DOI: https://doi.org/10.54172/mjsc.v24i1.533

نمو الطحلب الأخضر أنكستروديزمس تحت نسب مختلفة من النيتروجين والفسفور مع إلقاء الضوء على التصنيف الجزيئي لثلاثة أنواع من هذا الجنس

إدريس حمد عطية الله* حنان محمد أبوبكر* مفتاح عبد الواحد الحرير* فرج محمد شعيب*

الملخص

تم عزل وتنقية ثلاثة أنواع من جنس الانكستروديذمس Ankistrodesmus من بحيرة سلوق – بنغازي ، احد أفرع النهر الصناعي العظيم ، وزراعتهم باستخدام المزارع الساكنة وأسفر البحث عن نتائج أهمها :

اختلاف كل من منحنى النمو ومعدل النمو وكذلك زمن تضاعف للطحلب باختلاف نسب النيتروجين والفسفور المستخدمة قيد البحث . وشوهد أعلى إنتاجية لنمو الطحلب مع أقل زمن تضاعف في اليوم الرافع عند نسب النيتروجين والفسفور N_1P_5 و N_5P_5 . واتفق ذلك مع قيم كلوروفيل أ والامتصاصية والعدد الخلوي . كما حدثت زيادة في كمية السكريات الذائبة والبروتينات الذائبة وغير الذائبة بينما تراجعت قيم السكريات غير الذائبة والأحماض الأمينية بزيادة قيم النيتروجين ، وعند زيادة كمية الفسفور في الوسط ازدادت قيم السكريات الذائبة وغير الذائبة والكلية وكذلك البروتينات الذائبة وغير الذائبة والكلية والأحماض الامينية الحرة . وبإجراء التحليل الكمي لمجموعة الكاروتينات في ثلاثة أنواع من الطحلب وهم : A. falcatus A. Convoultus ; A. spirelas ; لوحظ عدم وجود تباين في التركيز في كل من طحلبي A. falcatus; A spirelas وقلت كمية الكاروتنيات في طحلب A. convoultus .

أظهرت النتائج أن الأنواع الثلاثة لطحلب Ankistrodesmus لها أصل واحد . كما أكدت الدراسة الجزيئية الأولية Preliminary Molecular Examination للثلاثة أنواع من جنس Ankostrodesmus اتفاقها مع التصنيف المجهري Morphological Classification .

* قسم علم النبات ، كلية العلوم ، جامعة عمر المختار ، البيضاء – ليبيا ، ص.ب. 919 .

© للمؤلف (المؤلفون)، يخضع هذا المقال لسياسة الوصول المفتوح ويتم توزيعه بموجب شروط ترخيص إسناد المشاع الإبداعي CC BY-NC 4.0

المقدمة

الطحالب (Algae) هي مجموعة من النباتات اللازهرية الثالوسية ، كثيرة العدد متباينة التركيب ، ابسطها عبارة عن خلية واحدة بينما القسم الأكبر منها متعدد الخلايا ، تتألف من أكثر من 22 ألف نوع معظمها كائنات ذات نواة حقيقة Eukaryotic وتعيش الطحالب في المياه العذبة والمالحة والتربة (Vantkatarman, 1969 ; Anagnostidis and Komarek, 1988) .

تبنى تقسيمات الطحالب على أنواع الصبغات الموجودة بها وأيضاً على الصفات الحيوية الأخرى ومنها أنواع المنتجات الكربوهيدراتية المخزونة بخلاياها ، ومكونات جدار الخلية وكذلك أنواع الأسواط إن وجدت . وتمتاز الطحالب باحتوائها على صبغة اليخضور (الكلوروفيل) والصبغات الأخرى لذا فهي ذاتية التغذية (Autotrophs) أي تقوم ببناء المواد الكربوهيدراتية من ثاني أكسيد الكربون (CO_2) والماء والطاقة المستمدة من الشمس بمساعدة مادة الكلوروفيل والصبغات المساعدة والتي تقوم بعملية التمثيل الضوئي (Bold, 1973 and Adam et al. 1990) (Photosynthesis) . تحتاج الهوام النباتية (الفيتوبلانكتون) Phytoplankton للنمو والتكاثر العديد من العناصر الكيميائية منها عنصر الكربون والتي تستطيع أخذه في صورة ثاني أكسيد الكربون بجانب ضوء الشمس وتحوله إلى طاقة كيميائية وأكسيد والذي بدوره يأخذه النبات والحيوان والإنسان في عملية التنفس وتعتبر الطحالب من أهم الكائنات التي تساعد على التخلص من ثاني أكسيد الكربون ، فضلاً على أنها تمثل بداية السلسلة الغذائية (Vardi et al. 2006) .

ويعد عنصر النيتروجين ضروري لجميع عمليات الايض للطحالب ويمكن للطحالب من أن تأخذ النيتروجين بصوره المختلفة كالنترات والنيتريت أو في صورة امونيا ، كما أن للطحالب الخضراء المزرقة القدرة على تثبيت نيتروجين الهواء الجوي . تتراوح كمية النيتروجين في الطحالب الخضراء 8.5% 6.5 – من الوزن الجاف ، وعموماً فإن معظم الطحالب تعيش في المياه السطحية التي تتراوح فيها نسبة النيتروجين من 0.3 - 8.8 مليجرام/لتر (Adam et al. 1990) .

ويعتبر عنصر الفسفور من المغذيات الضرورية للطحالب ويتراوح التركيز المناسب للنمو من 8.9 – 17.8 ملجم/لتر ، كما أن نقص هذا العنصر يؤدي إلى نقص المركبات المحتوية عليه مثل ATP , NADP وهذا يؤثر على انقسام الخلية (Mohammed et al. 1990) ، ويعد الكالسيوم عنصراً مطلقاً في نمو الطحالب ولكن العديد من الطحالب لا تحتاج إلى هذا العنصر وترجع أهميته إلى كونه يدخل في تركيب الصفيحة الوسطى وتنظيم دخول وخروج الأيونات ، السليكون مهم لنمو الدياتومات ويعتبر عنصر مطلق لدخوله في تركيب الجدار الخلوي ، كما تحتاج الطحالب الحديد لأنه

يلعب دور في نقل الإلكترونات وخلب المركبات السامة داخل الخلية ، ولنمو مثالي للطحالب لابد من توافر العناصر الصغرى متمثلة في Mn و Zn و Bo و Ga و Na و K و Mg (Claudio et al. 2005) .

ويهدف البحث إلى متابعة النمو لطحلب من الطحالب السائدة (Ankistrodesmus falcatus) في مياه النهر الصناعي العظيم فرع سلوق بنغازي ، ودراسة منحنى النمو Growth Curve ومعدل النمو Growth Rate وزمن التضاعف Generation Time في وجود أو غياب العنصرين الأساسيين النيتروجين والفسفور أو كلاهما معاً . كما تشمل التجربة أيضاً متابعة أيضية للطحلب السابق تتمثل في الأصباغ التمثيلية (كلوروفيل أ) والسكريات الذائبة وغير الذائبة والبروتينات الذائبة وغير الذائبة فضلاً عن الأحماض الأمينية الحرة . كما تلقي الدراسة الضوء على الخصائص الجزيئية لثلاثة أنواع من الجنس السائد Ankistrodesmus .

المواد وطرق البحث

تم اختيار أحد الطحالب السائدة (Ankistrodesmus falcatus) وتم تنميته معملياً في المزارع الساكنة Batch Culture باستخدام أحد الأوساط الغذائية Chu, 10 للعالم Chu, 1942 مع تغير في نسب النيتروجين والفسفور في درجة حرارة 25 م° وشدة إضاءة حوالي 10,000 لوكس بغرض دراسة الأتي :

منحنى النمو : Growth Curve

وتم برسم العلاقة بين العدد أو قيمة الكلوروفيل أو العكارة منه ، ومنه تحدد مراحل النمو وهي مرحلة الطور التمهيدي Lag Phase و طور الآسية أو اللوغاريتمية Exponential Logarithmic Phase (Log Phase) وطور الثبات Stationary Phase وطور الإبطاء Phase of Declining Acceleration .

معدل النمو : Growth Rate

ويتم حسابه من العلاقة :

$$Growth\ Rate\ \mu(h^{-1}) = Ln\,N_1 - Ln\frac{N_0}{t_1 - t_0}$$

زمن التضاعف : Generation Time

ويتم حسابه من العلاقة :

$$Generation\ Time = Ln_2 / \mu$$

الخصائص البيوكيميائية : Biochemical Characteristics

تقدير الأصباغ التمثيلية (اليخضور) كلوروفيل (أ) Chlorophyll a وتم استخلاصهما بالميثانول ويمكن حساب كمية الكلوروفيل من المعادلة :

Chlorophyll (a) =10.3E663 – 0.918E644 (Metzner et al. 1965)

- تحليل الكاروتينات Carotenoid Analysis وتم ذلك طبقاً لطريقة (Shaalan, 1991) .

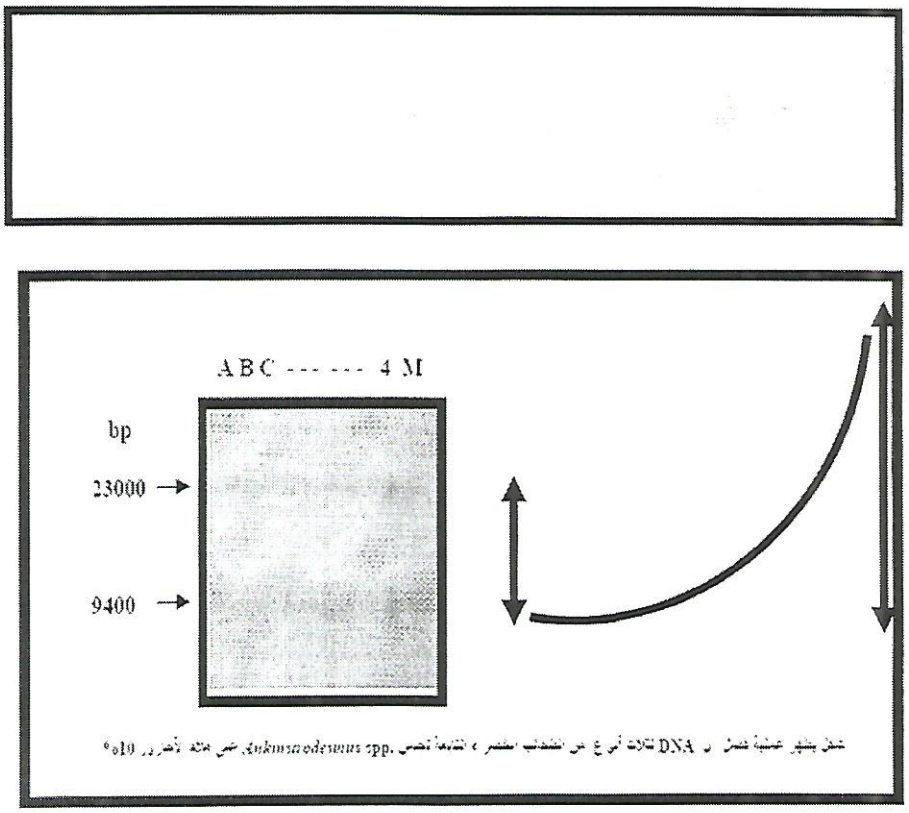
- تقدير الكربوهيدرات Determination of Carbohydrates وقدرت السكريات الأحادية Monosaccharides والسكريات العديدة Polysaccharides بواسطة Anthron Reagent وقيست بواسطة جهاز المطياف Spectrophotometer (Fales, 1951 ; Schlegel, 1956 ; Badour, 1959)
- تقدير البروتينات Determination of Proteins وقدرت البروتينات الذائبة Soluble والكلية Total بواسطة Folin Ciocalteus Reagent وقيست بواسطة جهاز المطياف (Lowry et al. 1951)
- تقدير الأحماض الأمينية الحرة Determination of Free Amino Acids وتم ذلك بواسطة Ninhydrein وقيست بواسطة جهاز المطياف (Lee and Takahashi, 1966) .

الخصائص الجزيئية : Molecular Characteristics

التحليل المباشر للحامض النووي للميتوكوندريا Direct mtDNA RFLP (Direct Mitochondrial DNA-Restriction Fragment Length Polymorphisms Analysis) تم هضم الحامض النووي الـ DNA بالكامل لثلاثة أنواع من طحلب Ankistrodesmus وهي : Ankistrodesmus falcatus; A. spirelas; A. convoultus (بعد عملية استخلاصه) بواسطة إنزيمات القطع المحددة للمناطق الغنية بقاعدتي الجوانين والسايتوسين (GC-rich) . Cytosine and Guanine تم القطع باستخدام إنزيم Hind III بفرضية أنه من المحتمل سينتج عن ذلك عدد صغير ومحدد من القطع (Fragments) ذات أوزان جزيئية عالية ، والتي من الممكن أن تكون مطابقة لـ DNA الميتوكوندريا (mtDNA) ، (Marriott et al. 1984 ; Thomas et al. 1993 ; Attitalla et al. 2004) .

النتائج والمناقشة

تم في هذا البحث زراعة طحلب Ankistrodesmus falcatus بصور نقية في المزارع الساكنة باستخدام الوسط الغذائي Chu 10 مع تغيير في تراكيز كل من N و P ومتابعة ذلك لمدة 6 أيام عن طريق الامتصاصية عند 750 mn والعدد الخلوي (خلية × 10^4) وقيم كلوروفيل (أ) يومياً ومن الشكل 1 يمكن مشاهدة التالي : عند حرمان الطحلب من النيتروجين والفوسفات (N_0P_0) كان أعلى نمو بعد 96 ساعة ثم تراجع النمو في اليوم الأخير إلى أقل من بدايته . وعند وجود N و P بنسبة (N_1P_1) لوحظ استمرار النمو إلى اليوم الأخير مع نقص ملحوظ في نمو الطحلب . وعند إضافة زيادة من N مع ثبوت P (N_5P_1) حصلت زيادة سريعة في النمو أعطى أعلى



A = *Ankistrodesmus convolutes*; B = *A. spirelas*; C = *A. falcatus*;
M = المعلم الجزيئي Molecular Marker; 4 = *Chollerla vulgaris*

معدل نمو في اليوم الأخير ، وعند إضافة النيتروجين والفوسفات بنسبة (N_5P_5) لوحظ زيادة قوية في النمو مسجلة أعلى قيمة بمقارنتها بالتركيزات السابقة . ومن الجدير بالذكر اتفقت هذه الزيادة في النمو سواء كانت محسوبة على أساس الامتصاصية أو العدد الخلوي أو الكلوروفيل .

تشير النتائج المدونة في جدول 1 أنه عند حرمان الطحلب من النيتروجين والفسفور (N_0P_0) ، كان أعلى معدل نمو وأقل زمن تضاعف في اليوم الثاني ثم ازداد هذا المعدل في اليوم الرابع عند إضافة النيتروجين والفسفور بنسبة (N_1P_1) أو (N_5P_1) . ثم وصل هذا المعدل إلى اليوم الخامس عند التركيزين (N_1P_5) و (N_5P_5) وبعد 6 أيام في نهاية التجربة

لوحظ زيادة في العدد الخلوي في كلا المعاملتين بمقارنتها بغياب النيتروجين والفسفور مسجلاً أعلى قيم في كل من (N_1P_5) أو (N_5P_5) واتفق ذلك مع قيم كلوروفيل أ . كما كان للنيتروجين والفوسفات تأثير واضح على بعض المسارات الأيضية للطحلب (الكربوهيدرات والبروتين والأحماض الأمينية الحرة) . فعند حرمان الطحلب من N و P تراجعت قيم السكريات والبروتينات وعند إضافة النيتروجين والفسفور بنسبة (N_1P_1) ونسبة (N_5P_1) حدثت زيادة في كمية السكريات الذائبة والبروتينات الذائبة وغير الذائبة بينما تراجعت قيم السكريات غير الذائبة والأحماض الأمينية وعند زيادة كمية الفسفور في الوسط ازدادت قيم السكريات الذائبة وغير الذائبة والكلية وكذلك البروتينات الذائبة وغير الذائبة والكلية والأحماض الأمينية الحرة .

ويعتبر النيتروجين عنصراً أساسياً في نمو الطحالب كونه يدخل في العديد من المركبات داخل الخلية بالإضافة إلى استحثاثه لعملية التمثيل الضوئي وهناك علاقة وثيقة بين النترات والسكريات الذائبة وغير الذائبة ، عند زيادة كمية النترات زاد محتوى كلوروفيل أ وكمية الأكسجين المتصاعد كما ازدادت السكريات الذائبة على حساب السكريات غير الذائبة وتم ذلك في تنمية الطحلب Nostoc في المزارع الساكنة (Issa et al. 2002) . وعلى الجانب الأخر لعنصر الفسفور أهمية قصوى ويؤدي نقص الفسفور إلى نقص كميات البروتين والأحماض الأمينية وبعض مسارات الدهون كما يؤثر نقص الفسفور على بناء النترات داخل الخلية ، وتم ذلك في دراسة على نقص الفسفور في الطحلب الأخضر Kirchnerilla lunaris (Ahmed and Issa, 1994) ، وأضاف الباحثان أن كل من تضاعف الخلايا وكذلك الوزن الجاف والأصباغ التمثيلية تزيد بزيادة معدل الفسفور في الخلية .

وبإجراء التحليل الكمي لمجموعة الكاروتينات باستخدام كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة في ثلاثة أنواع من طحلب Ankistrodesmus عند طول موجي 450 mn وهم : A. falcatus; A. spirelas; A. Convoultus ظهرت النتائج عدم وجود تباين في التركيز في كل من طحلبي A. falcatus; A. spirelas وقلت في طحلب A. Convoultus (جدول 2) في هذا السياق أشار Pintea et al. 2003 أن قيم الكاروتينات تختلف باختلاف الأنواع وذلك باستخدام أزهار أربعة أنواع من نبات Calendula officinalis مما يدل على أنها لا تستخدم في التقسيم بين الأنواع ، حيث أن الطرق اليوكيميائية لا تعطي دلالة على التطور لمستوى أي من الثلاثة Domains المستخدمة في المقارنات خاصة في الكائنات حقيقة النواة . (Woese, 1998; Gibson and Muse, 2002)

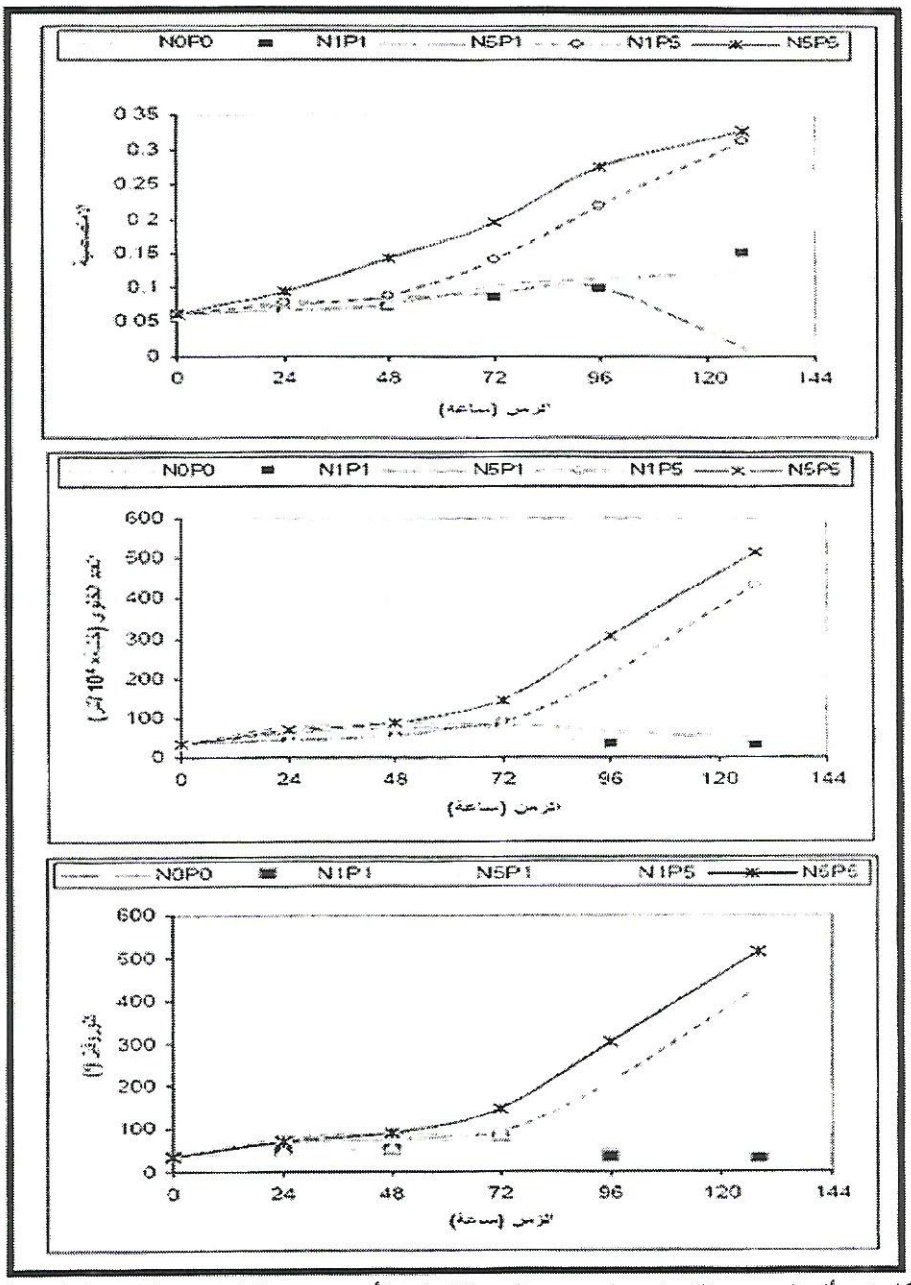
ولدراسة بعض الخصائص الجزيئية لثلاث أنواع من طحلب Ankistrodesmus A. falcatus; A. spirelas; A. Convoultus

تم هضم الحامض النووي الـ DNA بالكامل للطحلب بواسطة إنزيمات القطع المحددة للمناطق الغنية بقاعدتي الجوانين والسايتوسين Cytosine and Guanine (GC-Rich-['Four-Base GC-Cutter' Endonuclease Restriction Enzymes] ومن المحتمل سينتج عنه عدد صغير ومحدد من القطع (Fragments) ذات أوزان جزيئية عالية ، والتي من الممكن أن تكون مطابقة لـ DNA الميتوكوندريا (mtDNA) (Marriott et al. 1984; Castenholz, 1992 ; Cooley, 1992) .

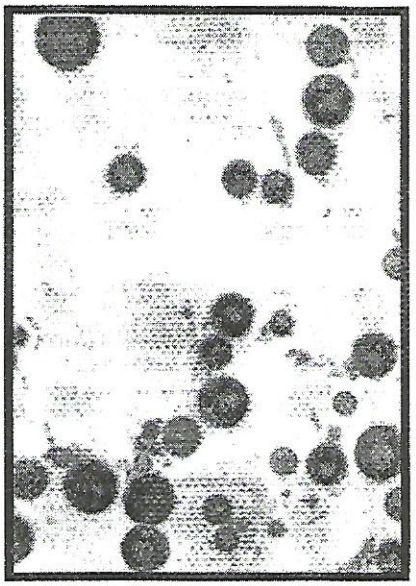
ولتحليل mtDNA RFLP يستخدم أنزيمات قطع ، على سبيل المثال Hind III لقطع DNA عند مواقع مميزة ومحددة بحدود 5 – 4 pb . تقطع (تهضم) بواحد أو أكثر بأنزيمات القطع والقطع الناتجة من هذه القواعد المتبادلة ، المضافة ، المنزوعة وإعادة ترتيب هذه التتابعات داخل أنزيم القطع والذي بدوره سيتعرف على التتابع وبالتالي يتم القطع طبقاً للحجم الجزيئي (Avise, 1994 ; Bridge et al. 1994) .

يوضح شكل 2 النتائج المتحصل عليها من خلال الترحيل الكهربي لـ DNA ثلاثة أنواع من طحلب Ankistrodesmus تجعلنا ننظر إلى الأصل التطوري لها ومقدرة هذه الأنواع على حفظ التركيب الوراثي والمظهر الوراثي لها ، لذلك أسئلة عن المنشأ ، التطور والبيئة عن هذه الأنواع وكذلك عن الأهمية الوظيفية لحزمة مفردة من mtDNA محصور بين هذه الأنواع يجعل هذا السؤال ممكناً (Attitalla, 2004 ; Ishizaki et al, 2004) .

أظهرت النتائج أن الأنواع الثلاثة لطحلب Ankistrodesmus لها أصل تطوري واحد مع الأخذ في الاعتبار أن الطحالب تحتوي DNA البلاستيدة الخضراء Chloroplast-DNA . أخيراً للحصول على نتائج قابلة للمقارنة تتطلب الحصول على أنواع عديدة من هذا الطحلب ومن مواقع جغرافية مختلفة ويكون بضمنها نوع محدد التعريف الجزيئي من مراكز تعريف السلالات (Type Strain Culture Collection) . كما أكدت الدراسة الجزيئية الأولية Preliminary Molecular Examination لثلاثة أنواع من جنس Ankistrodesmus اتفاقها مع التصنيف المجهري Morphological Examinatiom .



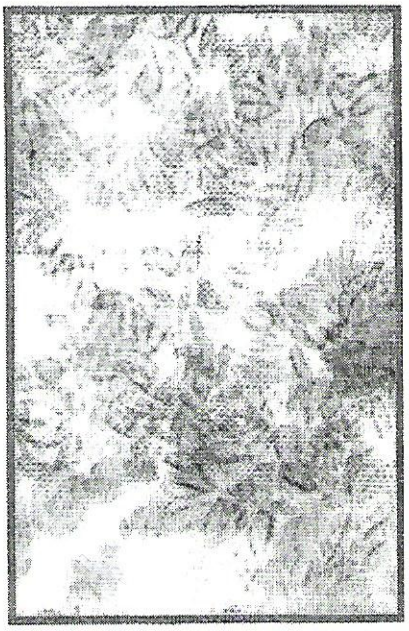
شكل 1 تأثير النتروجين والفوسفور على منحنى النمو للطحلب الأخضر *Ankistrodesmus falcatus* في المزارع الساكنة



شكل 2 *Chlorococum humicola* (Naeg)

شكل 3 *Ankistrodesmus falcatus* (Corda)

شكل 4 *Ankistrodesmus spirals*



شكل 5 *Ankistrodesmus convolutes* Corda

جدول 1 أعلى معدل نمو وبعض المسارات الايضية لطحلب Ankistrodesmus falcatus في المزارع الساكنة تحت تأثير

المعاملات	العدد الخلوي (خلية×10^4/لتر)	أعلى معدل نمو	أقل زمن تضاعف	كلوروفيل أ (ملجم/لتر)	الكربوايدرات (ملجم/لتر)			البروتينات (ملجم/لتر)			الأحماض الأمينية الحرة (ملجم/لتر)
					ذائبة	غير ذائبة	كلية	ذائبة	غير ذائبة	كلية	
N_0P_0	37.3	0.028 اليوم الثاني	24.75	30.0	1.0	4.0	5.0	0.1	0.2	0.3	38.2
N_1P_1	32.3	0.019 اليوم الرابع	36.48	9.0	5.0	2.5	7.5	0.7	0.8	1.5	34.7
N_5P_1	55.0	0.018 اليوم الرابع	38.5	99.0	8.0	2.0	10.0	1.1	1.4	2.5	31.5
N_1P_5	433.3	0.035 اليوم الخامس	19.8	109.0	12.0	10.0	22.0	2.0	1.0	3.0	39.1
N_5P_5	515.0	0.030 اليوم الخامس	23.1	151.0	15.0	11.0	26.0	3.0	0.3	3.3	39.0

جدول 2 كمية الكاروتينات (Carotenoids mg/l) لثلاثة أنواع من طحلب Ankistrodesmus المختبرة :
A. falcatus ; A. spirelas ; A. convoultus

نوع الطحلب	الطول الموجي (nm)	التركيز (mg/l)
Algal Species	Wave Length	Concentration
Ankistrodesmus convolutus	450	0.566
Ankistrodesmu Spiralas		9.27
Ankistrodesmu falcatus		6.98

Growth of the green alga *Ankistrodesmus* under various NIP ratios, with spot light on the Molecular Taxonomy of its three species

Idress Hamad Attitalla[1] **Hanan M.A. EI-Mesmary**

Muftah A. Alhorer **Faraj M. Shoaeb**

Abstract

The growth and some metabolic activities of the unicellular Alga *Ankistrodesmus falcatus* under various concentrations of Nand/or P in Batch culture were conducted. In addition, the carotenoids contents as well as RFLP mtDNA analysis (Total DNA) of the three isolated species of *Ankistrodesmus* were estimated. The following conclusions were reached:

The growth curve of the abundance green alga *Ankisreodesmus falcatus* (calculated on absorbance, cell number and chlorophyll a), was enhanced with raised the ratios ofN and / or P, what ever the time elapsed.

The carbohydrate and protein as well as the free amino Acids contents in *Ankistrodesmus* cultures were increased with increasing N/ P ratios in the outer medium, especily at NIPS and NsPs concentrations tested.

The Preliminary molecular examination of three species of. *Ankisrodesmus (A. convoultus, A. spiralis, A. falcatus)* was concomitant with the morphological examination.

[1] Omar AI-Mukhtar University, Faculty of Science, Botany Department, Box 919, EI-Beida, Libya.

المراجع

Adam, M.S. Mohammed, A.A. and Issa, A.A. (1990): Physico-Chemical Characteristic and Planktonic Algae of Two Irrigation Canals and A Closed Pond at Assiut area, Egypt.Vol. 19 (2-D), pp. 219-245, Bull. Fac. Sci., Assuit Univ.

Ahmed A.Z. and Issa A.A. (1994): Phosphours stress effects on assimliation of nitrate by the greebn alga *Kirchneriella lunaris* Moeb. Isolated from desert soil. Acta Hydrobiol 36:49-55.

Anagnostidis, K. and J. Komarek. (1988): Modem approach to the classification system of cyanophytes. 3-0scillatoriales. Arch. Hydrobiology, (Suppl 80) Algol. Stud. 50/53: 327-472.

Attitalla, I.H., Fatehi, J., Levenfors, J.and Brishammar, S. (2004): A rapid molecular method for differentiating two special forms of *Fusarium oxysporum.* Mycological Research, 108 (7): 787-794.

Avise, I.C. (1994): Molecular Markers, Natural History, and Evolution Chapman and Hall, Inc. New York, NY.

Badour,S.S. (1959): Analytisch Chemische Untersuchung Des Kaliuangels Bei *Chiarella im Verglech* Mit Auderen Mangel Zumstanden.Ph D.Dissertation Gottingen, Gottingen Univ.,Germany.

Bold, H.C. (ed) (1973): Morphology of Plants. Harper and Row Publishers Incorporated, New York, USA

Bridge, D.P ,Hopkinson and Rutherford, A.M. (1995): Rapid Mitochondrial Probes for Analysis of Polymorphisms in *Fusarium oxysporum* Special Forms. Letters in Applied Microbiology, 1995,21198-201. .

Castenholz, R. W. (1992): Species usage, concept, and evolution in the cyanobacteria (blue- green algae). Journal ofPhycology, 28: 737-745.

Chu, S.P. (1942): The influnce of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae. 1 methods of culture media. Journal of Ecology, 30: 284-325.

Claudio P., Jordao, Madson de (:I.Pereira, AntonioT. Matos and Jose L. Pereira (2005): Influence of Domestic andIndestrial Waste Discharges On Water Quality and Minas Gerais State ,Brazil .Jbraz.Chem .Soc V 01.16. No .2, 241-250.

Cooley, R.N. (1992): The use of RFLP analysis, electrophoresis karyotyping and PCR in studies microorganisms. In Molecualr Biology of Filamentous Microorganisms (ed.) Sthl, U. And Tudzynski, P. pp. 13-,26. Weinheim, Germany:VCH.*3001-3008.*

Metzener H., Rau, H. and Senger H. (1965): Untersuchungen zur synchronisier-barkeit ein zehner

pigment managel.Mutanten von *Chiarella.* Planta 65: 186-194.

Mohammed, A.A., Adam M.S. and Issa A.A. (1990): Water-Pullution in Nile at Manquabad,

Assiut, Egypt. Bull. Fac. Sci., Assuit Univ. 19. (2-D), 195-218.

Pintea, A., Bele, C., Andrei, S. and Socaciu, C. (2003): HPLC Analysis of Carotenoid on Four Varieties of Calendula officinalis L. Flowers. Acta BioI. Szegediensis. 47, (1-4): 37-40.

Schlegel, H.G. (1956): Die Verwertung Organischer Sauren Durch *Chiarella* in Licht. Planta 47:510

Shaalan, S.H. (1991): Taxonomic studies of some Bryopsidophycean marine algae from the Mediterranean Seashore of Alexandria, acumulative approach. Bull. Fac. Sci. Alex. Univ. (B): 230-253.

Thomas, V.Rutherford, M.A. and Bridge, P.D. (1993):Molecular Differentiation of Tow Races of Fusarium Oxysporum Special form Cubense. Letters in Applied Micobiology.18: 193-196.

Vantkatannan, G.S. (1969): The Cultivation of Algae. The Indian Couucil of Agricultural Research, New-Delhi, India.

Vardi, A., Fonniggini, F., Casotti, R., De Martino, A, Ribalet F Miralto A, Bowler C (2006): A stress Surveillance System Based on Calcium and Nitric Oxiide in Marine Diatoms. PLos BioI.; 4(3): 60.

Woese,C.(1998):The Universal Ancestor. *Proc Natl.Acad.Sci.USA* 95:6854-6859.