اثر آلومینیوم بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان، اسمولیت‌ها، نیترات ردوکتاز و برون ریزش آمونیوم در *Dunaliella salina Teodoresco*

آرین ساطعی[1]*، مه لقا قربانلی[2]، فاطمه یدالهی[3]

دانشکده علوم، گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

*** Sateei_a@yahoo.com**

۱-عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان،استاد راهنما

۲- عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان، مشاور

۳-دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

آدرس :دانشکده علوم ،گروه زیست شناسی دانشگاه آراد اسلامی واحد گرگان

مقدمه

آلومینیوم یک عنصر شیمیایی با علامت Al و عدد اتمی ۱۳ است.عنصری نقره ای رنگ و انعطاف پذیر است. عمدتاً بـه صورت سنگ معدن بوکسیت یافت می‌شود و از نظر مقاومتی که در برابر اکسیداسیون دارد، همچنین وزن و قـدرت آن قابـل توجه است. آلومینیوم دارای ۹ ایزوتوپ است که عمده‌ترین آنها بین ۲۳ تا ۳۰ مرتب شده‌اند. تنها Al-27 (ایزوتپ پایدار) و Al-26 (ایزوتپ رادیواکتیو) به طور طبیعی وجود دارند.آلومینیوم به صورت کاتیون سه ظرفیتی محلول است کـه در غلظـت میلی مولار باعث سمیت در گیاهان می‌شود. اطلاعات بیولوژیکی اثرات آلومینیوم در جـانوران، گیاهـان و جلبـک‌هـا حـاکی اثرات منفی و بازدارنده آن است که معمولاً نیز با تغییر pH انجام مـی‌گیـرد. در میـان میکروارگانیسـم‌هـا بیشـترین مقاومـت اسیدی به آلومینیوم مربوط به مخمرها و قارچ هاست. سمیت آلومینیوم فاکتور محدود کننده رشد برای گیاهان در خـاک‌هـای اسیدی با pH زیر ۵ تا ۵/۵ می‌باشد (Adams, 1979&Alam).

پاسخ به استرس آلومینیوم با تولید اکسیژن‌های واکنشگر مانند رادیکال سوپراکسید، رادیکال هیدروکسیل، رادیکال اکسیژن، اکسیژن یکتایی و مولکول‌های سمی پراکسید هیدروژن همراه است (Teresa *et al.*, 2003). اکسیژن‌های واکنشگری که در سلول تولید میشوند به وسیله دو سیستم آنتی اکسیداتیو آنزیمی و غیر آنزیمی سم زدایی میشوند در صورت عدم سم زدایی موجب آسیب جدی به پروتئین ها، لیپیدهاواسیدهای نوکلئیک میشوند.به طور کلی فلزات سنگین استرس اکسیداتیو را القاء می‌کنند. و نیز با گسیختن زنجیره انتقال الکترون منجر به تولید آنیون سوپر اکسید می‌شوند (Asadi and Takahashi, 1987). موجودات زنده مکانیسم‌های دفاعی متفاوتی را در مقابل آلومینیوم به کار می گیرند، که شامل عدم فرایند انتقال یون‌های سه ظرفیتی می باشد.به نظر میرسد ترکیباتی که با آلومینیوم کمپلکس پایداراسیدهای آلی تشکیل میدهند، مانند اگزالات، اثر سمی آلومینیوم را تخفیف می‌دهند. تاثیرات مهم آلومینیوم بر سلول‌های جلبک شامل لیز شدن و زوال تدریجی غشاهای سلول ها است. به نظر می‌رسد که آلومینیوم به صورت سینرژیکی روی غشای سلولها اثر گذاشته و آن‌ها را به سمت زوال و نابودی می‌کشاند (Sacan *et al.*,2007).همچنین فلزات دیگر نیز میتوانند بر روی جلبک ها تاثیر بگذارند، از جمله این فلزات میتوان به سیلیکون اشاره کرد که در حضور آلومینیوم رشد را در جلبک ***Dunaliella teodoresco salina*** تحریک میکند.این در حالی است که در جلبت کلرلا وولگاریس این مسئله در عدم حضور سیلیکون اتفاق می افتد (Exley *et al.*, 1993). همچنین کادمیوم نیزبر فتوسنتز جلبک ***Dunaliella salina teodoresco*** از طریق کم کردن میزان کلروپلاست تاثیر گذار است ،علاوه بر این کادمیوم باعث افزایش میزان لیپید وکاهش حجم پیرونوئید نیز

میشود(Visviki & Rachlin ,1993) .به طور کلی هدف از این تحقیق بررسی اثر غلظت‌های مختلف آلومینیوم بر فعالیت آنتی اکسیدان ها، اسمولیتها، نیترات ردوکتاز و برون ریزش آمونیوم با توجه به نقش حساس آنها در نمو ***D. salina*** بوده است.

مواد و روشها

جلبک دونالیلا سالینا در محیط کشت جانسون دارای AlCl3 با غلظت های مختلف ۰،۱۰۰،۲۰۰،۳۰۰،۴۰۰،۵۰۰و ۱۰۰۰میکرومولار ، pH7/5 با دمای۲ ± ۲۲ درجه سانتی گراد و شدت نور ۱۵۰۰ لوکس با تناوب ۲۰ساعت روشنایی و ٤ساعت تاریکی در طی ده روز رشد داده شد، همچنین هوادهی به کمک پمپ هوادهی در هر روز انجام شد. نتایج حاصل از سنجش مقادیر مختلف با در نظر گرفتن ۳ تکرار برای هر مورد محاسبه و به صورت میانگین و انحراف معیار معرفی شده‌اند. آزمون آنالیز واریانس (Anova) با استفاده از نرم‌افزار SPSS در سطح ۰/05 انجام شدند و برای رسم نمودارها از نرم‌افزارها Excel استفاده شد.

سنجش فعالیت پراکسیداز(Koroi, 1989)

جهت بررسی اثر آلومینیوم بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در جلبک مراحل زیر انجام شد.

الف) تهیه محلول عصاره‌گیری

1/2گرم تریس با ۲ گرم اسید اسکوربیک، 3/8 گرم بوراکس، ۲ گرم $EDTA\ Na_2$ و ۵۰ گرم پلی اتیلن گلیکول ۲۰۰۰ مخلوط و توسط آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر رسانیده شد و رساندن حجم به ۱۰۰میلی لیتر با آب مقطر.

ب) استخراج عصاره آنزیمی

سائیدن جلبک با چهار میلی‌لیتر محلول عصاره گیری، سانتریفوژ محلول به مدت نیم ساعت با ٤۰۰۰ دور، نگهداری محلول رویی در دمای ٤۰۰درجه سانتیگراد.

ج) سنجش فعالیت آنزیم

مخلوط کردن ۱ میلی لیتر تامپون استات ۰/۲ مولار با ۰/٤ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳ درصد و ۰/۲ میلی‌لیتر بنزیدین محلول در الکل ۵۰ درجه و ۰/۰۱ مولار، اضافه کردن ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به مخلوط و خواندن جذب در طول موج ۵۳۰ نانومتر و محاسبه فعالیت آنزیم.

سنجش فعالیت کاتالازی (Chance and Maehly, 1995)

۵ میلی لیتر مخلوط اندازه‌گیری فعالیت آنزیم شامل ۳۰۰ میکرومول بافر فسفات با pH 6.8، ۱۰۰۰ میکرومول آب اکسیژنه تهیه شده و ۱ میلی لیتر عصاره آنزیمی دوباره رقیق شده، قرار دادن مخلوط به مدت ۱دقیقه در دمای ۲۵درجه سانتی گراد قرار گرفته و ۱۰ میلی لیتر اسید سولفوریک ۲درصد (به نسبت حجمی) به مخلوط جهت توقف فعالیت آنزیم اضافه شد. مخلوط حاصل با پرمنگنات پتاسیم ۰/۰۱ نرمال تا تشکیل رنگ صورتی کمرنگ تیتر شد. فعالیت آنزیم بر حسب تجزیه یک میکرومول آب اکسیژنه در یک دقیقه محاسبه شد .

سنجش فعالیت آسکوربات پراکسیدازی (Arrigoni et al, 1994)

جهت بررسی فعالیت این آنزیم از عصاره آنزیمی آنزیم پراکسیداز استفاده می‌شـود. در ایـن سـنجش ۲میلـی لیتـر بـافر فسفات ۰/۰۵ مولار را با ۲ میلی لیتر آب اکسیژنه ۳درصد و ۰/۲ میلی‌لیتر اسکوربات۵۰ میکرو مولار در حمـام یـخ مخلـوط نموده و بلافاصله ۰/۱ میلی لیتر عصاره آنزیمی به آن اضافه کرده سپس تغییرات جذب در ٦٢٥ نانومتر خوانده شد .

سنجش فعالیت سوپر اکسید دیسموتازی(Giananntolitis &Ries, 1977)

پس از تهیه عصاره آنزیمی فعالیت سوپراکسید دیسموتازی با اندازه گیری قابلیت هر عصاره در بازداشت واکنش احیای فتوشیمیایی نیترو بلوتترازولیوم تعیین شد.سپس خواندن جذب در طـول مـوج ٥٦٠ نـانومتر، توسـط محلـول دارای عصـاره آنزیمی بدون روشنایی به عنوان شاهد تنظیم گردید.سپس فعالیت انزیم سوپراکسیددیسموتازی بر اساس واحد آنزیمی بـرای تمام نمونه‌ها در مدت ١٦ دقیقه محاسبه شد.

سنجش گلیسین بتائین (Sairam & Srivaatava, 2002)

ده میلی لیتر جلبک در لوله‌های توزین شده در ۱۰۰۰ دور سانتریفوژ شده، رسوب جلبکی را در ۲۰ میلی‌لیتـر آب مقطـر ساییده دوباره سانتریفوژ کرده، محلول رویی به نسبت یک به یک با اسید سـولفوریک ۲ نرمـال رقیـق کـرده، ۰/۸ میلـی‌لیتـر یدیدین اضافه کرده و هم زده شد. محلول ١٦ساعت در دمای صفر درجـه نگهـداری شـد، سـپس در ۱۰۰۰ دور سـانتریفوژ گردیده و یک میلی‌لیتر از محلول رویی جدا و با ۹ میلی لیتر ۱ و۲ دیکلرواتان مخلوط و هم زده شد. پس از ۳ ساعت جذب محلول تحتانی در طول موج ٣٦٥ نانومتر خوانده شد.

سنجش پرولین (Bates *et al*., 1973)

پس از تهیه معرف‌ها (اسید نینهیدرین، اسید استیک خالص و تولوئن) ۱۰ میلی‌لیتر جلبک در لولـه‌هـا تـوزین شـده، در ۱۰۰۰ دور سانتریفوژ شده، در ۱۰ میلـی لیتـر محلـول ۳ درصـد اسـید سولفوسالسـیلیک سـائیده شـد. سـپس در ۱۰۰۰ دور سانتریفوژ و ۲ میلی لیتر محلول رویی را به لوله دیگر منتقل کرده، ۳ میلی‌لیتر اسـید نینهیـدرین و ۳ میلـی‌لیتـر اسـید اسـتیک خالص اضافه کرده سپس ٤ میلی‌لیتر تولوئن اضافه شد. پس از ثابت شدن و تشکیل دو لایه رنگی مجزا، جذب لایـه فوقـانی در طول موج ٥٢٠ نانومتر خوانده شد.

سنجش فعالیت نیترات ردوکتاز(Sym, 1984)

جهت بررسی فعالیت نیترات ردوکتاز در ابتدا جلبک توزین و به مدت یک ساعت در دمـای ۳۰ درجـه سـانتی‌گـراد در تامپون فسفات نگهداری شد.بعد ازگذشت مدت زمان لازم ۲ میلی‌لیتر از محلول، یک میلی لیتر گـریس یـک و دو افـزوده و جذب نوری آن در طول موج ٥٢٠ نانومتر خوانده شد.جهت یافتن غلظت نیتریت حاصل از احیای نیترات تحت تـاثیر انـزیم نیترات ردوکتاز از منحنی استاندارد نیتریت سدیم در غلظت‌ها ی مختلف استفاده شد و به ازای مقدار نیتریت تولید شـده در گرم ماده تر فعالیت آنزیم محاسبه شد.

سنجش آمونیوم(Solorzano, 1969)

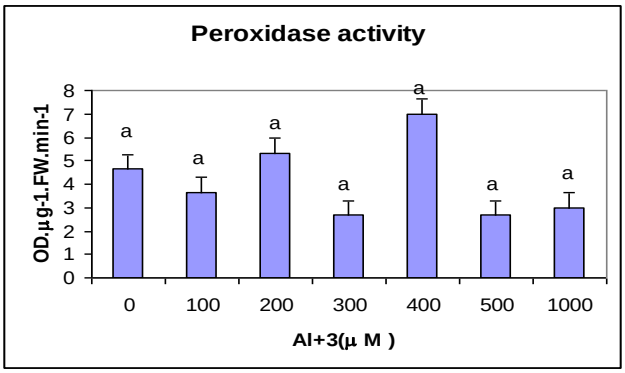
برون ریزش آمونیوم از روش فنات انجام شد به این ترتیب که۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکـی را سـانتریفوژ کـرده ابتدا یک قطره (۰/۰٥ml) محلول $MnSo_{\xi}$ به سوپر ناتانت افزوده و مخلوط را با همزن مغناطیسی هم می‌زنـیم و سـپس

به آن ۰/۵ml اسید هیپو کلروس اضافه می‌کنیم. بلافاصله یک قطره (۰/۶ml) معرف فنات افزوده شد. سپس دستگاه اسپکترو فتومتر را با شاهد صفر کرده و جذب‌های مربوطه در طول موج $\lambda = ۶۳۰nm$ خوانده شد.

نتایج

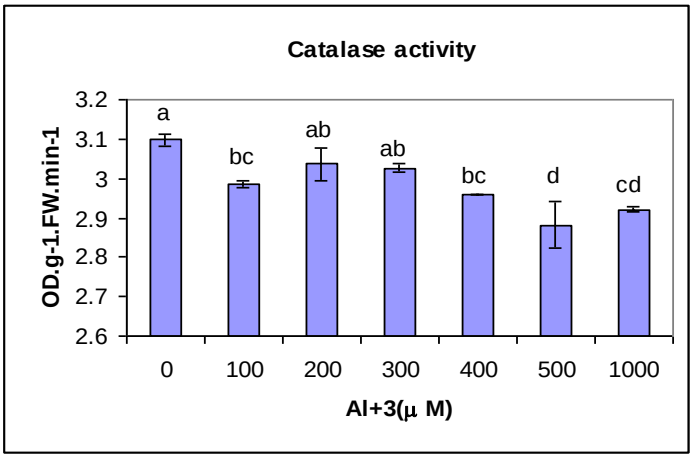
اثر آلومینیوم بر آنتی اکسیدان‌ها

– اثر غلظت‌های مختلف آلومینیوم بر فعالیت پراکسیدازی با توجه به شـکل ۱ معنـی‌دار نمـی‌باشـد($P>0.05$). تمـامی تیمارها نسبت به شاهد و یکدیگر اختلاف معنی‌داری نشان ندادند. حروف یکسان نشان دهنده این است کـه اخـتلاف معنـی داری بین تیمارها وجود ندارد.



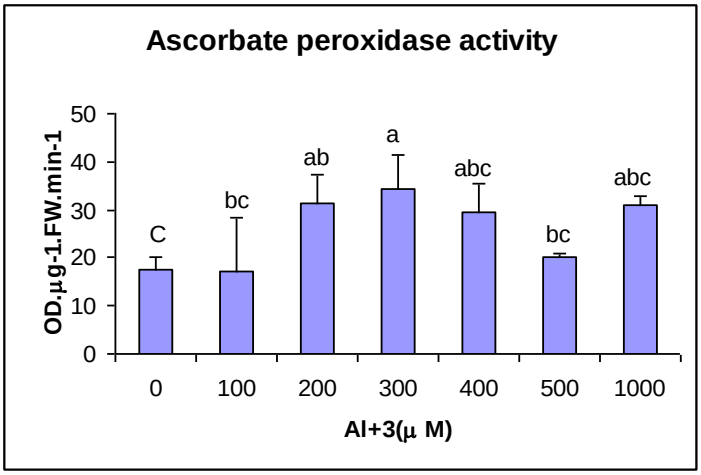
شکل ۱– فعالیت پراکسیدازی جلبک *D.salina* در غلظت‌های مختلف آلومینیوم بر حسب($\mu\ g^{-1}.FW$)

– اثر آلومینیوم بر کاهش فعالیت کاتالازبا توجه به شکل ۲ معنی‌دار می‌باشد($P>۰/۰۵$). کـاهش فعالیـت در تیمارهـای ۱۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرو مولار آلومینیوم نسبت به تیمار شاهد معنی‌دار بوده است. حروف متفاوت نشـان دهنـده ایـن است که اختلاف معنی دار بین تیمارها وجود دارد.



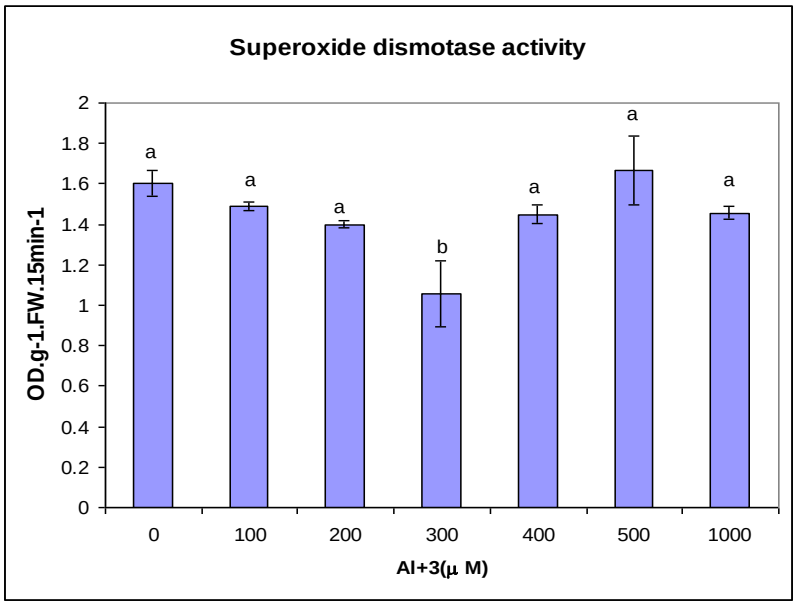
شکل ۲– فعالیت کاتالازی جلبک *D.salina* در غلظت‌های مختلف آلومینیوم برحسب ($g^{-1}.FW$)

– اثر آلومینیوم بر افزایش فعالیت اسکوربات پراکسیداز با توجه به شکل ۳ معنی‌دار می‌باشد($P>0/05$). افزایش فعالیت در تیمارهای ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرو مولار نسبت به تیمار شاهد مشاهده شده است.



شکل ۳– فعالیت آسکوربات پراکسیدازی جلبک *D.salina* در غلظت‌های مختلف آلومینیوم بر حسب($\mu g^{-1}.FW$)

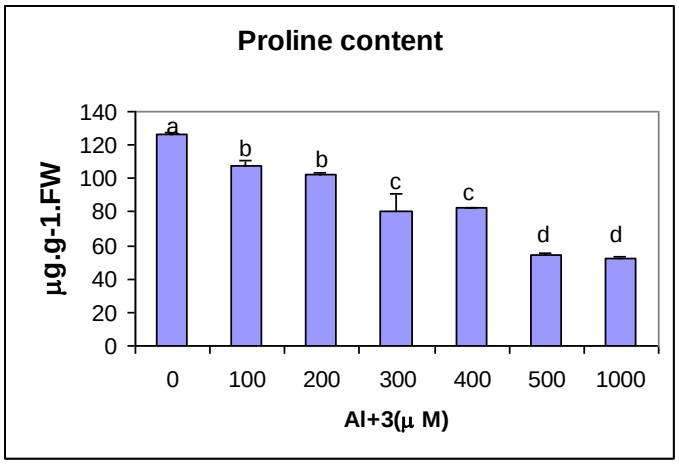
–اثر آلومینیوم بر کاهش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز معنی‌دار بوده است($P>0/05$). با توجه بـه شـکل (٤)در غلظـت ۳۰۰ میکرو مولار کاهش معنی‌داری نسبت به تیمارشاهد و سایر غلظت‌ها مشاهده شده است.



شکل ٤– فعالیت سوپرکسید دیسموتازی جلبک *D.salina* در غلظت‌های مختلف آلومینیوم بر حسب($g^{-1}.FW$)

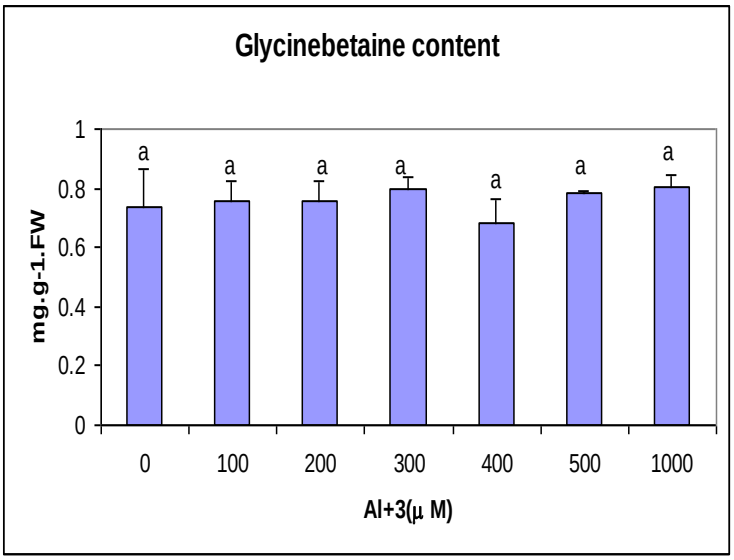
اثر آلومینیوم بر محتوای اسمولیت‌ها

– اثر آلومینیوم بر میزان پرولین با توجه به شکل ۵ معنی‌دار بوده است($P>۰/۰۵$). تمامی تیمارها نسبت به تیمار شـاهد اختلاف (کاهش) معنی‌داری را نشان داده‌اند



شکل ۵– محتوای پرولین جلبک *D.salina* در غلظت‌های مختلف آلومینیوم بر حسب($\mu g\ .g^{-1}.FW$)

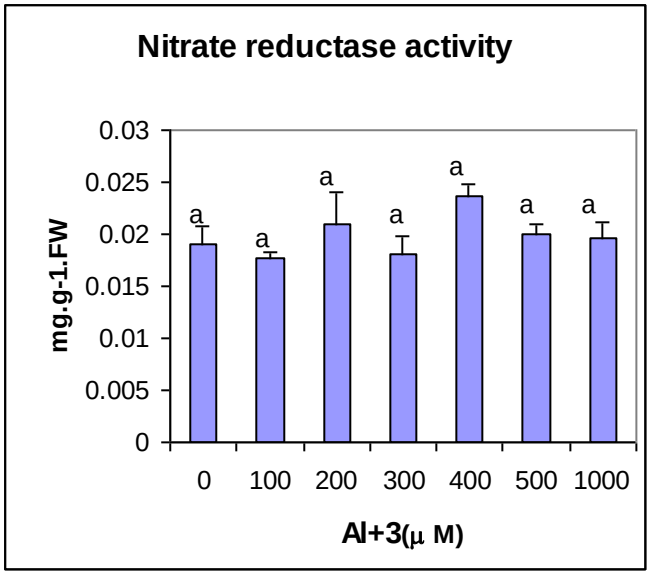
– اثر آلومینیوم بر افزایش گلایسین بتائین معنی‌دار نمی‌باشد($P>۰/۰۵$). تمامی تیمارها نسبت به تیمارشاهد با توجه بـه شکل(٦) افزایش معنی‌داری نشان ندادند.



شکل ٦– محتوای گلایسین بتائین جلبک *D.salina* در غلظت‌های مختلف آلومینیوم بر حسب ($mg.g^{-1}.FW$)

اثر آلومینیوم بر فعالیت نیترات ردوکتاز

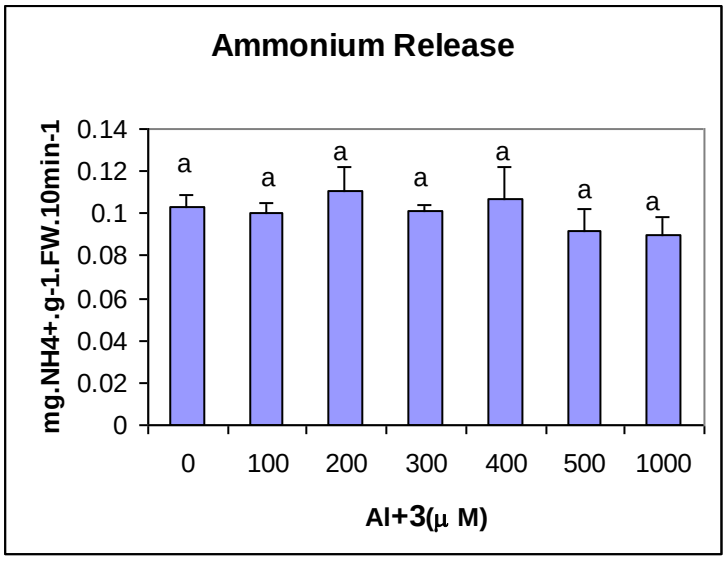
اثر آلومینیوم بر فعالیت نیترات ردوکتاز با توجه به شکل ۷ معنی‌دار نمی‌باشد($P>۰/۰۵$). تمامی تیمارها نسبت به تیمـار شاهد افزایش معنی‌داری نشان ندادند.



شکل ۷- فعالییت نیترات ردوکتازی جلبک *D.salina* در غلظت‌های مختلف آلومینیوم بر حسب ($mg.g^{-1}.FW$)

اثر آلومینیوم بر برون ریزش آمونیوم

اثر آلومینیوم بر برون ریزش آمونیوم با توجه به شکل ۸ معنی‌دار نمی‌باشد. ($P>۰/۰۵$)تمامی تیمارهـا نسـبت بـه تیمـار شاهد افزایش معنی‌داری نشان ندادند.



شکل ۸- برون ریزش آمونیوم جلبک *D.salina* در غلظت‌های مختلف آلومینیوم بر حسب($mg.g^{-1}.FW$)

بحث و نتیجه گیری

موجودات زنده مکانیسم‌های دفاعی متفاوتی را در مقابل آلومینیوم به کار میگیرند که شامل عدم فرایند انتقال یونهای سه ظرفیتی می‌باشد. به نظر میرسد ترکیباتی که با آلومینیوم کمپکس پایداراسیدهای آلی تشکیل میدهند، ماننـد اگـزالات، اثـرات سمی آلومینیوم را کاهش میدهند.در استرس‌های مختلف اکسیدان هایی نظیر انواع اکسیژن‌های واکنشگر تولید می‌شود که بـه ساختار غشا در گیاه آسیب می‌رساند.دیده شده است که در بین آنتی اکسیدان‌ها آسکوربات دارای نقش حیاتی در سلول‌هـای زنده است و سبب از بین رفتن اکسیژن‌های واکنشگر می‌شود (Smirnoff *et al.*, 2001)

همچنین آب اکسیژنه اثرات مضر اکسیداتیو در متابولیسم گیاه دارد که توسط آنزیم‌های کاتالاز و گلوتاتیون پراکسـیداز از بین میرود. کاتالاز نقش مهمی در افزایش مقاومت به استرس اکسیداتیو در شرایط نرمال بـر عهـده دارد (Ames *et al.*, 1993)

آنزیم کاتالاز از آنزیم‌های موثر در مقابله با اکسیژنهای فعال محسوب می‌شود و در شرایط تـنش و در گیاهـان مختلـف افزایش تولید آن به اثبات رسیده است. طبق نتایج Panadaو همکاران (۲۰۰۳)کـه کـاهش فعالیـت کاتـالاز را در ارتبـاط بـا افزایش آلومینیوم در گیاه *Gree gram* (*Vinga radiata*) نشان دادند د ر این پژوهش نیز کـاهش فعالیـت کاتـالازی در تیمارهای۱۰۰، ٤۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰میکرو مولار نسبت به شاهد معنـی‌دار بـود.همچتـین بـر طبـق نظـرMeenakshi(۲۰۰۷) فعالیت کاتالازی در حظور مس در جلبک کلرلا وولگاریس نیز کاهش پیدا میکرد. میـزان آسـکوربات پراکسـیداز نیـز افزایش معنی‌داری در تیمارهای ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرو مولار نسبت به شاهد نشان داد، اما فعالیت پراکسیدازی افزایش معنـی‌دار ی نداشت. فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز نیز نسـبت بـه شـاهد اخـتلاف(کـاهش) معنـی‌دار ی در غلظـت ۳۰۰میکرومـولار آلومینیوم نشان داد. Junsu و همکاران (۲۰۰٤). طی تحقیقاتی اعلام داشتند کـه افـزایش غلظـت آلومینیـوم در محـیط‌هـای اسیدی افزایش فعالیت سو پراکسید دیسموتاز و پراکسیداز را در سندسمدس به همراه داشته است.که این نتایج مغایر با نتایج بدسـت آمـده در مـورد جلبـک***Dunaliella salina teodoresco*** مـی باشـد.همچنـین بـر طبـق نظـر Nikookaarوهمکاران(۲۰۰۵) در حظور مس فعالیت آسکوربات پراکسیدازی دراین جلبک افزایش پیدا میکند.

در تنش‌های مختلف پرولین و گلایسین بتائین به طور گسترده در گیاهان عالی در مقـادیر بـالاتری نسـبت بـه اسـیدهای آمینه دیگر تجمع پیدا میکنند.برخی محققین معتقدند که تجمع پرولین ممکن است یک سیستم حفاظتی نبوده، بلکه یـک ترکیب ذخیره‌ای برای ازت و یا یک منبع انرژی باشد (Palleg & Apinall, 1981). پرولین در زمـان رفـع تـنش بـه عنوان منبع سریع قابل دسترس نیتروژن و کربن نیز به کار می‌رود (Bussis & Henink, 1998). در این تحقیق میزان گلایسین بتائین افزایش معنی‌داری نداشته است، اما میزان پرولین در تمامی تیمارها کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد پیدا کرده است. Meenakshi(۲۰۰۷)پس از بررسی های خود بر روی جلبک کلرلا وولگاریس بیان کرد که در حضور مـس میزان پرولین و گلیسین بتائین افزایش می یابد که این نتایج مغایر با نتایج بدست آمده در این پژوهش است.

– کلروفیتا می‌توانند از اشکال مختلف نیتروژن استفاده کنند (Richmond, 1988). چنانچه مـی‌دانـیم در طـی فراینـد اسیمیلاسیون، ریز جلبک‌ها نیترات را جذب کرده، با مصرف انرژی به نیتریت و سپس آمونیوم تبدیل می‌کننـد. آمونیـوم وارد سیکل‌های اسیمیلاسیون (گلوتامین/گلوتامات) شده، سبب تولید اسید آمینه‌های مختلف می‌گردد.

مقدار برون ریزش آمونیوم و همچنین میزان نیترات ردوکتاز در طی این تحقیق همان طوری که قبلا کفته شد در تمـامی تیمارها افزایش معنی‌داری پیدا نکرده است که این نتیجه با نتایج ساطعی و سروش نسب (۱۳۸۷)که اثر آلومینیوم را بر روی جلبک کلرلا وولگاریس مورد بررسی قرار دادند،مطابقت می کند.همچنین Mamta(۲۰۰٤)که اثر نیکل را روی جلبک کلـرلا وولگاریس بررسی کرده بود،کاهش فعالیت نیترات ردوکتاز را در این جلبک گزارش کرد.

نتایج این تحقیق نشان داده است که اثر غلظت‌های مختلف آلومینیوم بر فعالیت پراکسیدازی، نیتـرات ردوکتـاز و بـرون ریزش آمونیوم معنی‌دار نبوده است اما بر فعالیت کاتالازی، اسکوربات پراکسیدازی و سوپراکسید دیسموتازی معنـی‌دار بـوده است. همچنین دیده شده که آلومینیوم بر محتوای گلایسین بتائین بی تاثیر بوده، ولی میزان پرولین را کاهش میدهد.

منابع

ساطعی .آرین و سروش نسب .ل .۱۳۸۷. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان .

Alam S. M. & Adams, W. A. 1979. Effects of Aluminum on nutrient composition and yield of roots, J. plant Nutr. l: 365-375

Ames, B.N; Shingena, M.K. & Hegen, T. M. 1993. Oxidant, antioxidants and the degenerative sidease off aging.proc.Nat. Acad. sci., USA.90; 7915-7922.

Arrigoni, O. 1994. Ascorbate system in plant development. Journal of Bioenergy. , 26, 407- 419.

Asada, K. & Takchashi, M. 1987. Production and scavenging of active oxygens and dissip – ation of excess photons. Annu. Rev. Plant physiol. plant Mol. Biol., 50:601-39.

Bates, I.S; walderen, R.P & Treaer, I. D. 1973. Rapid determination of free proline in water stress studies Plant of Soil, 34; 205-207.

Bussis, D. & Henink, D. 1998. Acclimation of potato plants to polyethylene glycol induces water deficits. Plant Physiol., 79: 415-419.

Chance, B., & Maehly, C. 1995. Assay catalase and peroxidase Methods Enzymology, 11: 764-775.

Exley , C. ; Tollervey , A. ; Gray , G. ; Roberts , S. ; Birchall , J . D. 1993. Silicon; Aluminium and the Biological Arailability of Phosphorus in Algae. Biological Sciences, 253: 93-99.

Ginannoto, C.N & Ries, S.K. 1977. Superoxid dismutase; ll. purification and quantitative Relationship with water-soluble protein in seedlings. Plant Physiol., 95: 315-318.

Jusu.S.A,; Kong,F.X.; Qing, B.G.; Tan, J.K, Han.& X.B. 2004.The course biochemical response of green algae *Senedesmus oblicus* PH. Environ. Contam. Toxico., .73: 1001-1008.

Koroi, S.A. 1989. Gel electrophers tische and spectrophotometris chose unter unchngen zomein fiuss der temperature auf straktur and peroxidase isoinzyme, physiology Veg., 20: 15-23.

Mamta , A. 2004 . Heavy metal toxicity on Nitratereductase activity of free and immobilized alga cell. Plant Physiol , 791:106.

Meenakashi, F.C.; Mohemed, A.K.; Sunaina, Z & Tashneem, F. 2007. Effect of heavy metal on Proline, Malondialdeyde and Superoxide dismuase activity in the micro alga *Chlorella vulgaris*. , Journal of Plant Physiol., 161:591-597.

Nikookar, k.; Moradshahi, A. & Hosseini, L. 2005. Physiological responses of *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta* to copper toxicity. Department of Biology,Colleg of sciences ,shiraz university. J. phycol.4:6-141.

L.G., & Aspinall, D. 1981 The physiology and biochemistry of drought resistance in plant. Academic **Palleg** Press. Plant Physiol. 24: 789-984.

Panada.S.K; Singha,L.B.& Khan,M. H. 2003. Dose Aluminium Phytotoxicity induce Oxidative strss in green gram (*Vigna radita*) Plant Biochemistry Laboratory, School of Sciences, Assam (central)University, silchar. Plant Physiol .78:1011-1022.

Richmond, A.1988. Handbook of microalga mass culture. CRC Press. INC., 213:756-763.

Sacan, M,; Fu sun O.& Sehnaz, B . 2007. Exposure of *Dunaliella tertiolecta* to lead and Aluminium toxicity and effect on ultrastracture . Biological Trace Element Research .,120:64-72.

Sairam, R. K. & Srivastava, G. C. 2002. Change in antioxidant activity in subcellular fraction of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. Journal of Experimental Botany., 182:897-904.

Smirnoff, N.; Conklin PL. & Loewus, F.A. 2001. Biosynthesis of ascorbic acid in plants; a renaissance. Annual Review of plant physiology and plant Molecular Biology., 25: 437-467.

Solorzano, l. 1969. Determination of ammonia in natural waters by the phenol hypochlorite method. Limnology Oceanography, 14: 799-801.

Sym, G.L. 1984 .Optimization of the in vivo assay condition for nitrate reductase in barley. J.Science.Food.Agriculture, 35:725-730.

Teresa. S.; kutner–sigaud, M.; Leitao A. S. & OswaIdo, K., **2003**. Heavy metal–Induce oxidative stress in Algae, J. phycol. 39:1008 – 1018.

Visviki, I. & Rachlin J, W. 1993. Aluminum and the Biological Availability of Phosphorus in Algae. Biological Trace Element Research,160:146-153.