اثرات غلظت های مختلف نمک طعام بر رشد، برون ریزش آمونیوم ، فعالیت نیترات ردوکتازی و محتوای پروتئین کل در جلبک دونالیلا سالینا(*Dunaliella salina*)

افضل سادات برهانی سبزوار*[۱] ، مه لقا قربانلی[۲] و آرین ساطعی[۳]

۱ – گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان،گرگان

۲و ۳- گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد واحد گرگان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۰۲/۳۱ تاریخ پذیرش:۱۳۹۰/۰۶/۳۰

چکیده

این پژوهش ، تأثیر محیط کشت های **با غلظت های** مختلف نمک(۲/۵ و ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد نمک طعام) بر رشد، برون ریزش آمونیوم ، فعالیت نیترات ردوکتازی و محتوای پروتئین کل در جلبک *Dunaliella salina* مورد بررسی قرار گرفت. سویه جلبک مورد آزمایش از آزمایشگاه تحقیقات گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی شهید بهشتی تهیه و در ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری در ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت، کشت داده شد. شرایط کشت در آزمایشگاه با ایجاد محیط کشت استریل ، شدت نور ۵۰۰۰ لوکس ،دمای ۲۰ $\pm$ ۲۵ ، هوادهی روزانه یک ساعت فراهم شد.پس از خوگیری جلبک به مدت دوازده روز، به صورت روزانه به شمارش سلولی وبررسی میکروسکوپی مورفولوژی سلول ها اقدام گردید و درخاتمه سنجش ها انجام شد. گونه مزبوردر همه غلظت ها (۲/۵ ، ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد نمک طعام) خوگیری ورشد مناسبی را نشان دادند. میزان رشد ، برون ریزش آمونیوم ، فعالیت نیترات ردوکتازی و محتوای پروتئین کل در این جلبک مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین رشد در تیمار۷/۵ درصد نمک طعام اتفاق افتاد(رشد بهینه)و دورشدن از این میزان غلظت نمک، سبب کاهش معنی داری در رشد شد($P<۰/۰۵$). نتایج بررسی آنزیمی نشان داد که در شرایط غیربهینه(کمتر و بیشتر از ۷/۵ درصد نمک در محیط کشت) فعالیت نیترات ردوکتازی بطورمعنی داری افزایش یافت(($P<۰/۰۵$)، ولی این تیمارها اثر معنی دار ی روی میزان برون ریزی آمونیوم و محتوای پروتئین کل نداشتند($P<۰/۰۵$).

واژگان کلیدی: دونالیلا سالینا، نمک،آمونیوم، پروتئین، نیترات ردوکتاز

*نگارنده پاسخگو: afzalborhani@yahoo.com

مقدمه

جلبک سبز *Dunaliella salina* دارای ویژگی سازگاری دردامنه شوری گسترده ای می‌باشد. این جلبک در دامنه شوری نیم تا۵ مول نمک طعام رشد نموده ومحدوده گسترده ای از نمک طعام را از طریق سنتز گلیسرول تحمل می کند. دیواره سلولی ندارد، بلکه تنها یک غشاء پلاسمایی نازک دارد(Pick, 1998). استرس شوری منجر به یک رشته تغییرات در عملکرد های اساسی نظیر فتوسنتز، تنفس نوری و سنتز آمینو اسیدها و کربو هیدرات ها در این جلبک می‌شود (Kawasaki *et.al.*,2001). شوری یکی از فاکتور های اصلی محدود کننده رشد در گیاهان است و فعالیت های متابولیکی مرکزی نظیر فتو سنتز را در گیاهان و سیانوباکترها را متوقف می کند. اغلب گیاهان می توانند به شوری های پایین و ملایم سازش یابند، لیکن به شدت در شوری های بیش از ۲۰۰میلی مول محدودمی‌شوند(Hasegava *et al.*,2000). دونالیلا موجود فتوسنتز کننده غالب در بسیاری از محیط های شوراست که به دامنه وسیعی از شوری سازش یافته است. توانایی دونالیلا در تشدید فعالیت فتو سنتزی در شوری بالا قابل توجه است (Liska *et al.*,2004). به دلیل تغییرات مورفولوژی زیاد حتی در یک گونه، درتشخیص وطبقه بندی صحیح این جلبک اغتشاشات زیادی دیده می‌شودوگاه حتی گونه های تجمع یافته در یک محیط کشت، انطباقی با هم ندارند.مطالعات کمی در مورد ارزیابی جمعیت دونالیلا در سالترنها و دریاچه های نمک، ظهور و نابودی آنها و سهم این جلبک ها در تولید اولیه در زیستگاه انجام شده است.نخستین گزارشات مقادیر تولید اولیه را در شوری

۱۳۵ گرم در لیتر دربازوی جنوبی دریاچه بزرگ نمک دریوتا گزارش کردند (Oren *et.al*., 2005). Labbe(1922, 1921) تغییرات ساختار جامعه جلبکی را نشان داد و ارتباط آن را با تغییرات در آب نمک روشن ساخت. او اثر شدت نور ، دما و اسیدیته آب را نیز بررسی نمود. تئودورسکو دو گونه ***Dunaliella salina*** و ***Dunaliella viridis*** را معرفی کرد (Teodoresco, 1905,1906).امروزه تحقیقات گسترده ای در جهت کاربردی کردن ویژگی های این جلبک ها در جریان است.

محیط کشت جلبک ***Dunaliella salina*** ، به دلیل نرخ نسبتاً بالای خروج آمونیوم، احتمالاً می تواند به عنوان محلول واجد نیتروژن، مورد استفاده قرار گیرد.به همین دلیل در هند و سایر کشور هااستفاده از جلبک دریایی به عنوان کود بیولوژیک برای سبزیجات پیشنهاد شده است(Thivy,1964). کارایی جلبک دریایی به عنوان کود کشاورزی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Lopez *et al*.,1997). دراین پژوهش پس از تعیین اثر محیط کشت های ۲/۵ ،۷/۵ و ۱۲/۵ درصد نمک طعام بر رشد جلبک *Dunaliella salina* ،اثرات این محیط ها بر فعالیت نیترات ردوکتازی و برون ریزش آمونیوم و محتوای کل پروتئین در این جلبک مورد بررسی قرار گرفت.امید می رود با تحقیقات بیشتر بتوان استفاده از محیط کشت و یا عصاره جلبکی*Dunaliella salina* را به عنوان کود بیولوژیک ،کاربردی نمود.

مواد و روش ها

محیط کشت طبق روش جانسون(Johnson *et al*., 1968) تهیه و با اضافه نمودن درصدهای مختلف نمک (۲/۵ ، ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد) اماده شد. نمونه جلبک از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی شهید بهشتی تهیه شد. قفسه‌های اتاقک کشت در یک اتاق به دیوارها عمود شدند. زمان نوردهی به وسیله دستگاه مربوط به تنظیم زمان در ۲۰ ساعت تاریکی و ۴ ساعت نوردهی تنظیم شد. شدت نور در هر طبقه به وسیله دو لامپ فلور سنت سفید و یک لامپ زرد(۲۰ وات)، حدود ۵۰۰۰ لوکس تامین گردید. دمای اتاق کشت بین۲۵-۳۰ درجه سانتی گراد تنظیم گردید. هوادهی کشت ها توسط پمپ های هوادهی اکواریوم ، روزانه یک ساعت و معمولا ، صبح ها انجام شد(حسینی، و ساطعی ۱۳۸۵).

به منظور خوگیری این جلبک با شرایط محیط ، پیش از آغاز بررسی، چند دوره واکشت شد. سپس نمونه جلبک در شرایط سترون به محیط کشت جدید انتقال یافت .بدین منظور پانزده میلی لیتر از محیط کشت واجد جلبک در لوله های آزمایش در۴۰۰ دور و مدت زمان ۳۰ دقیقه سانتریفوژشد . سپس لایه رویی دور ریخته شده وبه جلبک های رسوب کرده، ۱۰ میلی لیتر از محیط جدید اضافه شد. جلبک پس از هم زدن به یک ارلن ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۹۰ میلی لیتر محیط کشت جدید منتقل شد .تعداد جلبک در واحد حجم محیط کشت جدید در آغاز حدود۲×۱۰^{۴} سلول در میلی لیتر بود.

شمارش و بررسی میکروسکوپی با استفاده از لام نئوبار وازطریق مشاهده با میکروسکوپ اولمپوس به صورت روزانه در دروه پژوهش (۱۲ روز)(هر صبح)صورت گرفت. اولین شمارش بلادرنگ پس از تلقیح جلبک ها انجام شد(حسینی و ساطعی،۱۳۸۵).

برای سنجش فعالیت نیترات ردوکتاز، ۱۰ میلی لیتر از سوسپانسیون جلبکی به هر یک از لوله های توزین شده، اضافه و در ۲۵۰۰ دور به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس لوله های حاوی رسوب جلبک دوباره توزین گردیدند. به لوله های حاوی جلبک، ۵ میلی لیتر محلول انکوباسیون حاوی نیترات اضافه شده و مخلوط شد. پس از ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه، به ۲ میلی لیتر ازمحلول فوق، ۱میلی لیتر محلول گریس I و ۱ میلی لیتر محلول گریس II افزوده و سپس به کمک اسپکتروفتومتر جذب محلول در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. غلظت نیتریت حاصل از احیای نیترات با لحاظ جذب نوری محلول های استاندارد نیتریت سدیم تعیین گردید (Sym,1993).

برای سنجش آمونیوم ۱۰ میلی لیتراز سوسپانسیون جلبکی را سانتریفوژکرده و پس از جدا کردن محلول رویی ابتدا یک قطره محلول(۰/۰۵میلی لیتر) $MnSO_4$ به آن افزوده و مخلوط با همزن مغناطیسی هم زده شد . سپس به آن ۰/۵میلی لیتر اسید هیپوکلروس افزوده گردید . بلافاصله ۶ /۰ میلی لیترمعرف فنات اضافه گردید . برای هر نمونه باید از محلول های شاهد و استاندارد استفاده شد و دستگاه اسپکتروفتومتر بر این اساس تنظیم گردید. نمونه شاهد، آب مقطر بدون آمونیاک بود که جهت صفر کردن دستگاه از آن استفاده شد. تشکیل رنگ محلول ها در مدت ۱۰ دقیقه کامل شد.جذب های نوری در طول موج ۶۳۰ =λ نانومتر خوانده شد. از طریق منحنی استاندارد غلظت آمونیوم تعیین گردید (Solarzona,1969).

سنجش پروتئین کل به روش براد فورد(Bradford,1976)صورت گرفت.ابتدا معرف براد فورد با مخلوط کردن ۱۰۰ میلی گرم رنگ کوماسی بلو G250 و ۵۰ میلی لیتر الکل اتیلیک خالص و اضافه کردن ۱۰۰ میلی لیتر اسید فسفریک آماده شد.پس از اضافه نمودن ۱۵۰ میلی لیتر آب مقطر به مخلوط فوق وهم زدن، مخلوط صاف شد. محلول حاصل از صاف کردن (از نور دیدن ان جلوگیری شد) ، با اب مقطر به۱۰۰۰ میلی لیتر رسانده شد.جهت تهیه عصاره جلبکی*Dunaliella salina* ده مبلی لیتراز ان (همراه با توزین نمونه جلبک، به منظورلحاظ کردن در محاسبه نهایی) سانتریفوژشد. سپس رنگ بری جلبک به وسیله شستشو با استفاده از استن ۸۵ درصد و سانتریفوژ مجدد انجام شد. انگاه استخراج پروتئین جلبک از رسوب جلبکی حاصل از مرحله قبل با استفاده ازمحلول عصاره گیری پروتئین(Koroi , 1989)به عمل امد.

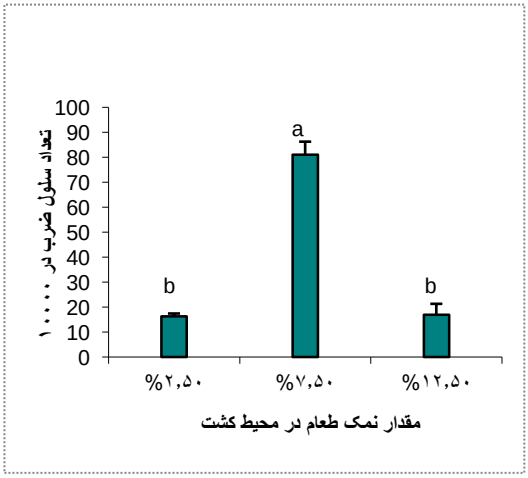
به منظور سنجش پروتئین کل به ۰/۱ میلی لیتر (۱۰۰ میکرو لیتر) عصاره پروتئینی ۵ میلی لیتر معرف براد فورد افزوده و بلافاصله جذب محلول حاصل در طول موج ۵۹۵ نانو متر سنجش گردید.سپس از طریق رسم منحنی استاندارد محلول های ۲۰ ، ۴۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکروگرم در لیتر آلبومین، مقدار پروتئین درهر نمونه، از معادله تغییرات جذب نسبت به غلظت محاسبه گردید.

جهت انالیز اماری ازآنالیز واریانس یک طرفه در سطح ۰/۰۵ از نرم افزار(Spss(11.5 استفاده گردید. نمودارها با نرم افزار Excell 2003رسم شد.

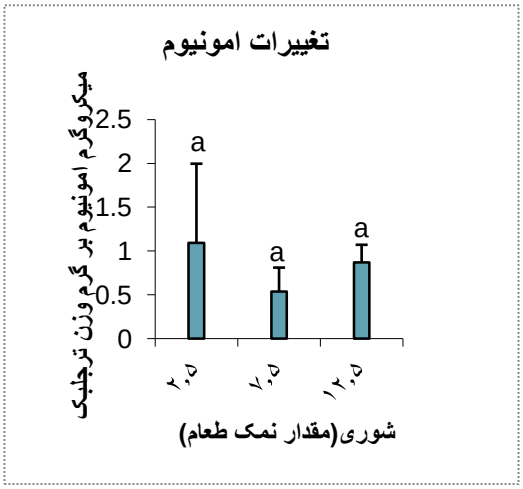
نتایج

باشمارش تعداد سلول ها در تیمارهای ۲/۵ ، ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد نمک طعام بیشترین میزان رشد در تیمار ۷/۵ درصد مشاهده شد(رشد بهینه) .این رشد در مدت ۱۲ روز در تیمار فوق تفاوت معنی داری با رشد این جلبک درتیمارهای ۲/۵ و ۱۲/۵ درصد داشت($P<۰/۰۵$) (شکل ۱).در تیمار ۷/۵ درصد نمک طعام میانگین تعداد سلول جلبک ۸۱×۱۰^{۴} ودر تیمار۲/۵درصد نمک طعام کمترین تعداد یعنی ۱۶×۱۰^{۴}عددو در تیمار ۱۲/۵ درصد نمک طعام میانگین تعداد به ۱۷×۱۰^{۴} رسید.

در نمودار ها حروف نامشابه(aوb) روی هر ستون نشان دهنده معنی دار بودن و حروف مشابه(aوa یاbوb)علامت بی معنی بودن تفاوت در مقادیر از نظر اماری می باشد.

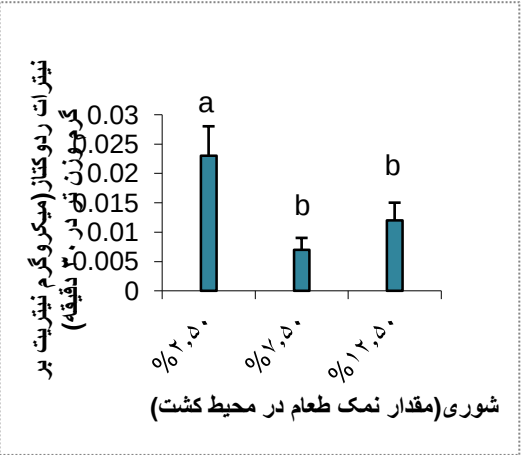


شکل ۱- مقایسه رشد میانگین*Dunaliella salina* در سه تیمار۲/۵، ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد نمک طعام در دوازده روز شمارش(انتنک ها نشان دهنده انحراف معیار است).



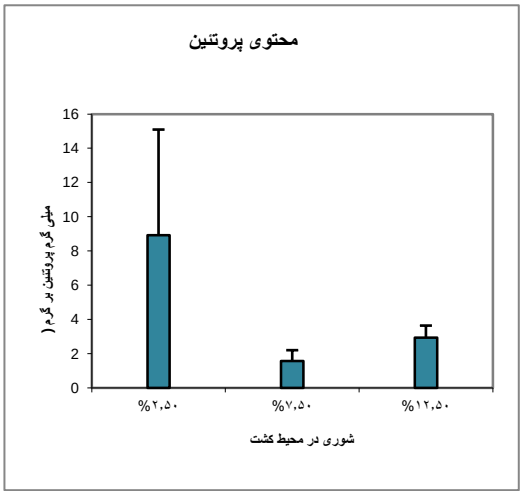
شکل ۲ -اثر تیمارهای ۲/۵ ،۷/۵و ۵/ ۱۲ درصد نمک طعام بر آزاد سازی آمونیوم در*Dunaliella salina* (انتنک ها نشان دهنده انحراف معیار است)

اثرکلی تیمار بر آزاد سازی آمونیوم در*Dunaliella salina* معنی دار (P<۰/۰۵) نبود . اما بطور میانگین آزاد سازی آمونیوم در تیمار ۲/۵ و ۵/ ۱۲ بیشتر بود. (شکل ۲).



شکل ۳-اثر تیمارهای۲/۵ ، ۷/۵ و ۵/ ۱۲ درصد نمک طعام بر تغییرات فعالیت نیترات ردوکتازی در*Dunaliella salina* (انتنک ها نشان دهنده انحراف معیار است)

اثر تیمارهای ۲/۵ ، ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد نمک طعام بر فعالیت نیترات ردوکتازی*Dunaliella salina* معنی دار بود(۰/۰۵ >P). در تیمار۲/۵درصد نمک طعام، فعالیت نیترات ردوکتازی*Dunaliella salina* افزایش معنی داری نسبت به دو تیمار دیگر داشت) (P<۰/۰۵) (شکل ۳).



شکل ۴-اثر تیمارهای ۲/۵ ،۷/۵ و ۱۲ /۵ درصد نمک طعام برمحتوای پروتئین کل(میلی گرم بر گرم وزن تر ***Dunaliella salina***) (انتک ها نشان دهنده انحراف معیار است)

اثر تیمارهای ۲/۵ ، ۷/۵ و ۱۲/۵ درصد نمک طعام بر مقدار پروتئین ***Dunaliella salina*** معنی‌دارنبود (P<۰/۰۵).
مقدار پروتئین در تیمار ۲/۵ درصد بیشتر از میزان آن در تیمار ۷/۵ درصدو ۱۲ /۵ درصد بود. (شکل ۴) (P<۰/۰۵).

بحث و نتیجه گیری

بررسی نتایج رشدجلبک نشان داد که میزان رشد روزانه ***Dunaliella salina*** به طور کاملا روشنی در تیمار۷/۵ درصد نمک طعام نسبت به دوتیمار دیگر بیشتر است و تفاوت میزان روندان با دو تیمار دیگر معنی دار است(شکل۱) (P<۰/۰۵).
همچنین تحقیقات قبلی حسینی و ساطعی (1385)نیز نشان داده بودکه این غلظت از نمک شرایط بهینه ای برای رشد جلبک ***Dunaliella salina*** فراهم میکند. ظاهراً دور شدن ازغلظت بهینه نمک،عامل ایجادتنش برای سلول است. مقدار پروتئین سنجش شده در ***Dunaliella salina*** تفاوت معنی داری در سه تیمار نشان نداد(شکل۴).اگر چه مقدار پروتئین در تیمار۲/۵درصد نمک طعام(۸/۹۱۱ میلی گرم بر گرم) بیشتراز دو تیمار دیگر بدست امد. در تیمار۱۲/۵درصد نمک طعام میانگین این مقدار۲/۹۳۴ و در تیمار ۷/۵ درصد ۱/۵۵۹ میلی گرم بر گرم بود. اما ثابت شده است که با افزایش شوری نسبت به وضعیت بهینه، بیان ژن پروتئین هایی القا می شود که با رفع تنش در ارتباط می باشند. بطور مثال پروتئین ۱۵۰ کیلو دالتونی شناسایی شده است که با شوک نمک بالا در ***Dunaliella salina*** درپاسخ به شوک اسمزی و نیزدرست منطبق با از سرگیری تقسیم سلولی افزایش می یابد (Sadka *et al.*,1991). ظاهراً کاهش وافزایش نمک نسبت به وضعیت بهینه(۷/۵ درصد) نوعی تنش محسوب می شود که برای رفع آن جلبک ها، آنزیم هایی از جنس پروتئین را سنتز می کنند. از آنجا که جلبک دونالیلا از یون های Na^+ در امر انتقال Pi و سولفات و تنظیم اسیدیته سود می برد (Meira *et al.*,2001)،احتمالاً کمبود این آنیون ها نسبت به شرایط مناسب، از این جهت نیز به ایجاد تنش منجر می شود. فعالیت نیترات ردوکتازی در ***Dunaliella salina*** درغلظت ۲/۵ درصد نمک طعام نسبت به غلظت ۷/۵درصدافزایش معنی‌داری نشان داد($P<0.05$). فعالیت نیترات ردوکتازی به سرعت در پاسخ به تنش آبی تغییر می کند وبا کاهش پتانسیل آبی در محیط، فعالیت این انزیم مهار می شود.(Tejo & Diaz, 1987).بنا براین طبیعی است که با افزایش پتانسیل آبی در تیمار۲/۵ درصد فعالیت این آنزیم افزایش یابد. به نظر می رسد با افزایش پتانسیل آبی ، میزان نیتراتی که در دسترس نیترات ردوکتازقرار می گیرد، و به تبع آن القاء بیان ژن های سازنده نیترات ردوکتاز و یا رکود فرآیند های تخریبی آن افزایش می یابد. این امر در ذرت وجو نیز مشاهده شده است (Bandruska,1991). به عقیده پژوهشگران غیر فعال شدن این آنزیم توسط فسفریلاسیون و نیز فعال‌شدن آن با حذف فسفر صورت می‌گیرد(Kojima *et al.*, 1995). درشوری ۲/۵ درصد نمک طعام نسبت به شوری ۷/۵ درصد نظر به کاهش یون سدیم و کاهش تبادل فسفات که به این یون وابسته است، نتیجه، مطابق با انتظار است.

در شوری۷/۵ درصد نمک طعام نیز فعالیت این آنزیم در *Dunaliella salina* مهار می‌شود.دراین شرایط کاهش فعالیت نیترات ردوکتاز ناشی از کاهش میزان سنتز این آنزیم می باشد که نسبت به افزایش تخریب آن و یا اثر مستقیم کاهش پتانسیل آبی بر روی فعالیت این آنزیم ارجح تر است. در تیمار ۱۲/۵ درصد نمک طعام نیز افزایش نسبی در فعالیت این آنزیم نسبت به تیمار ۷/۵ درصد دیده می‌شود که معنی دار نبود . اما در این شرایط این افزایش، احتمالا به دلیل افزایش فعالیت کربنیک انهیدراز و تامین CO_2، رخ می‌دهد. زیرا یکی دیگر از دلایل افزایش فعالیت نیترات ردوکتاز افزایش غلظت CO_2 می-باشد(Kaiser *et al.*,1981).

اثر تیمارهای مختلف نمک طعام برمیزان آزادسازی آمونیوم معنی دارنبود($P<۰/۰۵$) .این امر نشان می دهد که اگر بتوان جلبک *Dunaliella salina* را با امکانات نسبتاً ارزان در محیط کم نمک رشد داد ، به راحتی می توان از آن در تهیه کود بیولوژیک استفاده نمود.

نتیجه کلی این تحقیق بیان می کند که رشد جلبک در محیط با غلظتی از نمک طعام که ضمن تامین بیشترین رشد جلبکی ،کمترین هزینه را برای تولید و کمترین آسیب را برای محیط زیست و گیاهان فراهم سازد کافیست تاامکان دستیابی به کودی ارزان و بیولوژیک فراهم شود.

منابع

حسینی، ز. و ساطعی، آ. ۱۳۸۵. تغییرات رشد، برون ریزش آمونیوم، فعالیت نیترات ردوکتازی و محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی در جلبک دونالیلا سالینا، تحت تاثیر شوری، نور ممتدو تناوب نور. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان.

Bandruska, H. 1991. Effect of proline on nitrate reductase activity in water stress Barely leaves .Acta. Physiol. Plantarum., 13 (1):3-11.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. , 72: 248-254.

Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J. & Bokher, H.J. 2000. Plant cellular on molecular responses to high salinity. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 51:463-499.

Johnson, M. K., Johnson, E.J., MacElroy, R.D., Speer, H.L. & Bruff, B.S. 1968. Effects of salts on the halophilic alga *Dunaliella viridis*. J. Bacteriol., 95:1461-1468.

Kaiser, W.M., Kaiser, G., Prachaub, P.K., Wildman, S.C. & Hfber, U. 1981. Photosyntesis under osmotic stress, Inhibition of photosyntesis of intact chloroplast, protoplast and leaf slices at high osmotic potentials. Planta, 153: 416-422.

Kawasaki, S., Borchert, C., Deholos, M., Wany, H., Brazilles, Kawai, K., Gal braith, D. & Bohnert, H.J. 2001. Gene expression profile during the initial phase of salt stress in rice. Plant Cell, 13:889-905.

Kojima, K., Fukui, K., Sugimito, J. S. & Nannro, T. 1995.Phosphorylation dephosphorylation of komatsuna (*Brassica campestris*)leaf nitrate reductase in vivo and in vitro response to environmental light condition effects of protein kinase inhibition .Physiologia Plantarum, 93:139-145.

Koroi, S.A.A. 1989. Gel elektropheres tisch and spephotometris echoe unter uchangen zomeinfiuss der temperature auf straktur and aktritat der amylase and peroxidase isoenzyme. Physiol. Veg., 20: 15-23.

Labbé, A. 1921. Le cycle évolutif de *Dunaliella salina*. C R Acad Sci., 172:1689-1690.

Labbé A. 1922. Les variations de la concentration en ions hydrogen dans les marais salants, comme facteur biologique. C R Acad. Sci., 175:843-845.

Liska. A. J., Shevhenko, A., Pick, U. & Katz, A. 2004. Enhanced photosynthesis and redox energy production contribute to salinity tolerance in *Dunaliella* as revealed by homology-based proteomics. Plant Physiol., 136:1-12.

Lopez Mosquera, M. E. & Pazos, P.1997. Effects of seaweed on potato yields and soil chemistry. Biol. Agric. Hortic, 14:199-205.

Meira, W., Haimovich, G. A. I. & Pick, U. 2001. Phpsphate and sulfate uptake in the halotolerant alga, *Dunaliella* are driven by Na+-symport mechanism. Journal of Plant Physiology, 158(12): 1519-1525.

Oren, A., Gurevich, P., Anati, D. A., Barkan, E. & Luz, B. 1995. A bloom of *Dunaliella parva* in the Dead Sea in 1992: biological and biogeochemical aspects. Hydrobiologia, 297:173-185.

Pick, U. 1998. *Dunaliella* a model extremophilic alga. Israel J. Plant Sci., 46: 131-140.

Sadka, A., Himmelhoch, S. & Zamir, A. 1991. A 150 kilodalton cell surface protein is induced by salt in the halotolerant green alga *Dunaliella salina*. Plant Physiol., 95:822-831.

Solarzano, L. 1960. Determination of ammonia in natural waters by the phenol – hypochlorite method Limno Oceanogr., 914:799-801.

Sym, G. J. 1993.Optimisation of the in vivo assay condition for nitrate reductase in barley(*Hordeum vulgar* L.V.Igri) J. Sci. Food Agric., 35:725-730.

Tejo, P.A. & Diaz, N.S.1987. Nodule and leaf nitrate reductase and nitrogen fixation in *Medicago sativa* L.under water stress. Plant Physiol., 69: 479-482.

Teodoresco, EC. 1905. Organisation et développement du Dunaliella, nouveau genre de Volvocacée-Polyblepharidée. Beih Z. Bot. Centralbl, Bd. XVIII: 215-232.

Teodoresco, E.C. 1906. Observations morphologiques et. biologiques sur Genre Dunaliella. Rev. Gén. Bot., 18:353-371.

Thivy, F. 1964. Marine algal cultivation. Salt Res.Ind., 1:23-28.