。これらの物質はイシクラゲが南極の陸域において繰り返される凍結・乾燥環境に耐え、日射と紫外線の強い夏季の環境で生育できるような適応にも重要な役割を果たしていると考えられる。

我々は、南極の陸上生態系において光合成生物として繁殖し、生態系の一翼を担う重要な構成メンバーであるイシクラゲの光合成特性とEPSの重要性を、生理学実験手法により明らかにしていくことを目指して研究を進めている。EPSに含まれる遮光性物質は、内部の細胞に到達する光の強度や波長特性を調節する役割を果たしており、生育環境によって蓄積量に変化するため、その多寡が見た目の光合成速度に反映されると考えられる。イシクラゲの細胞本来の光合成特性を知るためには、EPSの除去が望ましい。EPSは粘性が高く数珠状に連なる細胞群落を取り囲むように存在しており、その量は細胞の体積に比べて非常に多い。EPSを取り除く手法としては、これまでTamaru *et al.* (2005) によって適度に磨細した試料をフィルター (キムワイプ) と遠心分離により分別する方法が報告されている。しかし、この方法で細胞を分離しても、多くの細胞がフィルター上に細胞外多糖と共に残ってしまうためか、高収率での細胞の分離が不可能であった。そのため、採集試料として確保できる量が限られる希少な南極イシクラゲから生理学実験に必要な量の細胞を得るためには、高収率の細胞単離法を確立する必要がある。

我々はイシクラゲから高収率で細胞を単離するため、Percoll密度勾配遠心分離法を検討した。Percollを用いた密度勾配遠心分離法は細胞小器官を分離する際によく使われており (Gutierrez *et al.*, 1979; Mills and Joy, 1980; Schumacher *et al.*, 1978)、物質の密度差を利用した分離法である。したがって、大きさや重量が一定でない同種の細胞を、密度差のある他の物質から分離するのに適した方法である (Sharpe *et al.*, 1988)。EPSとイシクラゲ細胞の大きな密度差に着目し、細胞を単離する過程で光合成活性を失活させずに高収率でEPSと細胞を分離する条件を詳細に検討した。

2. 材料と方法

2.1. 材料

単離方法の検討には、南極のものと同種とされている日本産のイシクラゲを用いた。イシクラゲは 2012 年 2 月に兵庫県立大学播磨学園都市キャンパスで採集し、純水で洗浄した後 25℃、60% の湿度に保たれた暗所で乾燥させ、実験まで室温で保存した。そして、実験には暗所で 24 時間以上吸水させたものを使用した。

2.2. EPS の除去と細胞の単離方法

図 1 に操作の一連の流れを図解で示す。50 mM HEPES-NaOH (pH 7.5) の緩衝液 (Buffer A)

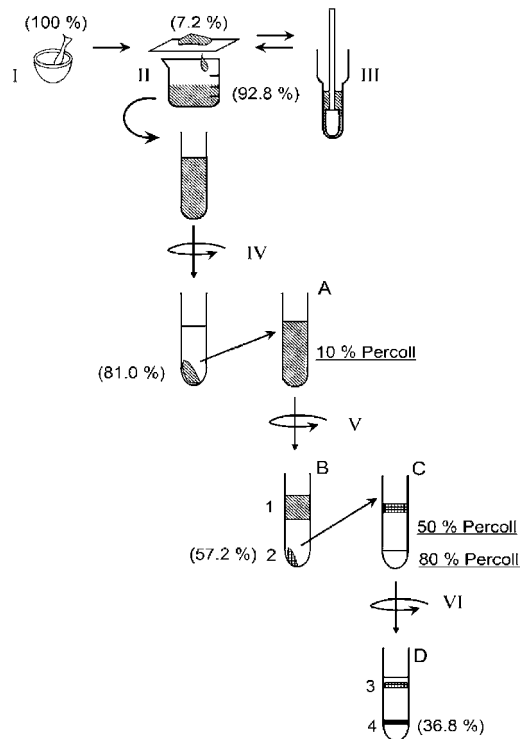


図 1 EPS 分離操作手順の図解

I: すり潰し, II: フィルター濾過, III: ガラスホモジナイザーでのすり潰し, IV: 7000×g, 4℃で10分間遠心分離, V: 7000×g, 4℃で7分間遠心分離, VI: 12000×g, 4℃で15分間遠心分離, ()内はクロロフィル a を指標とした細胞の回収率を示している。試験管横のアルファベットと数字は図 2 と対応している。

Fig. 1. Procedure of the separation of extracellular polysaccharides.

I: grinding the *N. commune* colony, II: separation of the suspended cells from the debris of *N. commune* colony, III: homogenization of the debris of *N. commune* colony by a glass homogenizer, IV: centrifugation at 7000×g, 4℃ for 10 min, V: centrifugation at 7000×g, 4℃ for 7 min, VI: centrifugation at 12000×g, 4℃ for 15 min. The numbers in the parentheses are the yield of cells based on the amount of Chl a. The alphabets and the numbers on the side of test-tubes correspond to those in Fig. 2.

に浸したイシクラゲを氷上で乳鉢と乳棒を使ってすり潰し (図 1-I), 150 ミクロンのナイロンメッシュフィルターで濾過した (図 1-II). フィルターの上に残ったイシクラゲはガラスホモジナイザーを用いてさらにすり潰した後, 再度上記フィルターで濾過した (図 1-III). 濾液を 4°C, 7000×g で 10 分間遠心し, 上澄みを除いた後 Buffer A に沈殿を再懸濁させて遠心を行う操作を 5 回繰り返し, 水溶性の夾雑物を取り除いた (図 1-IV). 次に, 沈殿を再度 Buffer A に懸濁し, そこへ Percoll (GE Healthcare) を終濃度 10% (v/v) となるように加え, アングルロータを使って, 4°C, 7000×g で 7 分間遠心した (図 1-V). この沈殿を少量の Buffer A で懸濁し, 80% Percoll と 50% Percoll を 1:3 程度の分量比で重層させた溶液上に上層し, 12000×g で 15 分遠心することで細胞外多糖やその他の不純物を除去した (図 1-VI).

2.3. クロロフィル濃度測定

イシクラゲのクロロフィル濃度測定は, 100% メタノールにより色素抽出して Porra *et al.* (1989) の計算式を用いて行った. 吸光度の測定は UV-2500PC (島津) を用いた. A_{665} は抽出液の波長 665 nm の吸光度である.

$$\text{Chl } a \text{ (}\mu\text{g/ml)} = 12.53 \times A_{665}. \quad (1)$$

2.4. 酸素発生活性の測定

クラーク型酸素電極を用いて 25°C で行った. 反応液には Buffer A (50 mM HEPES-NaOH (pH7.5)) に, 5 mM NaHCO_3 を加えたものを用い, 5 $\mu\text{g Chl } a/\text{ml}$ になるよう細胞を懸濁した. 光量は 1500 mol photons/m²·s とした.

2.5. アルシアンブルーによる EPS の染色

最終標品のイシクラゲ細胞に EPS が付着しているかを調べるため, アルシアンブルーによる EPS の染色と観察を行った. アルシアンブルーは, pH 2.5 で酸性ムコ多糖の硫酸基とカルボキシル基を特異的に染色する試薬である. 野生のイシクラゲをこの条件で処理すると EPS が青く染まる (Hill *et al.*, 1994). 本研究では Tamaru *et al.* (2005) の方法を参考に, 最終標品のイシクラゲ細胞を純水で洗浄した後, 0.33% のアルシアンブルー 8 GX (和光), 3% 酢酸溶液で 30 分間処理し, その後純水ですすいだものを光学顕微鏡で観察した.

2.6. ウロン酸の定量

カルバゾールによる呈色反応法を用いて EPS の主成分であるウロン酸の定量を行った (Bowness, 1956; Dische, 1947; Tamaru *et al.*, 2005). 1 回の反応に 1 mg の単離細胞と 0.5 mg のイシクラゲを用いてそれぞれ 3 サンプルずつ定量を行った. イシクラゲでは 1 mg 処理すると吸光度 A_{530} が 2 を超えたため, 単離細胞よりも少量で反応を行った. イシクラゲは自然乾

乾燥した状態でセラミックお茶ミル (CM-45GT, Kyocera) によりパウダー状にすり潰し, 1 mg/ml となるよう Buffer A を加え, 単離細胞は凍結乾燥したものを 2 mg/ml となるよう Buffer A を加えてそれぞれマイクロチューブ用ベッスルで均一になる程度にすり潰した. 懸濁液を 0.5 ml ずつ共栓付き硬化ガラス試験管に移し, 氷冷しながら濃硫酸 (純度 96%) を 3 ml 加えてボルテックスで混合し, 沸騰したお湯に 20 分間浸けて EPS を加水分解処理した. 反応液を室温に戻した後, 分光光度計で A_{530} を測定し, 100 μ l のカルバゾール溶液 (0.1% (wt/wt) カルバゾール, 95% エタノール) を加え室温で 2 時間静置して A_{530} を測定し, 吸光度の増加量を算出した. ウロン酸の定量は, 10-100 μ g/ml の濃度の D-(+)-グルクロノラクトンで検量線を作成して行った. この定量法でのグルクロノラクトンの検出限界は 5 μ g/ml であった.

3. 結果と考察

吸水したイシクラゲを乳鉢ですり潰す際は力を入れすぎず, 丁寧にすり潰してできるだけ未破碎の断片が残らないようにした (図 1: I). フィルターで濾過できなかった残渣をガラスホモジナイザーですり潰すことで収率の向上を図った (図 1: III). 最終的にフィルター上に残った画分は乾燥重量比 (w/w) で野生株の 7.2% ($\pm 1.4\%$) であった. 濾液を 4°C, 7000 \times g で 10 分間遠心すると, 細胞と EPS は共に沈殿したように見えた (図 1: IV). 沈殿を Buffer A に筆を用いて再懸濁し, 7000 \times g で 10 分間遠心する操作を 5 回繰り返して水溶性の夾雑物を取り除いた. その後, Buffer A に懸濁した沈殿画分に Percoll を 10% (v/v) となるように混合した (図 1: A). Percoll を用いて EPS を除去する際のポイントは, 細胞懸濁液を十分に希釈し, EPS の粘性を抑えて細胞を移動させやすくすることである. 通常の方法として用いられているように Percoll に試料を上層して遠心すると, Percoll に対する試料の体積が少量になるため EPS に絡んだまま分離されない細胞が増える. ここで, Percoll の遠心による密度勾配自己形成能が有用である. Percoll をイシクラゲ懸濁液に最初から均一に混ぜて遠心することで, Percoll の濃度勾配形成に伴って低密度の EPS は上方へ, 高密度の細胞は下方へと分離されるようにした (図 2: A, B). 遠心前の細胞の希釈割合は 0.8 μ g Chl *a*/ml 程度とした.

この操作だけでは EPS 以外の不純物が除去しきれなかったため (図 3: B-2), さらに 80% と 50% 濃度の Percoll に上層して遠心分離することで (図 1: VI), 不純物の非常に少ないイシクラゲ細胞を回収することができた (図 2: C, D). 図 2 の A と B は 10% Percoll による遠心分離前後の遠沈管の写真である. このときの上層画分と沈殿を顕微鏡で観察したものが図 3 の B-1 と B-2 で, 上層画分にはイシクラゲ細胞はほとんど含まれていなかったが, 沈殿にはイシクラゲの数珠状細胞のほかに茶色いスキトネミンと思われる色素をもった EPS 破片や, イシクラゲ群落に混在していたと思われる石や他の生物などが観察された. この沈殿を 80% と 50% Percoll によってさらに精製することで, これら不純物をほぼ除去することができた (図 3: D-4). また, 最終標品であるイシクラゲ細胞の周りに EPS の付着がないことをアルシア

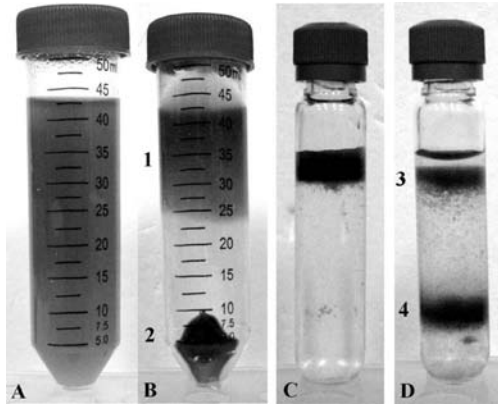


図 2 イシクラゲからの細胞単離の過程

- (A) イシクラゲのすり潰し懸濁液に Percoll を終濃度 10% になるように混合したもの
 (B) A を $7000\times g$ で 5 分間遠心後の結果. 1 の部分は細胞外多糖, 2 の部分はイシクラゲ細胞の画分.
 (C) Percoll 濃度 80% と 50% の 2 段階ステップに B の沈殿画分 (画分 2) を上層した状況
 (D) C を $12000\times g$ で 15 分遠心後の結果. 3 の部分はイシクラゲ細胞をほとんど含まない画分, 4 の部分がイシクラゲ細胞の画分.

Fig. 2. Each step of Percoll centrifugation to purify cells from *N. commune* colony.

- (A) *N. commune* homogenate in the 10% Percoll solution. (B) Fractions after centrifugation at $7000\times g$ for 5 min. The cell fraction (band 2; Fig. 3-B-2) was separated from the EPS fraction (band 1; Fig. 3-B-1). (C) Cell fraction from B-2 on the top of two phase Percoll (80% and 50%). (D) Purified cell fraction (band 4) separated from impurity (band 3) after centrifugation at $12,000\times g$ for 15 min.

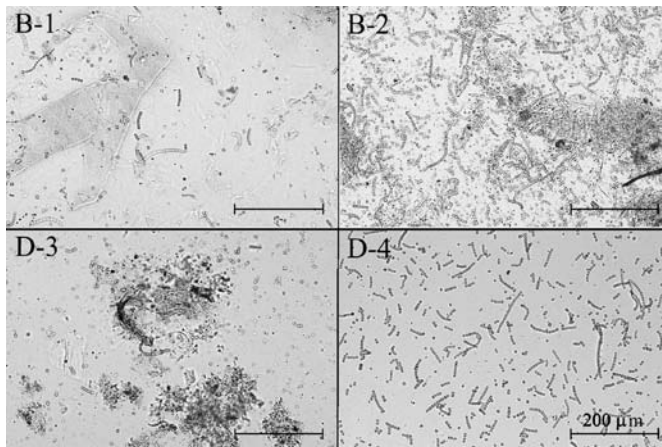


図 3 Percoll による遠心分離過程の顕微鏡観察写真.

- B-1: 図 2B の細胞外多糖の画分, B-2: 図 2B の沈殿, D-3: 図 2D の上層画分,
 D-4: 図 2D の下層画分.

Fig. 3. Microscopic observation of fractions obtained at each step in the Percoll centrifugation process. B-1 and B-2 correspond to the fractions of Fig. 2-B-1 and -2, respectively. D-3 and D-4 correspond to Fig. 2-D-3 and -4 fractions, respectively.

ンブルー染色法によって確認した。EPS の除去を定量的に評価するため、カルバゾール呈色反応法により EPS の主成分であるウロン酸の定量を行った (Bowness, 1956; Dische, 1947; Tamaru *et al.*, 2005)。硫酸で加水分解反応後、両サンプルとも薄い茶色を呈した。検量線作成に用いたウロン酸のグルクロノラクトン単体ではこの呈色は起こらなかったため、夾雑している糖類やアミノ酸が反応したものと考えられる。検量線を用いてグルクロノラクトンに換算したウロン酸の濃度は、イシクラゲでは $216 \pm 16 \mu\text{g}/\text{mg}$ (dry wt), 単離細胞では $22 \pm 2.0 \mu\text{g}/\text{mg}$ (dry wt) となり、90% 近くの EPS が除去されていることが示唆された。なお、カルバゾールによる呈色はウロン酸だけでなく還元糖などでも若干起こり、例としてグルコースとガラクトースはウロン酸の 10 分の 1 程度のモル吸光係数を示す (Bowness, 1956)。EPS の加水分解でこうした還元糖が生成すること (Helm *et al.*, 2000)、細胞内にも還元糖が存在すると考えられることから、ウロン酸の定量としては今回の方法は不十分であるが、EPS の除去の程度を確認するには十分な目安になると考えられる。

乾燥重量 0.5 g のイシクラゲ群体からの単離操作を独立して 3 回行い、クロロフィル *a* の量で換算することにより、この手法による細胞の収率を求めた (表 1)。すり潰し前の野生のイシクラゲ群体は採集した場所によって細胞密度が異なり、また、一つの群体内においても EPS 中に存在する細胞の密度が一様でなく、クロロフィル含有量に大きな差が認められるのが普通であるため、収率測定のための均一な試料を得ることが難しかった。そこで、すり潰し後にフィルター濾過した濾液のクロロフィル量と濾過残渣の乾重量から、すり潰し前のクロロフィル量を計算した。イシクラゲ群体をすり潰してフィルターで濾過した懸濁液中のクロロフィル量を 100% として計算すると、収率は $39.7 (\pm 7.2) \%$ であった。フィルター上に残存したイシクラゲ群体は乾重量にして、すり潰し前の群落の $7.2 (\pm 1.4) \%$ (w/w) であった。すり潰し前のイシクラゲ群体のクロロフィル量を 100% として計算すると、収率は $36.8 (\pm 6.3) \%$ であった。乾燥重量当たりのクロロフィル量は、イシクラゲ群体で $0.28 (\pm 0.06) \mu\text{g Chl } a/\text{mg}$ 、最終単離細胞標品では $3.36 (\pm 0.13) \mu\text{g Chl } a/\text{mg}$ であった。イシクラゲ群落では乾燥重量に占める EPS の割合が大きいためクロロフィル濃度は低いが、EPS の除去により最終単離細胞のクロロフィル濃度が高くなったものである。すり潰し前のイシクラゲ群体と最終標品の光合成活性を酸素電極によって測定したところ、イシクラゲ群体は $154.4 (\pm 25.7) \mu\text{moles O}_2/\text{mg Chl } a/\text{h}$ 、単離後は $133.4 (\pm 23.1) \mu\text{moles O}_2/\text{mg Chl } a/\text{h}$ で、単離前の 86% 程度の活性が保持されていた。Tamaru *et al.* (2005) の方法では単離後の酸素発生活性は単離前の 73% であるので、単離操作前後の活性変化の程度はほぼ同等であった。

今回用いたイシクラゲの乾燥重量当たりのクロロフィル量は、Tamaru *et al.* (2005) の値より低いものであった。野生の土壌藻類として生育するシアノバクテリアは採集された季節や環境条件の違いによって、細胞当たりのクロロフィル *a* の量が変化することが報告されている (Bowker *et al.*, 2002, Lakatos *et al.*, 2001)。Bowker *et al.* (2002) は、シアノバクテリア群集

表 1 乾燥重量 0.5 g のイシクラゲから EPS を除去する過程におけるクロロフィル量の変化および収率

Table 1. The yields of Chl *a* during the process of cell purification from 0.5 g of *Nostoc commune* colony.

	クロロフィル量 ^a ($\mu\text{g Chl } a$)	収率 (%) ^b	乾燥重量あたりの クロロフィル量 ^c ($\mu\text{g Chl } a / \text{mg dw}$)
イシクラゲ群体 <i>Nostoc</i> colony	146.82 (± 25.20)	100.0	0.28 (± 0.06)
フィルター濾過後 After filtration	127.25 (± 32.89)	92.8 (± 1.3)	0.28 (± 0.06)
10% Percoll 遠心前 Before separation by 10% Percoll	118.77 (± 23.15)	81.0 (± 10.4)	no data
10% Percoll 遠心後 After separation by 10% Percoll	82.28 (± 10.32)	57.2 (± 12.8)	no data
最終単離細胞 Final purified cells	53.97 (± 11.95)	36.8 (± 6.3)	3.36 (± 0.13)

^a 100% メタノールでクロロフィルの抽出を行い、665 nm での吸光度によりクロロフィル量を求めた。

^b 出発材料を 100% として、各単離過程のクロロフィル量から計算した。

^c 乾燥後の重量でクロロフィル量を割った値。フィルター濾過後の乾燥重量はすり潰し前の値から濾過残渣の乾燥重量を引いて求めた。

^a Chlorophyll contents: Chlorophyll *a* was extracted using 100% methanol, and the Chl *a* amounts were calculated using the absorbance at 665 nm.

^b Yields (%): These were estimated based on the amount of Chl *a* at each purification step.

^c The chlorophyll contents per dry weight: The dry weight of filtrate was estimated as: (dry weight of *Nostoc* colony before grind) – (dry weight of filtration residue).

の細胞当たりのクロロフィル *a* の含有量が春から秋にかけて 2 倍ほどになり、その変化割合は生育環境によっても変動することを示している。したがって、本研究と前出研究のクロロフィル量の差は採集した生育環境の違いに由来するものであり、精製後の乾燥重量当たりのクロロフィルの割合が小さな値となったのは、単離手法の違いによるものではないと推察される。

今後この単離法を活用し、南極に生育するイシクラゲの光合成特性と極域環境で EPS が果たしている役割の重要性を明らかにしていく予定である。

謝 辞

本研究の一部は国立極地研究所プロジェクト研究「環境変動に対する極域生物の生態的応答プロセスの研究」、および日本学術振興会科学研究費助成事業（研究課題番号：24770030）により行われた。

文 献

- Bowker, M.A., Reed, S.C., Belnap, J. and Phillips, S.L. (2002): Temporal variation in community composition, pigmentation, and F_v/F_m of desert cyanobacterial soil crusts. *Microbial. Ecol.*, **43**, 13–25, doi: 10.1007/s00248-001-1013-9.
- Bowness, J.M. (1956): Application of carbazole reaction to the estimation of glucuronic acid and glucose in some acidic polysaccharides and in urine. *Biochem. J.*, **67**, 295–300.
- Dische, Z., (1947): A new specific color reaction of hexuronic acids. *J. boil. Chem.*, **167**, 189–198.
- Gutierrez, C., Bernabe, R.R., Vega, J. and Kreisler, M. (1979): Purification of human T and B cells by a discontinuous density gradient of percoll. *J. Immunol. Methods*, **29**, 57–63, doi: 10.1016/0022-1759(79)90125-X.
- Helm, R.F., Huang, Z., Edwards, D., Lessone, H., Peery, W. and Potts, M. (2000): Structural characterization of the released polysaccharide of desiccation-tolerant *Nostoc commune* DRH-1. *J. Bacteriol.*, **182**, 974–982, doi: 10.1128/JB.182.4.974-982.
- Hill, D.R., Peat, A. and Potts, M. (1994): Biochemistry and structure of the glycan secreted by desiccation-tolerant *Nostoc commune* (Cyanobacteria). *Protoplasta*, **182**, 126–148, doi: 10.1007/BF01403474.
- Hill, D.R., Keenan, T.W., Helm, R.F., Potts, M., Crowe, L.M. and Crowe, J.H. (1997): Extracellular polysaccharide of *Nostoc commune* (Cyanobacteria) inhibits fusion of membrane vesicles during desiccation. *J. Appl. Phycol.* **9**, 237–248, doi: 10.1023/A:1007965229567.
- Kosugi, M., Katashima, Y., Aikawa, S., Tanabe, Y., Kudoh, S., Kashino, Y., Koike, H. and Satoh, K. (2010): Comparative study on the photosynthetic properties of *Prasiola* (Chlorophyceae) and *Nostoc* (cyanophyceae) from Antarctic and non-Antarctic sites. *J. Phycol.* **46**, 466–476, doi: 10.1111/j.1529-8817.2010.00831.x.
- Lakatos, M., Bilger, W. and Büdel, B. (2001): Carotenoid composition of terrestrial cyanobacteria: response to natural light conditions in open rock habitats in Venezuela. *Eur. J. Phycol.*, **36**, 367–375, doi: 10.1080/09670260110001735518.
- Mills, W.R. and Joy, K.W. (1980): A rapid method for isolation of purified, physiologically active chloroplasts, used to study the intracellular distribution of amino acids in pea leaves. *Planta*, **148**, 75–83.
- Ohtani, S. (1986): Epiphytic algae on mosses in the vicinity of Syowa Station, Antarctica. *Mem. Natl Inst. Polar Res. Spec. Issue*, **44**, 209–219.
- Porra, R.J., Thompson, W.A. and Kriedemann, P.E. (1989): Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents; verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, **975**, 384–394.
- Proteau, P.J., Gerwick, W.H., Garcia-Pichel, F. and Castenholz, R. (1993): The structure of scytonemin, an ultraviolet sunscreen pigment from the sheaths of cyanobacteria. *Cell. Mol. Life Sci.*, **49**, 825–829.
- Sharpe, P.T. (1988): Methods of cell separation. Amsterdam, Elsevier, 18–68 (Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology; v. **18**).
- Shumacher, M., Schafer, G., Holstein, A.F. and Hilz, H. (1978): Rapid isolation of mouse leydig cells by centrifugation in percoll density gradients with complete retention morphological and biochemical integrity. *FEBS Lett.*, **91**, 333–338.
- Tamaru, Y., Takani, Y., Yoshida, T. and Sakamoto, T. (2005): Crucial role of extracellular polysaccharides in desiccation and freezing tolerance in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Appl. Environ. Microb.*, **71**, 7327–7333, doi: 10.1128/AEM.71.11.7327-7333.2005.