

表面活性剂 CTAC 和 STAB 对蛋白核小球藻的毒作用

卓 静, 荆国华, 李小林, 周作明

(华侨大学化工学院, 福建 厦门 361021)

摘 要: 采用室内培养法考察了十六烷基三甲基氯化铵 (CTAC) 和十八烷基三甲基溴化铵 (STAB) 对蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*) 的生长状况、蛋白质含量、叶绿素含量、脂质过氧化丙二醛 (MDA) 含量以及超氧化歧化酶 (SOD) 活性的影响, 进而分析了 CTAC 和 STAB 对小球藻的毒作用机理。结果表明, CTAC 和 STAB 对蛋白核小球藻的生长抑制效应受浓度和时间的显著影响, STAB 对蛋白核小球藻的毒性大于 CTAC, 且 CTAC 和 STAB 作用 4 d 内, 藻细胞蛋白质、叶绿素含量以及 SOD 活性均先上升后下降, MDA 含量逐渐下降。根据 5 种指标变化与 CTAC (或 STAB) 之间呈现的浓度-效应关系和时间-效应关系推测, 表面活性剂对藻细胞的最初攻击点是通过改变其细胞膜脂分子的水溶性破坏小球藻的细胞膜, 表面活性剂通过刺激细胞产生活性氧自由基引起脂质及其他生物大分子的氧化损伤可能是其对小球藻产生毒害效应的主要机制。

关键词: CTAC; STAB; 蛋白核小球藻; 毒性效应

中图分类号: X503.225 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2010)08-1460-06

The Toxic Effects of the Surfactant CTAC and STAB on *Chlorella pyrenoidosa*

ZHUO Jing, JING Guo-hua, LI Xiao-lin, ZHOU Zuo-ming

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: The acute toxicity of cetanecyl trimethyl ammonium chloride (CTAC) and stearyl trimethyl ammonium bromide (STAB) to *Chlorella pyrenoidosa* were investigated. The growth rate, superoxide dismutase (SOD) activities and the contents of protein, chlorophyll and malondialdehyde (MDA) in algae were monitored to determine toxicity from surfactant exposure. Although a decrease in growth of algae was observed in both treatments, STAB caused more severe stress to *Chlorella pyrenoidosa* than CATC. The contents of proteins and chlorophyll and SOD activities in algae gradually increased during the first 4-days exposure, while the contents of MDA in algae showed a completely dissimilar response. According to the five kinds of indicators changes, the time-response and dose-response suggested that the surfactant first hurt in *Chlorella pyrenoidosa* was damaging membrane by changing membrane lipid molecules soluble. And primary mechanism on *Chlorella pyrenoidosa* cells might be related to the oxidation damage of lipid and other biological large molecules caused by CTAC and STAB.

Keywords: CTAC; STAB; *Chlorella pyrenoidosa*; toxic effects

表面活性剂是一类能使液相表面张力降低的有机化合物, 具有分散、增溶、乳化、杀菌等功能, 有“工业味精”之美称^[1]。但其过多地排入水体, 将会影响水中氧含量, 还会产生气味、泡沫, 同时还将改变一些疏水性污染物在水体的理化行为^[2], 影响其生物毒性。此外含氮、磷表面活性剂能使水中氮、磷增多, 造成水体富营养化等。近年来, 表面活性剂的大量使用导致污

染水域逐年扩大, 致使生态环境恶化、沿海生物资源衰竭、生物多样性锐减, 并引发了多种环境灾害^[3]。一般阳离子表面活性剂常用来杀菌消毒, 毒性较大^[4]。本试验用的阳离子表面活性剂 CTAC 和 STAB 广泛应用于医药、皮革、水处理絮凝以及杀菌剂等行业, 化学稳定性好, 耐热、耐光、耐压、耐强酸强碱^[5]。

藻类是水生环境中重要的初级生产者, 其种类多样性和初级生产量直接影响水生态系统的结构和功能, 而蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*) 是水环境生态毒理学研究的标准试验生物^[6]。本文考察了不同质量浓度的 CATC 和 STAB 对蛋白核小球藻的生长、蛋白质含量、叶绿素含量、MDA 含量以及 SOD 活性

收稿日期: 2010-03-11

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (D0710019)

作者简介: 卓 静 (1988—), 女, 福建福州人, 在读硕士生, 主要从事污染物对水生生物的毒性研究。

E-mail: zhuojing2007@126.com

通讯作者: 荆国华

的影响,并对致毒方式和机理进行了分析。

1 材料与方法

1.1 试验材料

蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)购自中科院淡水藻种库,于实验室内扩大培养,培养基配制参照 OECD201 藻类生长抑制实验标准方法^[7]。CTAC $[\text{C}_{16}\text{H}_{33}(\text{CH}_3)_3\text{NCl}]$ 和 STAB $[\text{C}_{18}\text{H}_{37}(\text{CH}_3)_3\text{NBr}]$ 均属季铵盐,纯度>99%,购自厦门市先端科技有限公司,其余试剂均为分析纯,用前未经预处理。

1.2 试验仪器

离心机(H-2050R,长沙湘仪)、紫外可见分光光度计(723,上海光谱)、显微镜(CX41RF,奥林巴斯)、智能人工气候箱(RXZ260B,宁波东南)、蒸汽灭菌锅(ZD35B1,上海中安)、超声波细胞破碎仪(JY92-2,宁波新芝)、叶绿素荧光仪(Phyto-PAM,德国 WALZ)。

1.3 试验方法

1.3.1 蛋白核小球藻培养

将试验藻种接种于水生 4 号无菌藻类培养基^[8]中至藻细胞初始密度为 1×10^6 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$,容器采用 4 层无菌纱布封口后置于智能人工气候箱内 $[(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光强 3 000 lx、光暗比 L:D=12 h:12 h],静置培养,6 h 摇动 1 次,并随机更换容器位置。96 h 移种 1 次,重复 3 次以上,使之达到同步生长。移种前显微观察试验藻液是否被污染。

1.3.2 藻体细胞密度测定

用血球计数板显微计数法^[9]测定藻细胞密度,并于 686 nm 波长处测其吸光度,得到藻体密度 Y (蛋白核小球藻 $\times 10^6$ 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$)与吸光度 X 的关系为

$$Y = 42.191X - 0.1568$$

1.3.3 藻类生长抑制试验

根据 OECD201 藻类生长抑制试验标准方法^[7],藻种接种后,在容器中加入受试物,放入人工气候箱中培养。接种后开始计时每隔 24 h 取样分析 1 次,测定藻体细胞密度,绘制各浓度组藻体生长曲线,再根据式(1)计算细胞生长抑制百分率(I_A),确定抑制百分率与表面活性剂浓度间的关系,进而计算受试物对蛋白核小球藻生长抑制的 96 h EC_{50} 值。

$$I_A = \frac{A_c - A_T}{A_c} \times 100\% \quad (1)$$

式中: A_c 为对照组生长曲线下所包围的面积; A_T 为各受试物浓度生长曲线下所包围的面积。

为减少 96 h EC_{50} 值的测定误差,正式试验前先

进行预试验分析,结果表明 CTAC 和 STAB 对蛋白核小球藻生长的 EC_{50} 分别约为 0.4、0.6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。正式试验中向藻液加入表面活性剂使其浓度分别为 0、0.05、0.1、0.3、0.5、0.7、1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,使其 EC_{50} 值大约落在浓度梯度的中间位置,平行样数量为 3。分别于 24、48、72、96 h 对藻细胞进行计数,测定蛋白质含量、叶绿素含量,并测定 96 h 后的 SOD 值与 MDA 含量。

1.3.4 蛋白质含量的测定

于试验进行 24、48、72、96 h 4 个时刻从培养瓶中分别取一定量藻液,离心 10 min ($1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)后去掉上清液,在藻泥中加 10 mL 磷酸缓冲液($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 7.8),混匀后超声破碎(400 W, 5 s/5 s, 15 min)至镜检无完整细胞,再离心 10 min ($6\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$),此时上清液为粗酶液。采用考马斯亮蓝法测定上清液蛋白质含量,以牛血清蛋白作标准曲线^[10]。

1.3.5 叶绿素含量的测定

叶绿素荧光仪直接测定叶绿素含量。

1.3.6 SOD 酶活性和 MDA 含量的测定

采用南京建成生物公司的 SOD 试剂盒和 MDA 试剂盒测定 SOD 活性和 MDA 含量。

1.3.7 试验数据的统计与分析

对所得试验数据用 SPSS14.0 软件进行 t 检验,检测不同浓度处理组与阴性对照组的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 CTAC 和 STAB 对藻种生长的影响

CTAC、STAB 对蛋白核小球藻生长的影响分别见图 1、图 2,可见二者随着浓度的上升,对小球藻的抑制作用增强。CTAC 浓度 $\geq 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,或 STAB 浓度 $\geq 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,小球藻的生长受到明显抑制,并且随时间的增长抑制作用增强,最高浓度组在第 4 d 时生长抑制率达到 80% 以上。两种表面活性剂低浓度时均对小球藻的生长起到刺激作用,但随着时间的增长,其刺激作用慢慢减弱,转变为抑制作用。处理 4 d 后,0.3、0.5、0.7、1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ CTAC 或 STAB 质量浓度的藻细胞数浓度与各自对照组对比,均呈现显著($n=3$, $P<0.05$)和极显著的($n=3$, $P<0.01$)统计学差异,呈明显的剂量效应关系,而低浓度组没有统计学差异。

由试验数据可计算得到 CTAC 对蛋白核小球藻的 96 h EC_{50} 值为 $0.245 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,STAB 对蛋白核小球藻的 96 h EC_{50} 值为 $0.304 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。两种表面活性剂对小球藻的毒性作用大小不同:CTAC<STAB。但二者对蛋白核小球藻的 96 h EC_{50} 值均小于 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,据相关

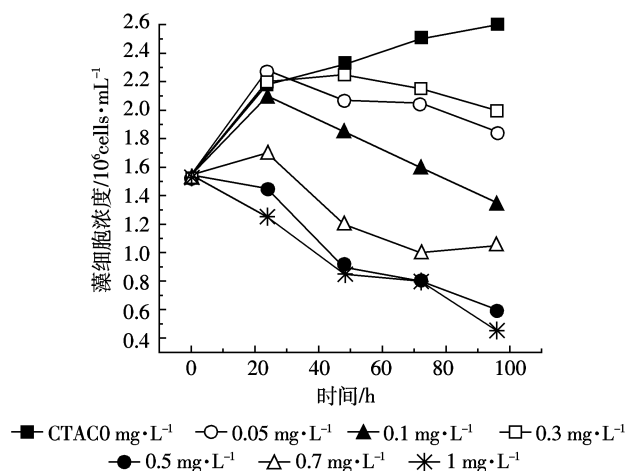


图 1 CTAC 对蛋白核小球藻生长的影响

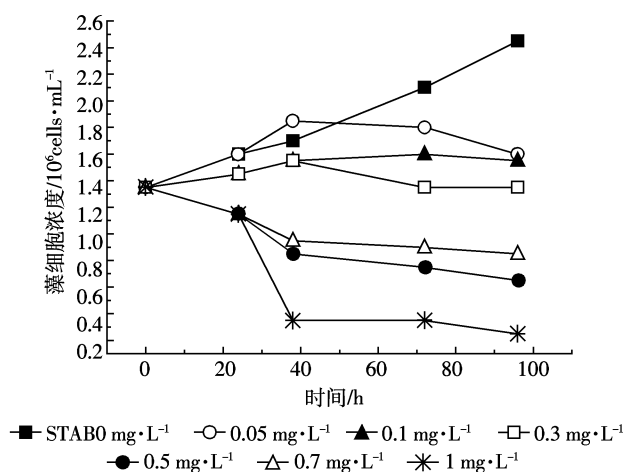
Figure 1 Effects of CTAC on the growth of *Chlorella pyrenoidosa*

图 2 STAB 对蛋白核小球藻生长的影响

Figure 2 Effects of STAB on the growth of *Chlorella pyrenoidosa*

评价标准^[11]可知 CTAC、STAB 均属极高毒性物质。

2.2 CTAC 和 STAB 对藻种蛋白质含量的影响

由图 3、图 4 可见,投加一定浓度的 CTAC、或 STAB 后,小球藻蛋白质含量均受到一定程度的影响。STAB 各低浓度组小球藻在 1~2 d 内蛋白质含量有所上升,表现出超补偿作用^[12],在第 1 d 其蛋白质含量与对照组相比,高出 10%~25%,随着时间的增长,刺激生长作用减弱,其变化趋势与藻生物量变化相对应。CTAC 各低浓度组前 3 d 蛋白质含量均低于对照组,在第 4 d 略高对照组 15%。高浓度组的 CTAC (或 STAB)对藻类生长均存在很大的限制作用,在第 2 d 藻细胞中蛋白质含量几乎不变甚至开始下降。各 CTAC 和 STAB 质量浓度的藻细胞蛋白质含量与对照组对比,均呈现显著($n=3, P<0.05$)的统计学差异。

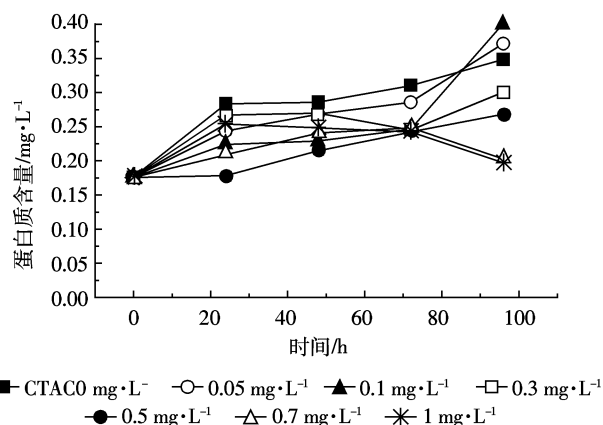


图 3 CTAC 对蛋白核小球藻蛋白质含量的影响

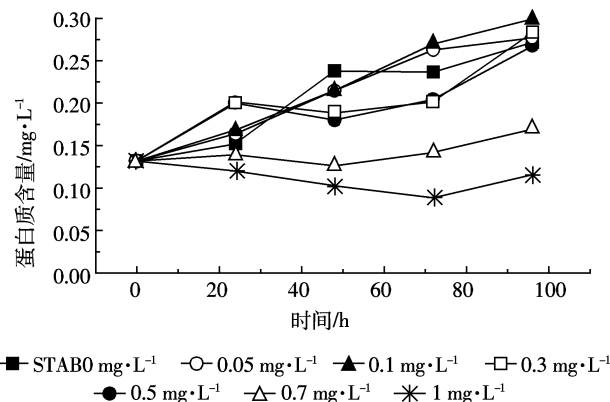
Figure 3 Effects of CTAC on the content of protein of *Chlorella pyrenoidosa*

图 4 STAB 对蛋白核小球藻蛋白质含量的影响

Figure 4 Effects of STAB on the content of protein of *Chlorella pyrenoidosa*

2.3 CTAC 和 STAB 对藻种叶绿素含量的影响

CTAC 和 STAB 对小球藻叶绿素含量的影响分别见图 5、图 6,可见低浓度组蛋白核小球藻叶绿素含量随时间呈增长趋势,高浓度组则呈下降趋势。说明表面活性剂对小球藻叶绿素含量的影响也呈低浓度诱导、高浓度抑制,变化趋势与细胞浓度的变化趋势基本吻合,并且叶绿素含量对高浓度表面活性剂的毒性反应更灵敏,在 1~2 d 叶绿素含量就降为 0。浓度大于 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CTAC 和 STAB 处理的蛋白核小球藻叶绿素含量与各自对照组对比,均呈现显著($n=3, P<0.05$)和极显著的($n=3, P<0.01$)统计学差异,且表现出更好的剂量-效应关系。

2.4 CTAC 和 STAB 对藻种 SOD 含量和 MDA 含量的影响

SOD 是生物体内清除活性氧自由基的关键酶,对

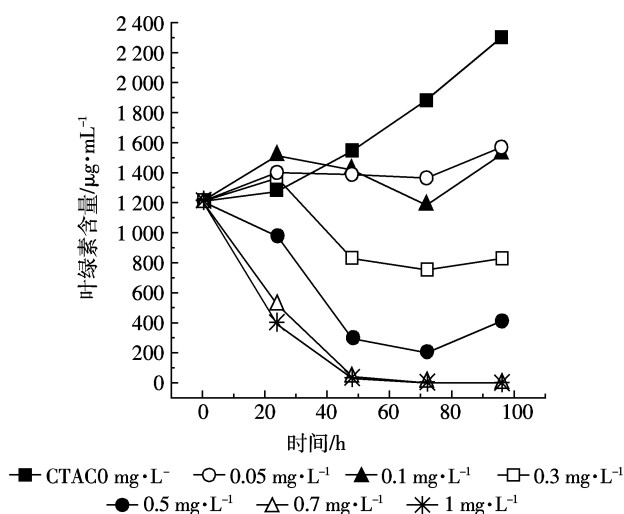


图5 CTAC对蛋白核小球藻叶绿素含量的影响

Figure 5 Effects of CTAC on the chlorophyll content of *Chlorella pyrenoidosa*

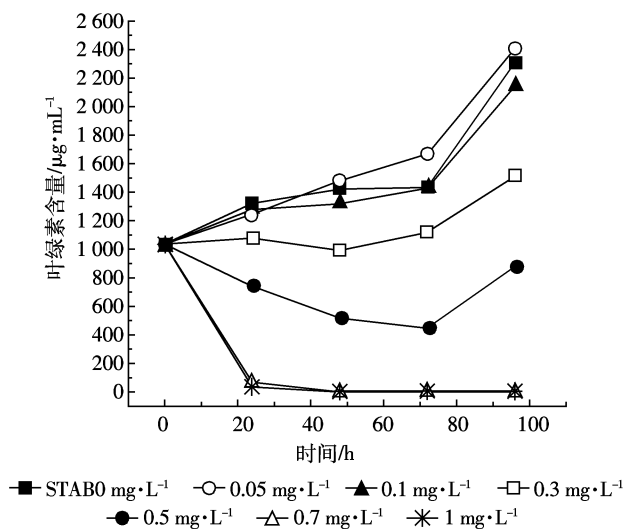


图6 STAB对蛋白核小球藻叶绿素含量的影响

Figure 6 Effects of STAB on the chlorophyll content of *Chlorella pyrenoidosa*

氧化胁迫反应十分灵敏,在保护细胞免受氧化损伤过程中具有十分重要的作用^[13]。图7表明,低浓度STAB和CTAC作用于蛋白核小球藻能促进其SOD的活性,但随着浓度的增大SOD活性迅速下降,各浓度组均呈现极显著的($n=3, P<0.01$)的统计学差异。MDA是细胞膜脂质过氧化的产物,同时也是膜损伤的重要指标,其变化与SOD活性变化相关^[14]。随着SOD活性的下降,细胞抗氧化能力降低,引起藻体内 H_2O_2 的积累,导致脂质过氧化造成细胞膜通透性增大,藻细胞内MDA含量上升。图8表明,MDA含量随CTAC或STAB浓度的增加而上升,间接证实二种表面活性剂

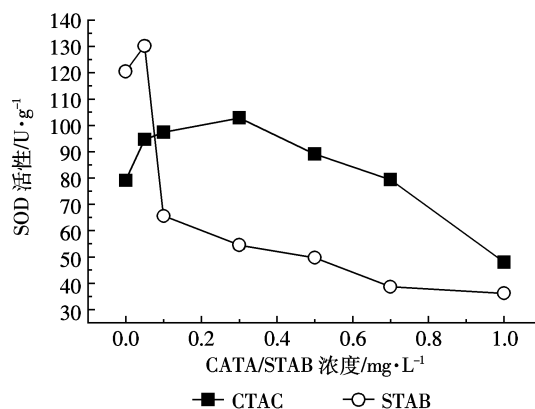


图7 96 h时CTAC/STAB对蛋白核小球藻SOD活性的影响

Figure 7 Effects of CTAC/STAB on the activity of superoxide dismutase (SOD) of *Chlorella pyrenoidosa* after 96 hours

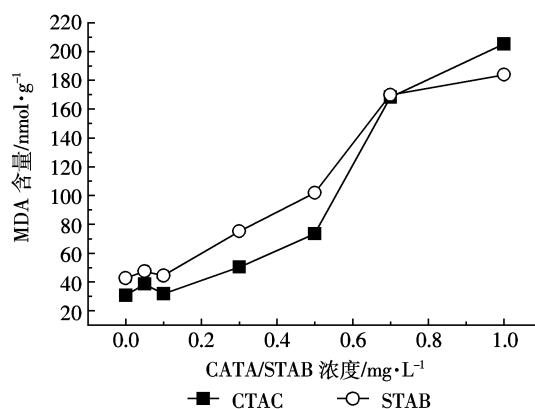


图8 96 h时CTAC/STAB对蛋白核小球藻MDA含量的影响

Figure 8 Effects of CTAC/STAB on the MDA content of *Chlorella pyrenoidosa* after 96 hours

是通过对小球藻SOD活性的抑制,引起其膜脂质过氧化而产生毒害作用。

3 讨论

根据CTAC和STAB对蛋白核小球藻的毒性试验可知,较低浓度下CTAC和STAB对小球藻均表现出一定的刺激效应。藻细胞密度、叶绿素和蛋白含量以及SOD活性均有上升,MDA含量下降。随着浓度增加,抑制作用趋于显著。尤其是叶绿素含量下降最为明显,5种指标变化与CTAC/STAB处理之间呈现一定的浓度-效应关系和时间-效应关系。

在各高浓度毒物作用于蛋白核小球藻72 h时,能明显地发现在培养三角瓶的底部有无色或稍泛白色的不能悬浮的藻细胞出现,这是藻细胞白化(脱镁)的结果。脱镁叶绿素是细胞中正常叶绿素的失活产物,它的大量产生说明了藻类有活性的叶绿素含量降

低,这在一定程度上与叶绿素测量数据相对应。

藻类物质的蛋白质、叶绿素的含量可表征其存活情况和生物量的多少^[15],并都能表示藻类生长的损伤情况。由数据分析可看出 CTAC 和 STAB 对小球藻细胞内蛋白质和叶绿素含量的影响呈现出一定的相关性,这是因为叶绿素含量的改变影响了藻细胞的光合作用,导致藻细胞蛋白质的损伤。而蛋白质作为藻细胞体(包括叶绿体)的有机成分,对酶活起决定性作用,是藻细胞正常生理功能的物质保障,其含量的降低反过来会影响叶绿素功能的正常发挥,进而影响 SOD 活性以及 MDA 含量。

众多文献表明^[16-18],污染物的制毒机理主要通过大量活性氧的产生对机体诱发损害,污染物在生物体内转化时,产生大量活性氧,这些活性氧可使脂质过氧化及蛋白质失活等,引起机体氧化应激。活性氧产生及转化过程中,SOD 等活性酶组成防御过氧化系统起重要作用,是水生植物对毒物响应的重要标志^[9]。低浓度 CTAC 和 STAB 对小球藻 SOD 活性未有明显促进,且细胞膜脂质过氧化的产物 MDA 含量变动不大,随着暴露组浓度增加,MDA 呈上升趋势,可能是藻细胞未能及时调动抗氧化机制,脂质过氧化带来的损伤远大于细胞自身的修复能力,SOD 酶活受到抑制,自由基产生和消除间的平衡被破坏,细胞受到毒害,导致小球藻生长受到抑制。

试验中对小球藻细胞形态变化进行观察可发现其细胞壁受损严重、胞内物溶出、颜色变浅、藻体部分分解。考虑到细胞膜主要结构单位为膜脂分子,膜脂分子包括磷脂、糖脂和胆固醇,而这三种物质均不溶于水,但表面活性剂的存在改变了其水溶性,引起细胞膜崩解。从细胞膜损伤指标 MDA 含量变化可发现,表面活性剂对藻类细胞膜的破坏程度随毒物浓度升高趋于严重。故可推论表面活性剂引起小球藻细胞膜水溶性的改变是其对小球藻破坏的攻击点,从而进一步影响细胞内的叶绿素、蛋白质含量。

4 结论

尽管低浓度 CTAC、STAB 对蛋白核小球藻的生长表现出一定的刺激效应,但在高浓度时二者对蛋白核小球藻均表现出较高的毒性作用。STAB 对小球藻的毒性大于 CTAC,各生测指标变化有良好的相关性,与 CTAC/STAB 处理之间呈现一定的浓度-效应关系和时间-效应关系。根据试验结果可推测其毒性作用的机理:(1)表面活性剂对藻细胞的最初攻击点是

通过改变其细胞膜脂分子的水溶性,破坏小球藻的细胞膜;(2)表面活性剂通过刺激细胞产生活性氧自由基引起脂质及其他生物大分子的氧化损伤可能是其对蛋白核小球藻产生毒害效应的主要机制。

参考文献:

- [1] 张学佳,纪 巍,康志军,等.水环境中表面活性剂的危害及其处理方法[J].石化技术与应用,2008,26(6):581-586.
ZHANG Xue-jia, JI Wei, KANG Zhi-jun, et al. Harmfulness of surfactant in water and its treatment techniques[J]. *Petrochemical Technology & Application*, 2008, 26(6):581-586.
- [2] Ruan X X, Zhu L Z, Chen B L. Adsorptive characteristics of the siloxane surfaces of reduced-charge bentonites saturated with tetramethylammonium cation[J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(21): 7911-7917.
- [3] Fabbri D, Crime A, Davezza M, et al. Surfactant-assisted removal of swep residues from soil and photocatalytic treatment of the washing wastes[J]. *Applied Catalysis B-Environmental*, 2009, 92(3-4):318-325.
- [4] 袁平夫,廖柏寒,卢 明.表面活性剂(LAS&NIS)的环境安全性评价[J].安全与环境工程,2004,11(3):31-34.
YUAN Ping-fu, LIAO Bo-han, LU Ming. Environmental safety evaluation of surfactants(LAS&NIS)[J]. *Safety and Environmental Engineering*, 2004, 11(3):31-34.
- [5] 刘彩娟.表面活性剂的应用与发展[J].河北化工,2007,30(4):20-21.
LIU Cai-juan. Applications and development of surfactant[J]. *Hebei Chemical Engineering and Industry*, 2007, 30(4):20-21.
- [6] 聂湘平,王 翔,陈菊芳,等.三氯异氰尿酸与盐酸环丙沙星对蛋白核小球藻的毒性效应[J].环境科学学报,2007,27(10):1694-1701.
NIE Xiang-ping, WANG Xiang, CHEN Ju-fang, et al. Toxic effects of trichloroisocyanuric and ciprofloxacin hydrochloride on a freshwater alga, *Chlorella pyrenoidosa*[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2007, 27(10):1694-1701.
- [7] 中国国家环境保护总局编委会.水和废水监测分析方法[M].北京:中国环境科学出版社,2002:715-721.
State Environmental Protection Administration of China. Assay methods for waste water (the fourth edition)[M]. Beijing: Chinese Environmental Science Press, 2002:715-721.
- [8] 石 瑛,杜青平,谢树莲.1,4-二氯苯对蛋白核小球藻的毒性效应[J].环境科学研究,2007,20(3):133-136.
SHI Ying, DU Qing-ping, XIE Shu-lian. The toxic effects of 1, 4-dichlorobenzene on *Chlorella pyrenoidosa*[J]. *Research of Environmental Science*, 2007, 20(3), 133-136.
- [9] 岳文洁,王朝晖,王桥军,等.氯氰菊酯对海洋卡盾藻的毒性效应[J].生态毒理学报,2009,4(2):251-257.
YUE Wen-jie, WANG Zhao-hui, WANG Qiao-jun, et al. Toxic effects of cypermethrin on *Chattonella marina*[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2009, 4(2):251-257.
- [10] 李如亮.生物化学实验[M].武汉:武汉大学出版社,1998:57-58.
LI Ru-liang. Biochemical experiments[M]. Wuhan: Wuhan University

- Press, 1998:57-58.
- [11] 水生生物监测手册编委会. 水生生物监测手册[M]. 南京:东南大学出版社, 1993:192-202.
- The Editorial Board of a Handbook for Monitoring by Aquatic Organisms. A handbook for monitoring by aquatic organisms[M]. Nanjing: Southeast University Press, 1993:192-202.
- [12] Bidar G, Garcon G, Pruvot C, et al. Behavior of trifolium repens and lolium perenne growing in a heavy metal contaminated field plant metal concentration and phytotoxicity[J]. *Environment Pollution*, 2007, 147(3):546-553.
- [13] 杜青平, 黄彩娜, 贾晓珊, 等. 1, 2, 4-三氯苯对3种海洋微藻的毒性效应[J]. 生态环境, 2007, 16(2):352-357.
- DU Qing-ping, HUANG Cai-na, JIA Xiao-shan, et al. The toxic effects of 1, 2, 4-trichlorobenzene on three kinds of ocean tiny algae[J]. *Ecology and Environment*, 2007, 16(2):352-357.
- [14] 杜青平, 黄彩娜, 贾晓珊. 1, 2, 4-三氯苯对斜生栅藻的毒性效应及其机制研究[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(4):1375-1379.
- DU Qing-ping, HUANG Cai-na, JIA Xiao-shan. Toxic effects and mechanisms of 1, 2, 4-trichlorobenzene on *Scenedesmus obliquus* [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(4):1375-1379.
- [15] Edwards R, Dixon D P, Walbot V. Plant glutathione S-transferases: Enzymes with multiple functions in sickness and in health[J]. *Trends in Plant Science*, 2000, 5(5):193-198.
- [16] Wilson B A, Smith V H, Denoyelles F, et al. Effects of three pharmaceutical and personal care products on natural freshwater algal assemblages[J]. *Environmental Science & Technology*, 2003, 37:1713-1719.
- [17] 胡智泉, 肖波, 刘永定. 微囊藻毒素对束丝藻细胞生长和抗氧化系统的影响[J]. 生态毒理学报, 2008, 3(4):377-382.
- HU Zhi-quan, XIAO Bo, LIU Yong-ding. Effects of microcystin-LR on the growth and antioxidant systems in *Aphanizomenon* sp. DC01 cells [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2008, 3(4):377-382.
- [18] 董玉瑛. 水体中典型有机污染物的分析和生态效应研究[D]. 南京: 南京大学, 2000.
- DONG Yu-ying. Investigation and ecological effect for typical organic pollutants in water[D]. Nanjing: Nanjing University, 2000.
- [19] 周小见. 表面活性剂对海洋微藻的生理生化影响[D]. 大连: 大连海事大学, 2000.
- ZHOU Xiao-jian. The research to the effect on ocean micro-algal on physio-chemistry by surface active agent[D]. Dalian: Dalian Maritime University, 2000.