بررسی اثر مس (Cu^{+2}) بر میزان کلروفیل a و تراکم جلبک *Scenedesmus obliquus*

حمیده کیها نیان*[۱]، فرناز رفیعی [۲] ، کریم مهدی نژاد[۳] و افتخار شیروانی مهدوی[۴]

۱، ۲ و ۴- دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
۳- پژوهشکده آبزی پروری آب های داخلی ایران

چکیده

محیط های آبی اغلب در معرض آلاینده های مختلف از جمله فلزات سنگین هستند که انتشار آنها به داخل آب ها می تواند مشکلات مخلتفی برای گیاهان بوجود آورد. در این بررسی اثر فلز سنگین مس (Cu^{+2}) بر تراکم و میزان کلروفیل a در جلبک *Scenedesmus obliquus* مورد مطالعه قرار گرفت. پرورش در غلظت های مختلف (۲،۴،۶،۸) میلی گرم در لیتر مس و یک شاهد با استفاده از محیط کشت زاندر (z8) در دمای ۲ ± ۲۳ $^{\circ}c$ و شدت نور ۳۰۰۰ لوکس به مدت ۵ روز انجام شد. سپس فراوانی جلبک ها در زمان های صفر ،۲۴، ۴۸، ۷۲و ۹۶ ساعت با استفاده از لام هموسیتومتر توسط میکروسکوپ نوری شمارش شده و میزان کلروفیل a آنها اندازه گیری گردید. در غلظت کلروفیل a جلبک *S.obliquus* بین زمان های مختلف و تیمار های آزمایشی و در میزان تراکم سلولی بین تیمار شاهد و غلظت های متفاوت مس ، بین غلظت های ۲/۴ با ۶/۸ mgl^{-1} اختلاف معنی دار بود ($p< ۰/۰۵$). در تیمار شاهد با گذشت زمان میزان تراکم سلولی و غلظت کلروفیلa افزایش نشان داد. در تیمار های فلز مس با افزایش زمان در میزان کلروفیلa و تراکم جلبک سندسموس کاهش دیده شد، بطوریکه با افزایش غلظت مس از ۲ تا ۸ mgl^{-1} میزان کاهش تراکم سلولی از ۷۲/۰۹٪ (در ۲ mgl^{-1} در ساعت ۹۶) به ۹۲/۳۳٪ (در ۸ mgl^{-1} در ساعت ۹۶) نسبت به ساعت صفر رسید.

در این غلظت ها از ساعت ۲۴ مرگ سلولی روی داد. در تیمار شاهد سلول ها در ساعت ۹۶ هنوز در فاز رشد قرار داشتند و افزایش ۲۸/۴٪ نسبت به ساعت ۷۲ دیده شد.

واژگان کلیدی: *Scenedesmus obliquus* ، مس ، تراکم سلولی ، کلروفیل a

* مسئول مکاتبه: Viola_2223@yahoo.com

مقدمه

هر عاملی که سبب بهم خوردن اجزاء طبیعی یک اکوسیستم گردد و تغییرات نامطلوب زیست محیطی را بوجود آورد و موجب اختلال در سلامتی، رشد، فرایندهای سوخت و ساز و فیزیولوژیکی گردد آلودگی نام دارد. از مهم ترین آلاینده های سمی که برای محیط زیست بویژه محیط های آبی تهدید بزرگی به شمار می رود می توان به فلزات سنگین و ترکیبات آلی فلزی اشاره نمود (کردوانی ، ۱۳۷۴). با توجه به گسترش صنعتی شدن و انواع فعالیت های انسانی، فاضلاب های خانگی، شهری، کشاورزی، استخراج معادن، ضایعات مواد رادیواکتیو و ... ، استفاده از فلزات و یا موادی که دارای فلزات آلاینده می باشند وارد اکوسیستم آبی شده و بدین طریق ضمن ایجاد خطر برای آبزیان می توانند بطور مستقیم یا غیر مستقیم از طریق زنجیره غذایی برای انسان مخاطره آمیز باشند (رستمی، ۱۳۷۸). حدود ۵/۷ میلیون تن در سال مس، برای استفاده در وسایل الکتریکی،در آلیاژها، به عنوان یک کاتالیزور شیمیایی، در ضد لکه کردن رنگ برای بدنه کشتی ها به عنوان یک جلبک کش و محافظ چوب تولید میگردد. بناچار در تعدادی از این کاربردها، مس به محیط زیست منتقل می شود. فاضلاب های شهری حاوی مقدار قابل توجهی مس بوده و این نشان دهنده افزایش غلظت مس در رسوبات مناطق دفن فاضلاب است.مس یک عنصر ضروری برای موجودات زنده دریایی به حساب می آید. حد مجاز آن در آب آشامیدنی طبق استاندارد جهانی۰/۰ ۵ρρm است. به رغم حضور تعدادی از سیستم های دفع مسمومیت و ذخیره سازی برای مس، پس از جیوه و نقره، به دلیل کاربرد فراوان آن در رنگ های ضد لکه برای طیف وسیعی از موجودات دریایی سمی ترین فلز محسوب می شود اما اثر مخرب غلظت بیش از حد آن بر موجودات شناخته شده است و در خصوص جلبک ها، می توان تاثیر آن روی تراکم، پیگمان ها و ... اشاره کرد. مس می تواند بر سنتز پیگمان ها ی فتوسنتزی تاثیر گذارد و یا باعث تجزیه آنها صورت گردد. پنج نوع کلروفیل در گیاهان شناخته شده است و تنها کلروفیل a در تمام موجودات فتوسنتز کننده وجود دارد. میزان این ماده تخمینی از تولید اولیه، وضعیت چرخه غذایی و پراکنش فیتوپلانکتونی را نشان می دهد (کلارک ،۱۹۲۳). گونه *Scenedesmus obliquus* دارای سلول های میانی دوکی سلول های کناری به شکل هلالی و فشرده و غشاء فاقد هر گونه زائده است. اندازه آن حدود ۱۰ میکرومتر بوده و در آبهای بتا و مزوساپروپ بصورت انبوه وجود دارند (محمد جانی و فلاحی ، ۱۳۷۶) . به دلیل اینکه جلبک ها در پایه زنجیره غذایی قرار دارند ،هرگونه تغییری در تراکم، بیوماس، جمعیت آنها روی زنجیره غذایی تاثیر می گذارد. مطالعه پاسخ این موجودات به فلزات سنگین از اهمیت ویژه ای برخوردار است. با مطالعات اثر فلز مس بر فیزیولوژی و رشد موجودات از جمله جلبک ها می توان در یک

محیط آبی آلوده به اثرات مخرب آن پی برد. هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر فلز مس در غلظت های مختلف بر تراکم و میزان کلروفیل a درجلبک *S. obliquus* می باشد.

مواد و روش کار

استوک خالص جلبک *Scenedesmus obliquus* از پژوهشکده آبزی پروری انزلی تهیه گردید. جلبک ها در محیط کشت *Z8* (Surosz &.Palinska ,2004) در حجم ۵۰۰ میلی لیتر تحت شـرایط دمـایی ۲ ± ۲۳ °c و شـدت نـور ۳۰۰۰ لوکس و دوره روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ و هوادهی منظم با سه تکرار پرورش داده شدند. پس از حدود ۳ تـا ۴ روز تراکم سلول ها به حدود ۴×۱۰^{۵} سلول در میلی لیتر رسید. به منظور ساختن محلول اسـتاندارد مـس از نمـک سولفات مس ($Cu\ So_4 , 5H_2o$) استفاده گردید. ۳/۹۳ گرم از سولفات مس را با آب مقطر به حجـم ۱۰۰۰ سـی سـی رسانده و طبق فرمول $n_1 v_1 = n_2 v_2$ با توجه به حجم محیط کشت جلبک، به ظرف حاوی جلبک در حال رشد تزریـق گردید. تا غلظـت هـای ۸و۶،۴،۲ میلـی گـرم در لیتـر (ppm) حاصـل شـود. نمونـه بـرداری در سـاعت هـای هـای ۹۶و۷۲،۴۸،۲۴،۰ پس از تزریق فلز مس صورت گرفت و تعداد سلول هـای جلبکـی بـا اسـتفاده از لام هموسـیتومتر شمارش (Tripathi & Gaur ,2006) شد. برای تعیین میزان کلروفیل a ۳۰ میلی لیتر از محلول جلبک بـا اسـتفاده از کاغذ صافی واتمن ۰/۴۵ میکرومتر (GF/C) فیلتر گردیده و۱۰استن ۹۹ درصد به آن اضافه شد. لوله هـا در بـن ماری ۷۵ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت قرار داده شدند. سپس جذب توسط دسـتگاه اسـپکتروفتومتر در ۶۶۵ و ۷۵۰ نانومتر خوانده و توسط معادله مربوطه میزان کلروفیل a برحسب میکروگرم در لیتر محاسـبه شـد Mohamed (,2008).

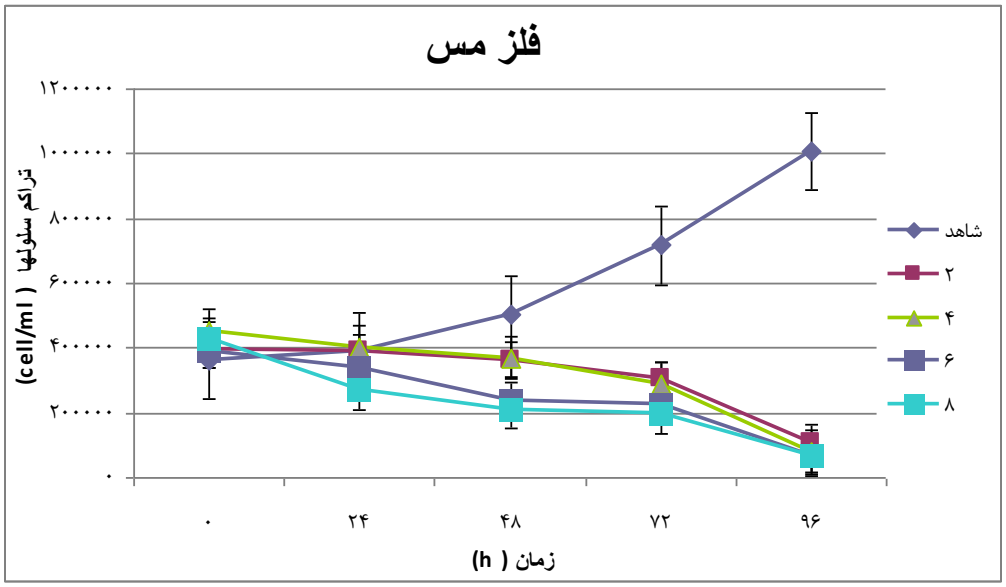
آنالیز واریانس یکطرفه و تست دانکن، با استفاده از نرم افزار SPSS برای مقایسه آماری انجام شد.

نتایج

اثرات فلز مس بر جلبک سبز سندسموس:

نتایج بدست آمده از تیمار شاهد نشان داد که در زمان شروع کشت تعداد جلبک هـا ۳۶×۱۰^{۵} عـدد در میلـی لیتـر بود که با افزایش زمان در طی ۹۶ ساعت به میزان ۱×۱۰^{۶} عدد در میلی لیتر (۲۸/۴ درصد نسـبت بـه سـاعت ۷۲)

رسید. در این آزمایش درساعت ۹۶ جلبک ها هنوز در مرحله رشد سریع بسر می بردند. در تیمار های فلز مس نیز از ساعت ۲۴ کاهش جمعیت آغاز شد، به طوریکه در تیمار mgl^{-1} ۲ در شـروع آزمـایش تعـداد سـلول هـا mgl^{-1} $\times 10^5$ ۳/۹۴ بـود و در سـاعت ۲۴بـه $\times 10^5$ ۳/۷۵ رسـید و ۱۰ درصـد کـاهش نشـان داد و در سـاعت ۹۶ ایـن کـاهش ۷۲/۰۹درصد بود .تراکم در تیمار ۴ میلی گرم در لیتردر ساعت صفر و ۹۶ به ترتیب $\times 10^5$ ۴/۵۴ و $\times 10^4$ ۴۰ سـلول در میلی لیتر بدست آمد. در تیمار mgl^{-1} ۶ نیز کاهش میزان جمعیت از ساعت ۲۴ دیده شد، و بطوریکـه در سـاعت ۹۶ به ۸۸,۱۲درصد خود در زمان صفر رسید. (شکل ۱).

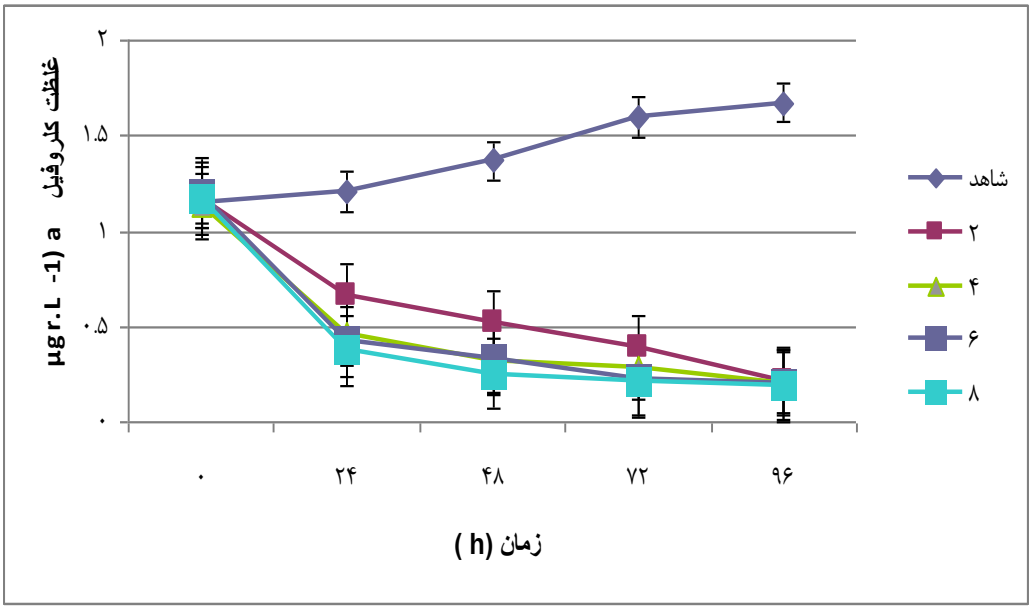


شکل ۱- تغییرات تراکم سلولی (سلول در میلی لیتر) جلبک سندسموس طی ۹۶ ساعت درگروه شاهد و تیمارهای با (۲،۴،۶و۸) میلی گرم در لیتر یون مس

به این ترتیب در تیمارهای دارای فلز مس از ساعت ۲۴ به بعد تنها افزایشی در جمعیت نشان نداده، بلکه سیر نزولـی نیز داشته و وارد فاز مرگ شده اند و در ساعت ۹۶ به حداقل خود رسیدند. بیشـترین کـاهش تـراکم سـلولی در ۲۴ ساعت اول در تیمار mgl^{-1} ۸فلز مس مشاهده شد که از $\times 10^5$ ۴/۳۰ سلول در میلی لیتر در زمان صفر به $\times 10^5$ ۲/۶۹ سلول در میلی لیتر در ساعت ۲۴ رسید که ۳۷/۴۵ درصد کاهش نشان داد و ایـن کـاهش در سـاعت ۹۶ بـه ۹۲/۳۳ درصد ($\times 10^4$ ۳/۳۳ سلول در میلی لیتر) رسید. بین تراکم سلول ها در ساعات مختلف در تیمار شـاهد و تیمارهـای فلز مس اختلاف معنی دار وجود داشت ($p=$ ۰/۰۰۱). اختلاف معنـی داری بـین تیمارهـای mg/l ۲ بـا ۶/۸mg/l (بـه ترتیب p=۰/۰۳۸ و p= ۰/۰۳۴)، و mg/l ۴ با mg/l ۶/۸ (به ترتیب p=۰/۰۱۲ و p=۰/۰۱۱) مشاهده شد. اما اختلاف معنی داری بین تیمارهای mg/l ۲/۴ (p=۰/۹۹) و تیمارهای mg/l ۶/۸ (p=۱/۰) دیده نشد. همچنـین در شـکل(۱)تـاثیر

غلظت های مختلف یون مس بر میزان کلروفیل مشاهده شد. در تیمار شاهد غلظـت کلروفیـل a از ۱/۱۴ میکروگـرم در لیتر در ساعت صفر به ۱/۶۷ میکروگرم در لیتر پس از گذشت ۹۶ ساعت رسید.

در تیمارهای ۶،۴،۲و۸ میلی گرم در لیتـر فلـز مـس میـزان کلروفیـل a از سـاعت ۲۴ کـاهش معنـی داری داشـت. بیشترین کاهش کلروفیل a در غلظت۸ میلی گرم در لیتر مشاهده شده از زمان صفر با ۱/۲۰ میکروگرم در لیتـر بـه ۰/۰۱ میکروگرم در لیتر در ساعت ۹۶ رسید بطوریکه ۷۵/۹۸ درصد کـاهش نشـان داد. بـین میـزان کلروفیـل a در زمان های مختلف (۲۴،۴۸،۷۲و۹۶) و ساعت صفر اختلاف معنی دار مشاهد شد($p<0/05$)(شکل ۲).



شکل ۲ - تغییرات غلظت کلروفیل a جلبک سبز سندسموس طی ۹۶ ساعت در گروه شاهد و تیمارهای با (۶،۴،۲و۸) میلی گرم در لیتر مس

این اختلاف بین تیمارهای مختلف نیز معنی دار بود ($p<0/05$) و با افزایش غلظت فلز مس از ۲ تا ۸ میلی گـرم در لیتر کاهش در میزان کلروفیل a مشاهده شد. در بررسی اثر غلظت ها ی مختلف فلز مس تغییرات رنـگ و شـکل در این جلبک، شامل بیرنگ شدن و از دست دادن خارها، در غلظت ۸ میلی گرم در لیتر در ساعت ۹۶ مشاهده گردید.

بحث و نتیجه گیری

هدف در این تحقیق مطالعه و بررسی پاسخ های جلبک *S. obliquus* در برابر غلظت های مختلف فلز سنگین مس در ساعت های مختلف در غلظت های (۲، ۴، ۶و ۸) میلی گرم در لیتر یون مس و ساعت های (۰،۲۴،۴۸،۷۲و۹۶) بود. در غلظت ۲ میلی گرم در لیتر فلز مس، در ۲۴ ساعت اول مورفولوژی جلبک سندسموس دارای رنگ سبز طبیعی مشابه با گروه شاهد بود، اما با افزایش زمان و غلظت مس تغییراتی مشاهده شد که بیشترین این تغییرات بعد از گذشت ۹۶ ساعت در ۸ میلی گرم در لیتر رروی داد که رنگ طبیعی سلولها تغییر کرده بتدریج بیرنگ شده و خارها از بین رفتند.

در غلظت mgl^{-1} ۲ فلز مس کاهش تراکم جلبک از ساعت ۲۴ آغاز گردید، بطوریکه در ساعت ۹۶ تراکم سلولها ۷۲/۰۹ درصد کاهش داشت واز $cell.ml^{1-}$ ۱۰^۵ ×۳/۹۴ در زمان صفر به $cell.ml^{-1}$ ۱۰^۵ ×۱/۱۰ رسید و این تغییرات در همه تیمارهای مورد آزمایش مشاهده شد. در حالیکه در گروه شاهد سلولها روند طبیعی خود را از نظر افزایش تراکم سلولی و میزان کلروفیل a حفظ کرده بودند. بطور کل تراکم جلبک *S. obliquus* در تیمار های متفاوت مس کاهش معنی داری نسبت به گروه شاهد داشت ($p<0/05$) (شکل۱). از آنجائیکه مس از طریق سیتوکروم در دیواره های سلولی جذب می شود، زمانیکه غلظت های مختلف فلز مس به محیط کشت جلبک اضافه می شود، احتمالا به دلیل ایجاد فعالیت های متابولیکی خاص در داخل سلول های جلبک کاهش تراکم سلولی مشاهده می گردد. بررسی نتایج کار پژوهشگران نشانگر آن است که تیمارهای متفاوت فلز مس بر رشد گونه های مختلف جلبکی تأثیر گذار بوده و میزان این تاثیر بر اساس غلظت آنها و همچنین نوع جلبک متغیر است. رشته سلول های سیانوباکتر *Anabaena flos-aquae* در غلظت mgl^{-1} ۰/۳۵فلز مس ۵درصد کاهش رشد داشته و فرا ساختمان سلول های گیاهی در نتیجه تاثیر فلز مس تغییر می نماید. این فلز درغلظت mgl^{-1} ۳ سلول ها را از حالت طبیعی خود خارج ساخته و باعث بزرگ شدن فضای داخلی تیلاکوئید ها می شود. بیشترین تغییرات ساختمانی در غلظت ۹mg/l مس روی داده، و در این هنگام فیلامنت ها بطور کامل قطعه قطعه شده و سلول ها ی گیاهی باقی مانده موجی شکل و لیز شد ند(Surosz & Palinska ,2004). چنین کاهشی در سلول های *S. quadricauda* در غلظت mgl^{-1} ۳۰ ترکیبات مس در ساعت ۷۲ نیز مشاهده شده است (Muwafg & Market, 2006). در این پژوهش مقدار کلروفیل a ، در غلظت ۲ میلی گرم در لیتر مس در ساعت ۲۴ به میزان ۶۰ درصد کاهش یافت، اما در ساعت ۹۶ میزان کاهش به ۸۰ درصد رسید. در مقایسه بین گروه شاهد و غلظت های مورد آزمایش اختلاف معنی دار بوده(

p<۰/۰۵)و باعث تخریب کلروفیل a در سلول شد که نشانگر تأثیر غلظت های (۲،۴،۶و۸) میلی گرم در لیتر مس بر میزان کلروفیل a جلبک سندسموس می باشد (شکل۲). تأثیر ترکیبات مس بر میزان کلروفیل a در سایر گونه های جلبک نیز به اثبات رسیده است که باعث کاهش کلروفیل a، در جلبک سبز *Scenedesmu quadricauda* (Tripathi & Gaur, 2004 , Fargašová *et al*., 2005)،فعالیت فتوسنتزی و میزان کلروفیل a در غلظتهای۰/۵، ۰/۱ و۰/۰۵ ppm در دیاتومه *Chaetoceros radican* (Wagly *et al*., 1995)،کاهش کلروفیل های a ,b در غلظت های ۲ میلی گرم در لیتر در گیاه پربرگ *Pychanthus striat* شده‌است(Shakya *et al*.,2007).

رشد و میزان کلروفیل a در جلبک سبز *S. quadricauda* تحت تاثیر ترکیب نیترات مس، کاهش معنی داری یافته اند. مس از اجزاء تشکیل دهنده پروتئین های تنفسی و اکسیداز است که در غلظت بالا موجب سمیت میشود، بر اساس مطالعات انجام شده مس دو ظرفیتی آزاد در محیط کشت های آبی (نانو تا پیکو) سبب کاهش تقسیم سلولی در بعضی از کشت های فیتوپلانکتونی بخصوص درجلبک های سبز میشود.علاوه بر آن Cu ll آزاد با سطح مقاومت بالاترممکن است سرعت فتوسنتز را کاهش دهد و سبب دخالت در جهت جذب دیگر فلزات گردد و در نهایت فعالیت آنزیم ها را بوسیله ایجاد رادیکال های هیدروکسیل مختل کند. (Rehman *et al.* , 2006 , Pedro *et al*.2006). یون های فلزی از جمله مس باعث تشکیل رادیکال های اکسیژن می شوند که این تغییر در غشاء، پراکسیداسیون لیپید را افزایش می دهد و باعث تجزیه شدن غشاء و تضعیف تنظیم اسمزی در سلول گردد. در نتیجه سلول ها شکسته می شوند. در جلبک *Cylinroathica fusiformis* با تولید کربوهیدرات ها در فاز سکون، در برابر سمیت مس مکانیسم دفاعی ایجاد می کند. اثر سمی فلز مس با غلظت بالا ناشی از پتانسیل اکسیداتیو مس ll است که باعث کاهش کلروفیل می شود و تغییر میزان اکسیژن و ATP را بوسیله آنزیم های ردکتاز و آلکالین فسفاتاز کم می کند، (Muwafg &Bernd, 2006) احتمالا کاهش رشد و مقدار کلروفیل a توسط ترکیب فلز مسll می تواند با تغییراتی در بیوستنز کلروفیل ارتباط داشته باشد، بطوریکه یون مس جایگزین یون منگنز در ساختمان شیمیایی کلروفیل a شده و پیوندهای هیدروژنی را شکسته، در نتیجه با تغییر آنزیم های دخیل در بیوسنتز کلروفیل a، میزان رشد و کلروفیلa را کاهش می دهد، که با نتایج دیگر مطالعات مطابقت داشته است.

به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که اختلال در تقسیم سلول های جلبکی سندسموس و کاهش میزان کلروفیل a فلز سنگین مس ازغلظت ۲ میلی گرم در لیتر آشکار می شود. *Scenedesmus* به صورت پلانکتونی در

حد وسیعی در آب های شیرین انتشار دارد و می تواند یک موجود مناسب برای آزمایشات بازدارندگی رشد باشد و در مطالعات اثر مخرب آلاینده های آبی از جمله فلزاتی مانند مس، به کار گرفته شود.

تشکر و قدرانی

از محبت های بی دریغ خانم دکتر نجات خواه، خانم وکیلی مسئول آزمایشگاه پژوهشی دانشکده علوم فنون دریایی، آقای بابایی مسئول آزمایشگاه شیمی پژوهشکده آبزی پروری انزلی و خانم دکتر فلاحی رئیس ایستگاه تحقیقات تکثیر و پرورش آبزیان دریایی سپاسگزاری میگردد.

منابع

محمد جانی، م . و فلاحی کپور چالی ،م.۱۳۷۶. شناسایی پلانکتون های گیاهی مرداب انزلی.مرکز تحقیقات شیلات گیلان،ایران.

رستمی، ش.۱۳۷۸. اندازه گیری آلاینده های آلی و قدرت خود پـالایی در رودخانـه لنگـرود، پایـان نامـه کارشناسـی ارشد،دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، ایران.

کردوانی،پ. ۱۳۷۴.اکوسیستم های آبی ایران. انتشارات قومس، تهران.

کلارک ، ر.ب. ۱۹۹۲.آلودگی دریا ،۱۳۷۹،مترجمین؛محمد علی زاهد،زینب محمدی دشتکی.تهـران. انتشـارات نقـش مهر ،تهران.

Fargašová, F., Ondrejkovičová, I.& Mašlejová, A. 2005.Effect of various copper forms on the freshwater alga,*Scenedesmus quadricauda* (TURP.)BREB.Strain Greifswald 15.Bull.Environ.Contam. Toxicol.,75: 1200-1207.

Fargašová, A. 2001.Interactive effect of manganese,molybdenum, nickle, copper l and ll,and Vanadium on the freshwater alga *Scenedesmus quadricauda*. Bull.Environ.Contam. Toxicol ., 67: 688-695.

Küpper, A ., Küpper, F, & Spiller, M. 1998.In situ detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plant.Photosynthesis Research. Marl., 58: 123-133.

Muwafq, H.M. & Markert,B .2006. Toxicity of heavy metals on *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) de brebisson in Batch Culture. ESPR .Environ. Sci.& Pollut. Research, 2: 98-104.

Pedro,N., Leao ,T.M, ,Vasconcelos,S.D. &Vasconcelos,V.M.2007. Role of marine cyanobacteria in trace metal bioavailability in seawater. Microb. Ecol. 53: 194-109.

Rehman, A.,Shakaoori, F.R. & Shakoori, A. R.2007.Heavy metal resistant *Distigma proteus* (Euglenophyta) isolated from industrial effluents and its possible role in bioremediation of contaminated wastewaters. World .J. Microbiol. Biotechno., l23:753- 758.

Shakya,K., Chettri,M.K.& Sawidis,T.2008.Impact of heavy metals(copper.zinc,lead) on the chlorophyll content of some mosses. Arch. Environ. Contam. Toxicol. Kathmandu., 54: 412-421.

Surosz,w., Palinska,K.A .2004.Effect of heavy metal stress on cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*.Arch. Environ. Contam. Toxial., 48: 40-48.

Tripathi,B N.& Gaur,p. j. 2006.Physiological behavior of *Scenedesmus sp*. during exposure to elevated levels Cu and Zn and after withdrawal of metal stress. Protoplasma., 229: 1-9.

Tripathi, B N.& Gaur.p.j. 2004. Relationship between and zinc-induced ooxidative stress and proline accumulation in *Scenedesmus sp*. Planta., 219: 397-404.

Wagdy, M.& El-Sarraf,dae.T.1995.Effect of copper photosynthetic activity and chlorophyll a content *Chaetoceros radican* Schütt. Bulletin of High Institute of Public Health..25 (2):439-446.

Mohamed, Z. A.2008.Polysaccharide as protective response against microcystin induced oxidative stress in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* and their possible significant in the aquatic ecosystem.Ecotoxicology,. 17: 504-516.