

Les méthodes d'isolement et de purification des Cyanophycées

Pierre Armand ROGER et Pierre Adrien REYNAUD
*O.R.S.T.O.M., Laboratoire de Microbiologie,
Centre de Dakar, B.P. 1386, Dakar, Sénégal*

RÉSUMÉ

Revue bibliographique sur les méthodes d'axénisation des Cyanophycées. 60 références.

MOTS CLÉS : Cyanobactéries - isolement - purification - revue.

ABSTRACT

Review on Cyanophyceae purification methods. 60 references.

KEY WORDS : Cyanobacteria - isolation - purification - review.

INTRODUCTION

Les Cyanophycées sont des organismes unicellulaires ou filamenteux qui se développent le plus souvent sous forme de colonies gélatineuses ou de voiles. Plusieurs espèces sont souvent associées et le mucus qu'elles secrètent abrite une flore bactérienne importante. Il en résulte une certaine difficulté à isoler des souches axéniques et ce n'est qu'en 1913 que la première culture incontestablement pure fut obtenue par Pringsheim.

Depuis cette date de nombreux auteurs se sont penchés sur le problème de la purification des Cyanophycées et l'on pourra à ce sujet consulter les revues et articles généraux de Pringsheim (1946), Allen (1952), Lewin (1959), Gussev (1964), Tassigny (1969), Venkataraman (1969).

L'obtention d'une culture axénique s'effectue en deux stades : 1° Obtention d'une culture unialgale en passant ou non par l'intermédiaire d'une culture enrichie en Cyanophycées. 2° Purification de la culture unialgale.

1. OBTENTION DE CULTURES UNIALGALES

La préparation de cultures unialgales de Cyanophycées ne pose pas de difficultés importantes : un étalement sur boîte de Petri de suspensions-dilutions de sol ou d'eau, suivi de repiquages successifs, donne généralement de bons résultats. Toutefois, le développement plus rapide de certains microorganismes (Bac-

téries, autres Algues...) inhibe parfois le développement des Cyanophycées (Gerloff, 1950).

Il peut donc être nécessaire de procéder préalablement à une culture d'enrichissement. Différents facteurs tels que la température, la composition du milieu, certains composés organiques, peuvent être utilisés (Reynaud *et al.*, 1977) :

— Hilton *et al.* (1963) utilisent une gamme de température entre 22°C et 38°C pour isoler sélectivement différentes espèces d'Algues. Les Cyanophycées sont favorisées par les températures les plus élevées.

— Allen *et al.* (1968) montrent que dans un milieu minéral non sélectif qui à 25°C permet le développement de Cyanophycées et de nombreuses Algues eucaryotes, le développement des Algues eucaryotes est inhibé à 35°C. D'autre part, le nombre et la variété des Cyanophycées qui se développent dans le milieu sont plus importants à 35 qu'à 25°C. Enfin quand le milieu est carencé en azote, seules les Cyanophycées formant des hétérocystes se développent aussi bien à 25 qu'à 35°C.

— Zehnder *et al.* (1958) signalent les propriétés intéressantes de l'actidione (cycloheximide) qui inhibe la croissance des Chlorophycées, Xantophycées et Bacillariophycées mais pas celle des Cyanophycées. Ce produit est aussi actif sur beaucoup de Champignons, spécialement sur les Levures, par contre il est inactif sur les Bactéries.

Une fois les cultures enrichies obtenues, l'isolement des souches unialgales pourra être fait soit par repiquages successifs soit par des techniques de micro-manipulation (Lewin, 1959).

Il convient de signaler, pour cette dernière technique, le dispositif peu coûteux mis au point par Kemp (1970) qui est une version simplifiée du micro-manipulateur de Barer et Saunders-Singer (1948).

2. OBTENTION DE SOUCHES AXENIQUES

La purification des cultures unialgales est difficile en raison des Bactéries contaminantes qui adhèrent à la

gaine mucilagineuse des Cyanophycées dans laquelle elles trouvent des substrats carbonés, de l'azote et peut-être des vitamines.

Pour cette raison on a intérêt à travailler sur de jeunes cultures dans lesquelles il n'y a pas encore eu libération suffisante de composés organiques pour permettre un développement important de la flore bactérienne et sur des organismes pauvres en mucilage ou qui en sont dépourvus (jeunes trichomes ou hormogonies).

Les méthodes de purification peuvent se classer en trois grandes catégories :

- Purification par manipulation :
 - repiquages successifs;

- lavages en milieu stérile;
- ensemencements en gelose profonde.
- Purification par action d'agents chimiques :
 - produits bactériostatiques ou bactériolytiques;
 - antibiotiques.
- Purification par action d'agents physiques :
 - température;
 - irradiation gamma;
 - irradiation aux U.V.;
 - pression.

2.1. PURIFICATION PAR MANIPULATIONS

La méthode des repiquages successifs sur différents milieux a été la première employée (tabl. I). Toutefois

TABLEAU I
METHODES DE PURIFICATION PAR MANIPULATION

METHODE	AUTEURS	SOUCHES PURIFIEES	REMARQUES
Passages successifs sur : (1) bloc de gypse (2) agar minéral (3) silicogel (4) agar organique.	PRINGSHEIM 1913	<i>Nostoc</i> sp. <i>Oscillatoria</i> sp.	Cité par ALLEN (1952)
Repiquages successifs sur milieu gelosé.	HARDER 1917 DREWES 1928 STANIER 1971	<i>Nostoc punctiforme</i> , <i>Oscillatoria</i> sp. <i>Anabaena</i> sp., <i>Cylindrospermum</i> sp. <i>Nostoc</i> sp. Unicellulaires	
Repiquages successifs sur silicogel et prélèvement sous le microscope.	DE P.K 1939	<i>Anabaena</i> sp. <i>Phormidium</i> sp.	
Utilisation des propriétés phototropes.	CATALDI 1941 STANIER 1971	<i>Oscillatoria</i> sp. —n—	Cité par ALLEN (1952)
Ensemencement sur gelose droite en tube. Lorsque le développement des algues devient visible on recouvre avec 3 à 5 mm de milieu gelosé (avec ou sans antibiotiques) et de qq cm de milieu non gelosé. Après 5 à 10 j d'incubation le milieu liquide contient des hormogonies dont certaines sont pures. On effectue alors un repiquage sur boîte.	BUNT 1961	<i>Nostoc</i> . <i>Gloeotrichia</i> <i>Anabaena</i>	Applicable uniquement aux algues produisant des hormogonies. On peut induire la formation d'hormogonies par un traitement à AIA.
Isolement d'hormogonies par ensemencement en gelose profonde.	VAN BAALEN 1962	Espèces marines	
Isolement par repiquages successifs à la dilution maximale pour laquelle les algues se développent en donnant des colonies les plus espacées possible. Prélèvement à la micropipette.	TISCHER 1965	<i>Anabaena flos-aquae</i>	
— fractionnement aux ultra-sons — lavages répétés par mise en suspension et centrifugation. — repiquage sur boîte de Petri.	BROWN <i>et al</i> 1962 WIEDERMAN <i>et al.</i> 1964 TASSIGNY <i>et al.</i> 1969.		

la pureté des premières cultures obtenues par Tischutkin (1897), Bouilhac (1898), Beijerinck (1902) est contestée (Allen, 1952) et ce n'est qu'en 1913 que Pringsheim arrive à purifier de façon indubitable deux *Oscillatoria* et un *Nostoc*. Harder (1917) isole *Nostoc punctiforme* et trois autres espèces en utilisant d'abord la technique de Pringsheim puis des repiquages successifs sur milieu gélosé.

Par repiquages successifs avec étalement sur le même milieu gélosé on a pu purifier des formes filamenteuses (Drewes, 1928; De, 1939) toutefois la technique est plus efficace avec les formes unicellulaires immobiles (Stanier, 1971).

Cette méthode de purification a été perfectionnée par Tischer (1965) qui effectue les ensemencements à la dilution maximale pour laquelle les algues se développent en donnant des colonies les plus espacées possible. Il effectue les prélèvements à la micropipette. Une méthode par repiquages en gélose profonde est mise au point par Wurtz (1948). Aitken (1947) effectue un ensemencement en gélose profonde suivi d'un lavage par une solution à 1 % de $Mg Cl_2$.

Une méthode plus complexe est employée par Brown *et al.* (1962), Wiederman *et al.* (1964), Tassigny *et al.* (1969) : les filaments sont d'abord fractionnés par passage aux ultrasons puis lavés plusieurs fois par centrifugation en milieu stérile avant d'être ensemencés

sur boîte de Petri. L'ensemble des opérations est répété jusqu'à l'obtention de cultures pures.

D'autres méthodes (tabl. I) font appel aux propriétés phototropes des Cyanophycées (Cataldi, 1941; Stanier, 1971) ou à la mobilité des hormogonies.

Cette dernière, mise au point par Bunt (1961) et reprise par Van Baalen (1962) consiste à ensemencer une très faible quantité d'algues sur gelose en tube. Lorsque le développement des algues commence à être visible à l'œil nu on recouvre les colonies d'une couche de trois à cinq millimètres de milieu gélosé et de quelques cm de milieu liquide. Après 5 à 10 j d'incubation le milieu liquide contient des hormogonies dont certaines sont pures et servent d'inoculum pour ensemencements sur boîte.

En utilisant des techniques de micromanipulation sur des hormogonies et akinètes Bowyer et Skerman (1968) purifient des espèces endophytes.

2.2. PURIFICATION PAR ACTION D'AGENTS CHIMIQUES

2.2.1. Produits bactériostatiques et bactériologiques

De nombreux traitements ont été essayés avec plus ou moins de succès :

- Rhododate de potassium (Bojanovsky, 1938);
- Milieu de culture sulfuré (Allen, 1952);

TABLEAU II
METHODES DE PURIFICATION PAR AGENTS CHIMIQUES

METHODE	AUTEURS	SOUCHES PURIFIEES	REMARQUES
Action du rhododate de potassium	BOJANOVSKI 1938		Cité par TAHA (1963)
Utilisation d'un milieu sulfuré	ALLEN 1951	<i>Oscillatoria</i> sp.	
Action de l'acide salicylique du β naphtol	WAI-NGANSHOU 1955		Cité par TAHA (1963)
Action conjuguée d'un détergent et une solution à 1 % de phénol	Mc DANIEL 1962	<i>Anacystis nidulans</i>	
Action de la caféine	BOWNE 1964		Cités par TASSIGNY (1969)
Action du tellure de potassium	DUKER 1964		
Trempe de spores dans une solution d'hypochlorite de Na à 2 % pendant 5 minutes – Lavage – Ensemencement sur boîte de Petri	TASSIGNY 1969	<i>Mastigocladus laminosus</i>	Applicable uniquement aux espèces formant des akinètes
Action conjuguée d'une solution à 1 % de $11 g Cl_2$ et d'un ensemencement en gélose profonde	AITKEN 1947		

- Acide salicylique du β naphtol (Wai-Nganshou, 1955);
- Caféine (Bowne, 1964). Signalons que cette dernière présente l'inconvénient d'avoir des effets sur la croissance et la division de certaines Algues (Hinz, 1974);
- Tellure de Potassium (Duker, 1964);
- Action d'un détergent et d'une solution à 1 % de phénol (Mc Daniel, 1962);
- Hypochlorite de Sodium (Tassigny, 1969).

2.2.2. Antibiotiques (tabl. III).

L'action des antibiotiques sur les algues (Foter *et al.*, 1953, Hunter *et al.*, 1961) est très variable et peut aller jusqu'à l'induction de mutants (Provasoli *et al.*, 1948). Cependant de nombreuses algues supportent des concentrations en antibiotiques plus élevées que celles acceptées par les Bactéries (Droop, 1967, Galloway, 1959) et cette propriété a été utilisée pour obtenir des souches axéniques (Goldzweig-Shelubsky, 1951; Droop, 1967;

Tassigny *et al.*, 1969). Malheureusement l'exception à la règle est constituée par les Cyanophycées et de nombreux essais de purification par cette méthode ont échoué (Tchan *et al.*, 1961). Provasoli *et al.* (1951) ont pu purifier *Phormidium persenicum*, au moyen de pénicilline et de streptomycine associées. Vance (1966) arrive à obtenir une souche axénique de *Microcystis aeruginosa* mais qui n'est pas viable.

Des résultats plus intéressants ont pu être obtenus en utilisant les antibiotiques associés à une autre méthode de purification :

- gélose profonde (Bunt, 1961);
- U.V. (Stewart, 1962).

2.3. PURIFICATION PAR ACTION D'AGENTS PHYSIQUES (tabl. IV)

2.3.1. Température

Wieringa (1968) a mis au point une méthode valable uniquement pour les Cyanophycées produisant des

TABLEAU III
METHODES DE PURIFICATION PAR LES ANTIBIOTIQUES

METHODE	AUTEURS	SOUCHES PURIFIEES	REMARQUES
Penicilline et Streptomycine associées	PROVASOLI <i>et al.</i> 1951	<i>Phormidium persenicum</i>	
Penicilline – Streptomycine seules ou associées.	GOLDZWEIG – SHELUBSKY. 1951 SPENCER 1952		Non employée sur les Cyanophycées.
Polymixine B	GALLOWAY <i>et al.</i> 1959		
Liste des antibiotiques utilisés sans succès pour purification des Cyanophycées.	TCHAN <i>et al.</i> 1961		
Utilisation conjuguée des U.V. et des antibiotiques (aureomycine + polymixine B sulphate).	STEWART 1962	<i>Calothrix scopularum</i> <i>Nostoc eutophyllum</i> <i>Oscillatoria brevis</i>	
Neomycine – Streptomycine seules ou associées	VANCE 1966	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Diminution du nombre de bactéries associées. Mais la souche pure n'est pas viable.
Utilisation d'une gamme de concentrations croissantes de différents antibiotiques.	DROOP 1967		Nom employée sur les Cyanophycées.
– Isolement de Bactéries associées – Détermination de la sensibilité de ces germes aux antibiotiques. – Choix des antibiotiques.	TASSIGNY <i>et al.</i> 1969		Non employée sur les Cyanophycées.

TABLEAU IV
METHODES DE PURIFICATION PAR AGENTS PHYSIQUES

METHODE	AUTEURS	SOUCHES PURIFIEES	REMARQUES
Exposition de 0 à 30 minutes à 20-30 cm d'une lampe à vapeur de mercure. La culture placée dans des tubes de quartz est agitée et refroidie.	BORTELS, 1940 ALLISON, 1930 GERLOFF, 1950 FOGG, 1951 ZSUZSA, 1959 VENKATARAMAN, 1959		La méthode peut être employée sur une culture unialgale ou sur un mélange d'algues.
Enlèvement de la gaine mucilagineuse au moyen d'un détergent d'origine végétale puis exposition aux U.V.	VAIDYA, 1975	<i>Oscillatoria</i>	Le détergent a un effet bactericide
Action conjuguée des UV et des antibiotiques (aureomycines 4 µg/ml + polymyxine B sulphate 30 U/ml) sur des algues au stade d'hormogonies. La méthode est répétée jusqu'à obtention de cultures pures.	STEWART, 1962	Souches filamenteuses diverses	
Irradiation par les UV de jeunes trichomes et d'hormogonies obtenus après filtration d'une jeune culture sur laine de verre.	TAHA, 1963	<i>Anabaena variabilis</i> <i>Hapalosiphon fontinalis</i> <i>Calothrix elenkinii</i>	L'auteur n'a pu purifier les souches adultes à gaine mucilagineuse.
Irradiation γ - source de cobalt 60 a \approx 260 Krads.	KRAUS, 1966	16 Cyanophycées	Stimulation de la croissance de certaines souches
Des fractions de culture sont placées à 47-48° C pendant 15, 30, 45 mn et plus si des akinètes sont présents et les Bactéries sporulées absentes, des cultures pures sont obtenues.	WIERINGA, 1968	<i>Anabaena variabilis</i> "azollae" <i>Nostoc piscinale</i> <i>Nostoc paladosum</i> <i>Nostoc muscorum</i> <i>Nodularia</i> sp. <i>Microchaete</i> sp.	
Pression de 12 000 Lb/sq inch	MIDDLEBROOK et al. 1964		

akinètes et fondée sur le fait que ces derniers restent viables après exposition de 10 minutes à 70-80°C à l'état humide ou 90°C à l'état sec alors que les Bactéries non sporulées ne résistent pas. Des fractions de culture sont placées à l'étuve à température convenable. Si des akinètes sont présents et les Bactéries sporulées absentes, des cultures pures sont obtenues.

2.3.2. Irradiation γ

Kraus (1966) utilise les radiations gamma pour la purification de seize souches de Cyanophycées. Les meilleurs résultats sont obtenus par une irradiation de 260 Krads.

Les souches purifiées ne présentent pas de changements importants de morphologie ou de physiologie si ce n'est une certaine stimulation de la croissance pour les souches filamenteuses et une augmentation de la perméabilité membranaire (Rathsack, 1968).

2.3.3. Irradiation aux U.V.

Cette technique est fondée sur le fait que les Cyanophycées sont généralement moins sensibles à une irradiation U.V. que les Bactéries. Les différentes méthodes utilisées dérivent toutes de celle décrite par Bortels (1940) : la culture à purifier est agitée dans un récipient de quartz placé sous une lampe à U.V. ($\lambda \approx 2500 \text{ \AA}$). On effectue à intervalles réguliers des

prélèvements stériles qui servent d'inoculum pour étalement sur plaque.

Cette méthode a été utilisée avec succès par de nombreux auteurs (Fogg, 1951; Gerloff, 1950; Allison, 1930; Venkataraman *et al.*, 1959; Zsuzsa, 1959; Stewart, 1962).

La principale critique que l'on puisse faire à cette méthode est la possibilité d'apparition de mutants comme l'ont montré Singh (1964) et Van Baalen (1968) en travaillant dans des conditions similaires à celles utilisées pour la purification.

Taha (1963) travaillant sur *Anabaena variabilis*, *Haplosiphon fontinalis* et *Calothrix elenkini* n'est pas parvenu à purifier les souches adultes possédant une gaine mucilagineuse. Par contre il a isolé des souches axéniques à partir de jeunes trichomes et d'hormogonies obtenus par filtration d'une jeune culture sur laine de verre.

Vaidya (1975) a pu axéniser une souche d'*Oscillatoria* grâce à un décapage préliminaire de la gaine mucilagineuse au moyen d'un détergent d'origine végétale (extrait aqueux de *Sapindus paurifoliosus*) suivi d'une exposition aux U.V.

2.3.4. Pression.

Middlebrook et Bowman (1964), utilisent le fait que les Algues ont une résistance à la pression supérieure à celle des Bactéries et des Champignons.

2.4. VÉRIFICATION DE LA PURETÉ DES SOUCHES

Une première vérification consiste à effectuer un examen microscopique de la culture au stade de la sénescence (Stanier, 1971). Si l'on n'observe pas de contaminants, la pureté des souches est vérifiée par inoculation dans des milieux favorisant le développement de ceux-ci.

Il semble prudent de ne conclure à la pureté d'une souche qu'après l'avoir testée au moins sur :

- 1 milieu pour microflore bactérienne totale
- 1 milieu pour germes anaérobies
- 1 milieu pour Champignons.

Le tableau V regroupe les différents milieux utilisés par les auteurs précédemment cités.

TABLEAU V
MILIEUX POUR VERIFICATION DE LA PURETE DES SOUCHES

Microorganismes mis en évidence	BACTERIES			CHAMPIGNONS
	AEROBIES	FIXATRICES D'N ²	ANAEROBIES	
GERLOFF <i>et al.</i> 1950	Extrait de levure, dextrose Agar, Caseine,	Milieux de Burk et de Ashby	Milieu de Brewei	
ALLEN 1951	milieu à 10 % d'extrait de levure + 2 % de glucose " " " " " " " " + 2 % Carbonate de Ca			
FOGG, 1951	Agar, Caseine, Agar lactopeptone, Agar peptone, dextrose	Milieu pour <i>Anabaena</i> + 2 % mannitol.		
ZSUZSA <i>et al.</i> 1959	Agar, glucose, peptone. Agar à l'extrait de viande		Agar organique de Feher	
VENKATARAMAN <i>et al.</i> 1959	Milieu à l'extrait de terre, saccharose et nitrate			
STEWART, 1962	Agar, dextrose, extrait de levure/ Agar ; dextrose, extrait de pomme de terre/ Agar, extrait de viande/ Agar, malt, extrait de levure, peptone Agar, amidon soluble/ milieu d'Ashby milieu/de Hussain Aleem pour Azotobacter.			
TAHA, 1963	Agar, glucose, blanc d'oeuf/Agar, extrait de sol, nitrate, saccharose/ Agar, glucose, extrait d'algues/ Agar, peptone, extrait de viande, NaCl. Agar, extrait de pomme de terre/ Agar, petit lait/ Milieu pour Algues et Bactéries permettant l'isolement des Bactéries associées.			
TASSIGNY, 1969	Bouillon nutritif pour Bactéries.		Milieu au thioglycolate.	Milieu de Sabouraud liquide
STANIER, 1971	Milieu liquide complexe : extrait de levure, glucose – vérification microscopique.			

3. CONCLUSION

Les méthodes employées pour axéniser les Cyanophycées sont nombreuses mais aucune n'est universelle et l'on sera parfois amené à utiliser plusieurs techniques avant d'obtenir une souche pure.

Dans ces conditions il semble logique de commencer par utiliser les méthodes faisant appel à des techniques de manipulation ou aux propriétés particulières de l'algue (présence d'akinètes, d'hormogonies, etc.) avant d'utiliser les techniques susceptibles de provoquer des mutations (U.V., rayonnement gamma, antibiotiques).

Enfin il convient de garder présent à l'esprit que de nombreuses souches ont pu être axénisées par repiquages successifs en utilisant, lorsqu'elles existent, les propriétés phototropes de l'algue (Stanier, 1971).

La méthode est sans doute longue et astreignante mais ne risque pas de modifier les caractéristiques physiologiques de la souche.

Manuscrit reçu au Service des Publications le 11 mai 1977

BIBLIOGRAPHIE

- AITKEN (M.), 1947. — Isolation of blue-green algae for pure culture. *Proc. Indian Acad. Sci.*, 56 : 77-79.
- ALLEN (M.B.), 1952. — The cultivation of Myxophyceae. *Arch. Mikrobiol.*, 17 : 34-35.
- ALLEN (M.M.), STANIER (R.Y.), 1968. — Selective isolation of blue-green algae from water and soil. *J. Gen. Microbiol.*, 51 : 203-209.
- ALLISON (F.R.), MORRIS (H.J.), 1930. — Nitrogen fixation by blue-green algae. *Science*, NS., 71 : 221-223.
- BARER (R.), SAUNDERS-SINGER (A.A.), 1948. — A new single-control micromanipulator. *Q. Jl. microsc. Sci.*, 89 : 439-447.
- * BELJERINCK (M.W.), 1902. — (Allen, 1952), *Proc. Kon. Akad. Wetensch.* Amsterdam, 4-5.
- * BOJANOVSKI (R.), 1938. — (Taha, 1963), *Ztbl. Bakt. Abt.*, 2 (1-4) 55.
- BORTELS (H.), 1940. — Ueber die Bedeutung des Molybdans für Stickstoff - bindende Nostocaceen. *Arch. Mikrobiol.*, 2 : 155-186.
- * BOUILHAC (R.), 1897. — (Allen, 1952), *C. R. Acad. Sci. Paris*, 125, 800.
- * Article non consulté, cité par l'auteur dont le nom figure entre parenthèses.
- * BOWNE (S.W.), 1964. — (Tassigny, 1969), Purification of algal cultures with caffeine. *Nature*, London, 204, 801.
- BOWYER (J.W.), SKERMAN (V.B.D.), 1968. — Production of axenic cultures of soil-borne and endophytic blue-green algae. *J. Gen. Microbiol.*, 54 : 299-306.
- BROWN (H.R.), BISCHOFF (M.W.), 1962. — A new and useful method for obtaining axenic cultures of algae. *Phycol. News. Bull.*, 19 : 43-44.
- BUNT (J.S.), 1961. — Isolation of bacteria-free cultures from hormogones producing blue-green algae. *Nature*, London, 192, 1276.
- * CATALDI, 1941. — (Allen, 1952), *Darwinia*, 5, 228.
- DE (P.K.), 1939. — The role of blue-green algae in nitrogen fixation in rice fields. *Proc. Roy. Soc. Lond.*, 127 : 121-139.
- DREWES (K.), 1928. — Ueber die Assimilation des Luftstickstoffs durch Blaualgen. *Entr. Bakteriologie. Parasitenkunde. Abt.*, II, 76 : 88-101.
- DROOP (M.R.), 1967. — A procedure for routine purification of Algal cultures with antibiotics. *Brit. Phycol. Bull.*, 3 : 295-299.
- * DUKER (S.C.), WILLOUGBY (L.G.), 1964. — (Tassigny, 1969), Potassium tellurite as a bacteriostatic agent in isolating algae. *Nature*, London, 202 (4928) : 210-211.
- FOGG (G.E.), 1951. — Studies on nitrogen fixation by blue-green algae : II. Nitrogen fixation by *Mastigocladus laminosus*. *J. Expt. Bot.*, 2 : 117-120.
- FOTER (M.J.), PALMER (C.H.), MALONEY (T.E.), 1953. — Antialgal properties of some antibiotics. *Antibiotics Chemotherapy*, 3 : 503-508.
- GALLOWAY (R.A.), KRAUSS (R.W.), 1959. — The differential action of chemical agents especially polymixin B on certain algae, bacteria and fungi. *Am. J. Botany*, 46 : 40-49.
- GERLOFF (G. C.), FITZGERALD (G. P.), SKOOG (F.), 1950. The isolation, purification and culture of blue-green algae. *Am. J. Botany*. 37 : 216-218.
- GOLDZWEIG-SHELUBSKY (M.), 1951. — The use of antibiotic substances for obtaining mono-algal bacteria-free cultures. *Palestine Jour. Bot. Jérusalem*. 5 : 129-131.
- GUSSEV (M. V.), 1964. — Principes of isolations, purification and cultivation of blue-green algae in « Biology of the blue-green algae » ed by V. D. FEDOROV and M. M. TELITCENKO.
- * HARDER (R.), 1917. — *Z. Bot.*, 9 : 145.
- HILTON (R. L.), TRAINOR (F. R.), 1963. — Algae from a Connecticut soil. *Plant and Soil.*, 19 (3) : 396-399.

- HINZ (F. A.), 1974. — Untersuchungen über Wachstum und Vermehrung von Grünalgen unter Coffeineinfluss. *Arch. Protistenk.*, 116 : 295-303.
- HUNTER (E. D. Jr.), McVEIGHT (I.), 1961. — The effect of selected antibiotics on pure culture of algae. *Am. J. Bot.*, 48 : 179-185.
- KEMP (R. F.), 1970. — A new, cheap, high-power micro-manipulator. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 55 (3) : 493-496.
- KOCH (W.), 1964. — Cyanophyceenkulturen, Anreicherung und Isolierverfahren. *Zentbl. Bakt. Parasitenkunde* (I) supplement Heft 1, 415.
- KRAUS (M. P.), 1966. — Preparation of pure blue-green algae. *Nature*, London, 211 (5043) : 310.
- LEWIN (R. A.), 1959. — The isolation of algae. *Rev. Algol.*, 3 : 181-197.
- MCDANIEL (M. R.), MIDDLEBROOK (J. B.), BOWMAN (R. O.), 1962. — Isolation of pure culture of algae from contaminated cultures. *Appl. Microbiol.*, 10 : 223.
- MIDDLEBROOK (J. B.), BOWMAN (R. O.), 1964. — Preparation of axenic cultures of algae by use of a French press. *Appl. Microbiol.*, 12 : 44.
- * PRINGSHEIM (E. G.), 1946. — (Allen, 1952), Pure cultures of algae. Cambridge University Press.
- PROVASOLI (L.), HUNTER (S. H.), SCHATZ (A.), 1948. — Streptomycin induced chlorophyll-less races of *Euglena*. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 69 : 279-282.
- PROVASOLI (L.), PINTER (I. J.), PACKER (L.), 1951. — Use of antibiotics on obtaining pure culture of algae and protozoa. *Proc. Am. Soc. Protozoll.*, 2 : 6.
- RATHSACK (R.), LOHS (K. H.), 1968. — Veränderungen im Blaualgenmedium nach Röntgenbestrahlung. *Studia biophysica*, 6 (1) : 49-56.
- REYNAUD (P. A.), ROGER (P. A.), 1977. — Milieux sélectifs pour la numération des Algues eucaryotes, procaryotes et fixatrices d'azote. *Rev. Ecol. Biol. Sol.* (sous presse).
- SINGH (R. N.), SINGH (H. N.), 1964. — Ultraviolet induced mutants of blue-green algae. I) *Anabaena cycadeae*. *Arch. Mikrobiol.*, 48 (2) : 102-117.
- SPENCER (C. P.), 1952. — On the use of antibiotics for isolating bacteria-free cultures of marine phytoplankton organisms. *J. mar. Biol. Ass. UK.*, 31 : 97-106.
- STANIER (R. Y.), KUNISAWA (R.), MANDEL (H.), COHEN-BAZIRE (G.), 1971. — Purification and properties of unicellular blue-green Algae. (order Chroococales). *Bacteriol. Reviews*, 35 (2) : 171-205.
- STEWART (W. D. P.), 1962. — Fixation of elemental nitrogen by marine blue-green algae. *Ann. Botany*, London. NS., 26 : 439-445.
- TAHA (M. S.), 1963. — Isolation of pure cultures of nitrogen-fixing blue-green algae from soil of rice fields in Egypt. *Microbiologia.*, 32 : 492-497.
- TASSIGNY (M.), LAPORTE (G.), POURRIOT (R.), 1969. — Recherches sur les techniques de purification des cultures algales : élaboration des méthodes applicables aux Desmidiacées et Cyanophycées filamenteuses. Diatomées. *Ann. Inst. Past.*, Paris, 117 : 64-75.
- TCHAN (Y. T.), GOULD (J.), 1961. — Blue-green algae. *Nature*, London, 192 : 1274.
- TISCHER (R. G.), 1965. — Pure culture of *Anabaena flos-aquae* A 37. *Nature*, London, 205 (4669) : 419-420.
- * TISCHUTKIN (N.), 1897. — (Allen, 1952), *Zbl. Bakt.*, 3 : 183.
- VAIDYA (B. S.), MEHTA (U. B.), 1975. — A method of getting bacteria-free culture of blue-green alga *Oscillatoria*. *Curr. Sci.*, 44 (15) : 563.
- VAN BAALLEN (C.), 1962. — Studies on marine blue-green algae. *Botan. Mar.*, 4 : 129-139.
- VAN BAALLEN (C.), 1968. — The effect of U.V. irradiation on a coccoid blue-green alga survival, photosynthesis and photoreaction. *Plant. Physiol. USA.*, 43 (10) : 1689-1695.
- VANCE (B. D.), 1966. — Sensitivity of *Mycrocystis aeruginosa* and other blue-green alga and associated bacteria to selected antibiotics. *J. Phycol.*, 2 (3) : 125-128.
- VENKATARAMAN, DUTTA, NATARAJAN, 1959. — Studies on nitrogen fixation by blue-green algae. I) Nitrogen fixation by *Cylindrospermum sphaerica*. *J. Indian Bot. Soc.*, 38 (1) : 114-119.
- VENKATARAMAN (G. S.), 1969. — In "The cultivation of Algae", I.C.A.R., New Delhi.
- * WAI NGANSHOU, 1955. — (Taha, 1963), *Physiol. Plantarum*, 8 : 1-71.
- WIEDERMAN (V. E.), WALNE (P. L.), TRAINOR (F. B.), 1964. — A new technique for obtaining axenic cultures of algae. *Can. J. Bot.*, 7 : 958-959.
- WIERINGA (K. T.), 1968. — A new method for obtaining bacteria free cultures of blue-green algae. *Antonie van Leeuwenhoek*, 34 : 54-56.
- WURTZ (A.), 1948. — Croissance et isolement d'algues en gélose profonde. *C.R. Soc. Biol.*, 142 : 649-652.
- ZEHNDER (A.), HUGUES (E. O.), 1958. — The antialgal activity of actidione. *Can. J. Microbiol.*, 4 : 399-408.
- ZSUZSA (K. F.), FELFOLDY (L. J. M.), 1959. — Notes on the method for preparing bacteria-free cultures of green algae by ultra-violet irradiation. *Ann. Bot. Tihany.*, 26 : 343-347.