

三聚氰胺对斜生栅藻的毒性研究

何 桢, 胡晓静, 牟 文, 周巧巧, 张 灿, 杨 雪, 熊 丽, 刘德立

(湖北省遗传控制与整合生物学重点实验室, 华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079)

摘 要:采用光照培养箱培养斜生栅藻的方法,以甘油为溶剂,研究了三聚氰胺对斜生栅藻的毒性效应。结果显示,当三聚氰胺的浓度在 50、200 mg·L⁻¹ 时,对斜生栅藻生长有促进作用,在 750 mg·L⁻¹ 时则表现出抑制效应,染毒 7 d 后对叶绿素的影响和对藻密度的影响一致,显示浓度-效应关系,即浓度越高抑制效应越明显。三聚氰胺对斜生栅藻超氧化物歧化酶(SOD)的影响表现为:当三聚氰胺浓度为 200 mg·L⁻¹ 时酶的活性达到峰值,然后开始下降,在 750 mg·L⁻¹ SOD 的活性与对照相比减少了 43.6%,三聚氰胺对斜生栅藻的脂质过氧化产物丙二醛(MDA)的影响和对可溶性糖的影响效应是一致的,随着浓度的增加均在减少。

关键词:三聚氰胺;斜生栅藻;光合色素;超氧化物歧化酶(SOD);丙二醛(MDA)

中图分类号:X503.225 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2010)08-1455-05

Melamine Toxicity of *Scenedesmus Obliquus* Kütz

HE Zhen, HU Xiao-jing, MU Wen, ZHOU Qiao-qiao, ZHANG Can, YANG Xue, XIONG Li, LIU De-li

(Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology, College of Life Sciences, Huazhong Normal University, Wuhan 430079, China)

Abstract: Due to high prevalence of epidemic cases of renal failure among Chinese infants in 2008, resulting from of melamine contaminated milk, raised concerns about food safety and also the international interest to studying the melamine toxicity mechanism was established. Melamine is an organic base and a trimer of cyanamide, with a 1,3,5-triazine skeleton or simply, its an azocyclo-containing organic compound, and traditionally used in the chemical and sporadically mixed into animal feeds to boost protein content. Animal feeding with excessive melamine concentration can induce renal failure and even death. The residue of melamine in edible animal products also threatens human health. Melamine is used as food additives which has a rather poor biodegradability. The possibility of water resources and soils being contaminated by melamine discharge arouse more and more concern. This study was designed to test the melamine toxicity effects on aquatic ecosystem. *S. obliquus* was exposed to series melamine concentrations (0, 50, 200, 750 mg·L⁻¹). Five parameters were measured after 7 days exposure, which were growth rate, superoxide dismutase (SOD), photosynthetic pigments, free malondialdehyde (MDA) and soluble sugar contents. Melamine concentration of 50, 200 mg·L⁻¹ caused a significant increase in growth and photosynthetic pigments contents. SOD activities of *S. obliquus* were stimulated first and then inhibited with the increasing of melamine concentrations, and reached its peak in 200 mg·L⁻¹ (compared with the control, $P < 0.05$) reduced by 43.6% in 750 mg·L⁻¹ (compared with the control). The contents of MDA and soluble sugar were inhibited significantly under moderate and high concentration (50, 200, 750 mg·L⁻¹) of melamine. This study indicated that, SOD was sensitive to melamine exposure and could be used as a potential biomarker for risk assessment of aquatic ecosystem safety.

Keywords: melamine; *Scenedesmus Obliquus* Kütz; photosynthetic pigments; SOD; MDA

三聚氰胺是一种白色结晶粉末,分子式 C₃N₆H₆,分子量 126.12,含氮量高(约为 66%),能溶于甲醛、乙醛、热的乙二醇、甘油,微溶于水,不溶于乙醚、苯、四

氯化碳等溶剂;溶液微显碱性,没有异味,利用传统的凯氏定氮法测定蛋白质含量时不易发现掺入到食品和饲料中的三聚氰胺,造成高蛋白含量假象。三聚氰胺作为食品和饲料添加剂,具有轻微的生物毒性,长期饲喂含三聚氰胺的日粮后会对动物产生危害。近来,三聚氰胺陆续在众多动物性食品中被检出。2008 年的三鹿奶粉事件^[1]、引起婴幼儿泌尿系结石等事件,

收稿日期:2010-03-03

基金项目:国家自然科学基金(30771429,20672041)

作者简介:何 桢(1987—),女,研究方向为分子毒理学。

通讯作者:熊 丽 E-mail:xianglily@mail.ccnu.edu.cn

引起了公众对三聚氰胺的密切关注和广泛重视。

有关三聚氰胺在哺乳动物中的毒性作用已有初步研究^[2],然而是否会对藻类产生负面影响还未见报道。藻类作为水生生态系统初级生产者,其种类的多样性和初级生产量直接影响水生生态系统的结构功能,因而成为监测评价水环境质量的重要指示生物,藻生长和繁殖对水生生态系统的平衡和稳定具有重要意义。斜生栅藻对毒物敏感,个体小,繁殖快,培养方便,在较短时间内可得到化学物质对其许多世代及种群水平的影响评价,生长状况在一定程度上能反映水环境质量,是一种通常使用的测试生物。因此,选择极常见的浮游藻类斜生栅藻 (*Scenedesmus Obliquus* Kütz)作为实验生物,研究三聚氰胺对其毒性效应,以期为相关部门制订三聚氰胺环境排放标准和食品安全评估提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料与仪器

三聚氰胺(melamine、分析纯)由天津东丽区泰三化学试剂厂提供;斜生栅藻(*S. obliquus*)由中国科学院武汉水生生物研究所藻种库提供(No.FACHB39),并经室内扩大培养用于实验。斜生栅藻的培养基为HB-4 缺氮培养基^[3],所有试剂均为分析纯。

高速冷冻离心机(EPPENDORF),酶标仪(BIO-TEC),粒度计数仪(BACKMAN),光照培养箱。

1.2 实验方法

1.2.1 驯化培养

将斜生栅藻(FACHB39)在无菌条件下转移至HB-4人工培养液中,于光照培养箱中驯化培养1周,至对数生长期进一步扩大培养。培养条件如下:温度(25±0.5)℃,pH 7~8;明暗周期比12 h:12 h,光强3 000 lx,静置培养,每日定时人工摇动3次。

1.2.2 溶剂不可见效应浓度(No Observed Effect Concentration, NOEC)的测定^[4-5]

由于三聚氰胺微溶于水,易溶于甘油等溶剂,实验以甘油为溶剂,设置5个实验浓度和一个空白对照组(缺氮),经7 d染毒后,用粒度计数仪计数,测定藻细胞的密度(个·mL⁻¹),计算甘油的NOEC。

1.2.3 三聚氰胺对斜生栅藻生长的影响

根据以上测得的溶剂NOEC设置实验浓度,将处于对数生长期的斜生栅藻接种于灭菌的无氮HB-4人工培养基中,起始藻密度均为6.8×10⁶个·mL⁻¹。根据预实验加入用甘油配置的三聚氰胺母液(500 g·L⁻¹

的母液,水浴加热助溶)使其成系列浓度(50、200、750 mg·L⁻¹),以无氮的HB-4培养基为对照组。每隔24 h取样测定藻细胞密度。

1.2.4 光合色素的测定

取20 mL培养7 d的藻液,5 000 r·min⁻¹冷冻离心10 min收集藻细胞,转移到10 mL的试管中,加80%的丙酮5 mL,封住试管口,置于黑暗中抽提24 h后,充分混匀,4 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液分别测定OD₆₆₃、OD₆₄₅、OD₄₅₀,并以80%的丙酮参比,计算各自的光合色素含量^[6]。并测定其吸收光谱,以80%的丙酮作为参比,记录300~800 nm波长范围内色素吸收光谱。

1.2.5 粗酶液的提取^[7]

取一定量的藻液5 000 r·min⁻¹离心15 min收集藻细胞,分别用磷酸缓冲液(0.1 mol·L⁻¹, pH 7.8)润洗藻细胞3次,每组中加入预冷的磷酸缓冲液3 mL(0.1 mol·L⁻¹, pH 7.8)和少量的石英砂经冰浴碾磨,将匀浆液在4℃下8 500 r·min⁻¹离心15 min,取上清液并记下总体积,冷冻以备后面实验用。

1.2.6 SOD测定

采用Beauchamp^[8]建立的Bewley^[9]改良的氮蓝四唑(NBT)光化学还原反应法。酶活力单位定义为能引起反应初速度(不加酶时)半抑制时的酶用量。蛋白质含量用考马斯亮蓝法测定^[10],以小牛血清蛋白作标准曲线。

1.2.7 膜脂过氧化作用的测定

参照Heath^[11]和林植芳^[12]等方法,根据膜脂过氧化产物MDA与硫代巴比妥酸钠(TBA)的定量反应,通过测定其反应产物在OD₅₃₂、OD₄₅₀处的吸收值来测定MDA的含量。

1.2.8 数据处理

每组实验均设3组平行,数据处理采用Origin 5.0和SPSS Statistics 13.0统计分析软件,并进行t检验和差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 溶剂的NOEC值

分别以0、0.02%、0.1%、0.2%、1%、2%的甘油处理斜生栅藻,7 d后经方差分析,无显著差异的最高浓度为0.2%(表1),即甘油对斜生栅藻的NOEC值为0.2%,正式实验中甘油的含量应低于0.2%。

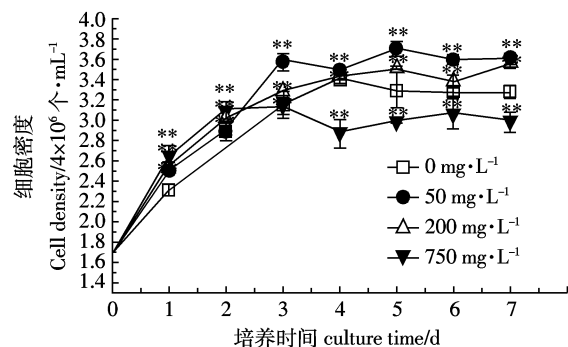
2.2 三聚氰胺对斜生栅藻的生长效应

三聚氰胺对斜生栅藻的生长曲线如图1所示。由

表 1 甘油对斜生栅藻生长的影响
Table 1 Effects of glycerol on growth of *S. obliquus*

甘油浓度/%	细胞数目/ 10^5 个 $\cdot$ mL $^{-1}$		
	均值	标准偏差	差异性
0	1.55	0.15	
0.02	1.59	0.05	不显著
0.10	1.34	0.21	不显著
0.20	2.05	0.36	不显著
1.0	14.60*	1.25	显著
2.0	31.44*	2.10	显著

图 1 可见,染毒的前 3 d,三聚氰胺对斜生栅藻的生长都有促进作用,并且浓度越高促进作用越强。但第 3 d 起,750 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 浓度组对藻生长表现抑制效应;7 d 后,与对照组相比,三聚氰胺浓度为 50、200 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 时,藻密度分别增加了 10.2%、2.70%,而在三聚氰胺浓度为 750 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 时则减少了 7.60%。



(* , ** : $P < 0.05$, $P < 0.01$ 和对照组相比。下同。)

(* , ** : $P < 0.05$, $P < 0.01$ compared with the control. The same below.)

图 1 三聚氰胺对斜生栅藻生长的影响

Figure 1 Effects of melamine on growth of *S. obliquus*.

2.3 三聚氰胺对斜生栅藻光合色素的影响

图 2 表示三聚氰胺对斜生栅藻光合色素含量的影响。从图 2 可知,各种色素的含量,在三聚氰胺浓度为 50、200 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 时,与对照组相比都显著增加;而在三聚氰胺浓度为 750 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 时与对照组相比,各色素含量显著减少。表现出低浓度三聚氰胺促进各光合色素合成,而高浓度三聚氰胺则抑制光合色素合成。实验过程中观察到随着暴露时间的延长,藻细胞的绿色越来越浅,到高浓度时几乎为白色,这一现象和图 2 的藻密度结果一致。

2.4 三聚氰胺对斜生栅藻吸收光谱的影响

图 3 显示了三聚氰胺对斜生栅藻的吸收光谱,染

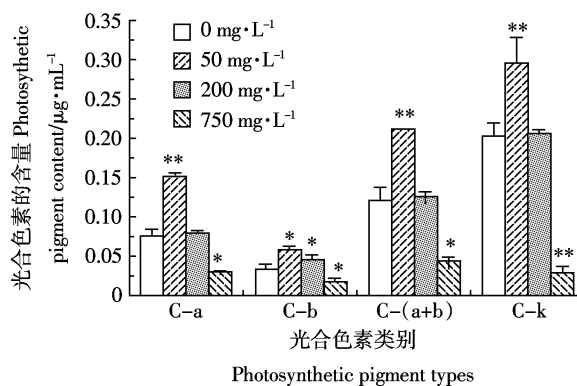


图 2 三聚氰胺对斜生栅藻光合色素的影响

Figure 2 Effects of melamine on photosynthetic pigments of *S. obliquus*.

毒 7 d 后,各浓度组三聚氰胺的吸收光谱谱带完全相似,在蓝光区 430 nm 处和红光区 663 nm 处均出现明显的峰,不同浓度明显影响了峰值的大小,这与光合色素含量的变化是一致的。

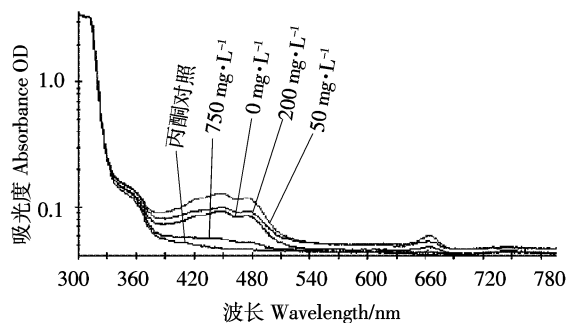


图 3 三聚氰胺对斜生栅藻吸收光谱的影响

(从上到下:50、200、0、750 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 和丙酮对照)

Figure 3 Effects of melamine on absorption spectrum of *S. obliquus*.

(From up to down are 50, 200, 0, 750 mg $\cdot$ L $^{-1}$ and acetone control)

2.5 三聚氰胺对斜生栅藻 SOD 活性、MDA 以及可溶性糖含量的影响

图 4 显示三聚氰胺对斜生栅藻 SOD 的活性、MDA 以及可溶性糖含量的影响。与对照相比,在 50 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 时,SOD 的活性变化不明显,200 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 时,SOD 的活性显著增加,与对照组相比分别增加了 1.81%、62.1%;而在 750 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 时减少了 43.6%。MDA 含量与对照组相比逐渐减少,在 50、200 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 时,MDA 的含量分别减少了 36.3%、39.0%;而在 750 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 时,MDA 的含量增加了 42.4%。与对照组比可溶性糖含量显著减少,分别减少了 14.4%、42.8%、55.2%,表现出明显的浓度-剂量效应。

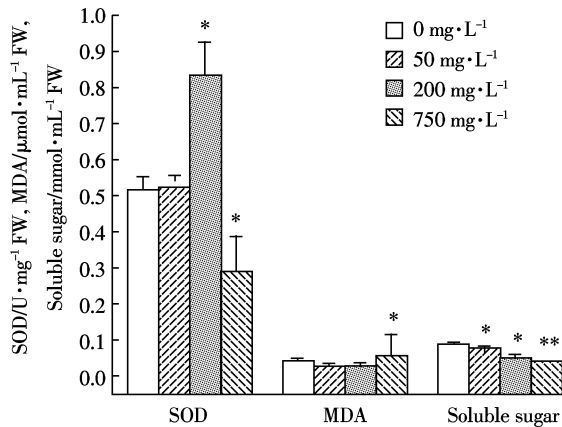


图 4 三聚氰胺对斜生栅藻 MDA、SOD、可溶性糖含量的影响

Figure 4 Effects of melamine on MDA, SOD and soluble sugar contents of *S. obliquus*.

3 讨论

已有实验证明^[13-14], NH_4^+-N 是藻类优先利用的 N 源, 因为这种形态的 N 可直接被利用, 其他无机形态的 N (如 NO_3^- 、 NO_2^-) 都是间接利用的。有关藻类对有机氮吸收利用的报道较少, 本实验就三聚氰胺对藻的生理进行研究。本研究中, 染毒的前 3 d, 三聚氰胺对斜生栅藻的生长有促进作用, 并且浓度越高促进作用越强。但从第 3 d 起, $750 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组对藻生长表现抑制效应, 这可能是由于高浓度三聚氰胺的毒性作用; 随着染毒时间的延长, 三聚氰胺逐渐在细胞内积累, 引起细胞内一系列生理生化指标发生变化, 导致藻生长被抑制。虽然氨氮是可被植物直接利用的氮, 但高浓度的非离子态氨和铵根离子会对植物产生毒害作用, 影响植物的生长, 因此大部分植物不能耐受高浓度的氨氮。有研究表明^[15], 高浓度的非离子态氨和铵根离子会对植物产生毒害作用, 影响植物的生长。同时, 高浓度的有机氮源, 有可能会对藻形成逆境胁迫, 影响植物正常生理活动和生长, 如叶绿素、可溶性糖的含量减少, 从而抑制了藻的生长。三聚氰胺对斜生栅藻的影响同王珺等^[16]研究的富营养条件下不同形态氮对轮叶黑藻的生理影响的结果是一致的。

叶绿素是藻细胞进行光合作用的色素。已有研究表明不同植物、藻类等生物在遭受环境胁迫时, 光合色素的含量会发生变化^[17]。这是客观反映植物利用光照能力的一种重要指标, 往往作为判断植物光合能力强弱, 反映环境胁迫状况的依据^[18], 其含量的变化能较好地反映生物各阶段的生长情况。光合器官是植物细胞内活性氧的主要来源之一, 而光合色素及与之结

合的内囊体均具有不饱和多烯烃结构, 极易受活性氧的攻击。在三聚氰胺胁迫下, 光合色素的含量都有变化。低浓度的三聚氰胺与无氮培养基的对照组相比较显著增加, 可能是三聚氰胺为藻的生长提供氮源, 促进叶绿素的合成。随着浓度的增加各种光合色素也在逐渐增加, 达到最大值时又开始减少。但是在高浓度时三聚氰胺又抑制光合色素的合成, 可能是三聚氰胺的毒性作用在藻体内的积累。植物能够利用有机氮首先要将其转化成为无机氮后再利用, 高浓度的三聚氰胺对藻光合色素有抑制作用, 可能是三聚氰胺过多地转化成无机氮, 超过藻所能承受的限度, 对藻形成逆境胁迫, 产生毒害, 从而影响藻的正常生理活动, 抑制了它的正常生长。氮元素是藻类生长所必需的, 但高浓度的有机氮可能会对植物产生毒害作用, 影响植物的生长。这同颜昌宙等^[15]研究的不同浓度氨氮对轮叶黑藻地生理影响的结果是一致的。

SOD 在生物的细胞中广泛存在, 并作为细胞保护酶被人们重视和研究, 是生物体中惟一能直接地、特异性地猝灭超氧自由基的抗氧化酶, 是防御过氧化系统的重要保护酶, 在消除自由基、减轻脂质过氧化物作用和膜损伤方面起重要作用^[19], 它的变化可以反映出生物对环境胁迫的适应性程度。MDA 在细胞内的积累通常被用来作为细胞在受到胁迫时膜脂过氧化的重要指标。低浓度的三聚氰胺处理中, SOD 的活性有一定的升高, 这主要是因为三聚氰胺作为惟一的氮源, 使光合作用加强。而光合器官是植物细胞内氧自由基的主要来源^[19], 随着光合效率的增加, 氧自由基增加, 藻体为了降低氧自由基的损伤, 诱导出更多的 SOD, 以清除过多的氧自由基, 使自由基在体内处于平衡状态。此时 MDA 含量变化不大, 也说明细胞膜没有受到较大的损伤。而在三聚氰胺为 $750 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, SOD 的活性在下降, 此时 MDA 的含量也有明显的增加, 说明细胞膜受到较大的损伤。

与对照组相比, 胞外可溶性多糖随着三聚氰胺浓度的增加反而逐渐减少, 可能是在无氮的条件下, 细胞膜受到的损伤大于含氮的三聚氰胺处理组, 从而使大量的胞内糖渗透到细胞外, 使胞外糖含量增加, 这同尤珊等^[20]研究的光照对螺旋藻形态及胞外多糖的影响和机理的结果是相同的。

4 结论

本实验的结果显示, 在低浓度时, 三聚氰胺能够促进斜生栅藻生长, 显示斜生栅藻可以吸收并利用三

聚氰胺来合成自身所需的物质。

三聚氰胺对斜生栅藻光合色素、生长的影响是一致的。

三聚氰胺浓度在 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下时, SOD 的活性随其浓度的增加在上升, 而在 $750 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时急剧下降; MDA 以及可溶性糖含量随着三聚氰胺浓度的增加而减少。

参考文献:

- [1] 赵明, 王军波. 三聚氰胺的毒性及其对人体健康的影响[J]. 中国食物与营养, 2009(4): 7-9.
ZHAO Ming, WANG Jun-bo. Toxicity of melamine and its effects on people's health[J]. *Food and Nutrition in China*, 2009(4): 7-9.
- [2] US-FDA. Interim melamine and analogues safety/risk assessment. US Food and Drug Administration, Washington, DC. 2007.
- [3] 黎尚豪, 朱蕙, 夏宜峥. 单细胞绿藻的大量培养试验[J]. 水生生物学集刊, 1959(4): 463-472.
LI Shang-hao, ZHU Hui, XIA Yi-zheng. Single cell green algae batch culture[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1959(4): 463-472.
- [4] 熊丽, 吴振斌, 况琪军, 等. 氯氰菊酯对斜生栅藻的毒性研究[J]. 水生生物学报, 2002, 26(1): 66-73.
XIONG Li, WU Zhen-bin, KUANG Qi-jun, et al. Studies on the toxicity of cypermethrin to *Scenedesmus obliquus*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, 26(1): 66-73.
- [5] Nelly van der Hoeven. Calculation of the minimum significant difference at the NOEC using a non-parametric test[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2008, 70: 61-66.
- [6] 李合生, 孙群, 赵世杰. 植物生理生化试验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003.
LI He-sheng, SUN Qun, ZHAO Shi-jie, Manual book of botanical physiology and biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 2003.
- [7] 刘立闯, 胡志和, 刘彤, 等. 螺旋藻蛋白提取方法比较研究[J]. 食品科学, 2008, 29: 228-233.
LIU Li-chuang, HU Zhi-he, LIU Tong, et al. Comparative study on extraction methods of *Spirulina Phycobili* protein[J]. *Food Science*, 2008, 29: 228-233.
- [8] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gel[J]. *Anal Biochem*, 1971, 44: 246-278.
- [9] Bewley T D. Physiological aspects of desiccation tolerance[J]. *Ann Rev Plant Physiol*, 1979, 30: 195-238.
- [10] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.
- [11] Heath R L, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1981, 125: 189-198.
- [12] 林植芳, 李双顺, 林桂珠, 等. 水稻叶片的衰老与超氧化物歧化酶活性及脂质过氧化作用的关系[J]. 植物学报, 1984, 26: 605-615.
LIN Zhi-fang, LI Shuang-shun, LIN Gui-zhu, et al. Superoxide dismutase activity and lipid peroxidation in relation to senescence of rice on leaves[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 1984, 26: 605-615.
- [13] Boney A D. Phytoplankton[M]. Second edition. London: Edward Arnold, 1989: 30-39.
- [14] Elstner E F. Oxygen activation and oxygen toxicity[J]. *Rev Plant Physiol*, 1982, 33: 73-76.
- [15] 颜昌宙, 曾阿妍, 金相灿, 等. 不同浓度氨氮对轮叶黑藻的生理影响[J]. 生态学报, 2007(3): 1050-1055.
YAN Chang-zhou, ZENG A-yan, JIN Xiang-can, et al. Physiological effects of ammonia-nitrogen concentrations on *Hydrilla verticillata*[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2007(3): 1050-1055.
- [16] 王珺, 顾宇飞, 纪东成, 等. 富营养条件下不同形态氮对轮叶黑藻的生理影响[J]. 环境科学研究, 2006, 19: 71-73.
WANG Jun, GU Yu-fei, JI Dong-cheng, et al. Effects of different form of nitrogen on *Hydrilla verticillata* under eutrophic nutrient condition[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2006, 19: 71-73.
- [17] 王悠, 唐学玺, 李永祺, 等. 低浓度蒽对两种海洋微藻的生长的兴奋效应[J]. 应用生态学报, 2002, 13(3): 343-346.
WANG You, TANG Xue-xi, LI Yong-qi, et al. Stimulation effect of anthracene on marine microalgae growth[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2002, 13(3): 343-346.
- [18] 刘碧云, 周培疆, 李佳洁, 等. 丙体六六六对斜生栅藻生长及光合色素和膜脂过氧化影响的研究[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(1): 204-207.
LIU Bi-yun, ZHOU Pei-jiang, LI Jia-jie, et al. Effects of γ -HCH on the growth and photosystem and lipid peroxidation of *Scenedesmus obliquus* kütz[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(1): 204-207.
- [19] 刘娟妮, 王雪青, 庞广昌. 温度和光照对极大螺旋藻多糖含量和 SOD 酶活力的影响[J]. 食品工业科技, 2008, 29(9): 132-134.
LIU Juan-ni, WANG Xue-qing, PANG Guang-chang. Effects of temperature and light on content of polysaccharides and activity of SOD in *Spirulina Maxima*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2008, 29(9): 132-134.
- [20] 尤珊, 郑必胜, 郭祀远. 光照对螺旋藻形态及胞外多糖的影响和机理[J]. 海湖盐与化工, 2003, 6(4): 23-31.
YOU Shan, ZHENG Bi-sheng, GUO Si-yuan. Effect of illumination on the growth and EPS of spirulina[J]. *Journal of Salt and Chemical Industry*, 2003, 6(4): 23-31.
- [21] Sebastian E Sabatini, Angela B Juarez. Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2009(72): 1200-1206.