

芦苇化感物质 EMA 对铜绿微囊藻生长及藻毒素产生和释放的影响

门玉洁, 胡洪营*

(清华大学环境科学与工程系环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084)

摘要:研究了芦苇化感物质 2-甲基乙酰乙酸乙酯(ethyl-2-methylacetoacetate, EMA)对铜绿微囊藻 PCC7806 的生长抑制特性以及对微囊藻毒素 MC-LR 产生和释放的影响. 结果表明, EMA 在培养 1 周内对铜绿微囊藻 PCC7806 具有较强的抑制作用, $EC_{50, 7d}$ 值为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 但 EMA 的抑制效果随时间的延长而减弱. 整个培养期间, EMA 对 MC-LR 的胞外释放无显著影响. 培养 7 d 后, 单位藻细胞内 MC-LR 的含量随 EMA 浓度的增加而升高, EMA 投加浓度为 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 单位藻细胞 MC-LR 的含量为 $25 \text{ ng} \cdot (10^6 \text{ 个})^{-1}$, 比对照组增加了 39%. 但单位体积培养液中 MC-LR 总量(胞内和胞外的总和)随 EMA 浓度增加先略微升高后显著降低, EMA 投加浓度为 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 培养液中 MC-LR 胞内胞外总量为 $28 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 约为对照组的一半; 16 d 后, EMA 对单个细胞内 MC-LR 的含量以及 MC-LR 总量均无显著影响.

关键词: 铜绿微囊藻; 蓝藻毒素; MC-LR; 2-甲基乙酰乙酸乙酯; 水华控制; 芦苇

中图分类号: X52 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)09-2058-05

Effects of Allelochemical EMA from Reed on the Production and Release of Cyanotoxins in *Microcystis aeruginosa*

MEN Yu-jie, HU Hong-ying

(Environmental Simulation and Pollution Control State Key Laboratory, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: The growth inhibition of ethyl-2-methylacetoacetate (EMA) isolated from common reed (*Phragmites australis* Trin. or *Phragmites communis* Trin.) on the growth of *Microcystis aeruginosa* PCC7806 was investigated and the intracellular and extracellular concentration of cyanotoxin (MC-LR) after treatment of EMA were tested. The experimental results indicated that EMA has significant inhibitory effect on the growth of *M. aeruginosa* PCC7806, and the value of $EC_{50, 7d}$ was $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. However, the inhibition declined with the cultivation time. During the whole cultivation period, EMA showed no significant effect on the release of MC-LR from cells to the culture. After 7 days, the amount of intracellular MC-LR per cell unit increased with the increasing of EMA concentration. The amount of MC-LR per cell unit was $25 \text{ ng} \cdot (10^6 \text{ cells})^{-1}$ after the treatment with $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ EMA, which was increased by 39% compared with the control. The total MC-LR production (including intracellular and extracellular MC-LR) first slightly increased and then decreased significantly with the increase of EMA concentration. After the treatment with $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ EMA, the total MC-LR production was $28 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (only half of that in the control). After 16 days, EMA showed no significant effect on both the amount of MC-LR per cell and the total MC-LR production.

Key words: *Microcystis aeruginosa*; cyanotoxins; MC-LR; ethyl-2-methylacetoacetate; water bloom control; reed (*Phragmites australis* Trin. or *Phragmites communis* Trin.)

由富营养化引起的水华(water bloom)作为一种全球性的环境问题,在近年来受到人们越来越多地关注^[1~4].我国有 60% 的湖泊处于富营养化状态^[5].水华藻类以蓝藻为主,一些蓝藻能够产生并释放蓝藻毒素^[1~4],从而加剧了水体污染和水质恶化.全世界平均约有 59% 的水华是有毒的^[6].

利用植物化感作用抑制藻类生长是一种新型的生物抑藻技术,具有效果好,费用低,材料天然易得,不易造成二次污染等优点.目前已发现多种水生植物对水华藻类都具有一定的生长抑制作用^[7~11].有研究报道^[8, 12, 13],已经从穗花狐尾藻等大型水生植物中分离提取得到高效抑藻化感物质.本课题组系

统研究了挺水植物的抑藻作用,在国际上首次发现芦苇对铜绿微囊藻具有很强的抑制效果,并从其中分离出一种具有强抑藻作用的化感物质——2-甲基乙酰乙酸乙酯(ethyl-2-methylacetoacetate, EMA).EMA 对铜绿微囊藻和蛋白核小球藻均具有强抑制作用^[11, 14, 15].

由于许多引起水华的藻类是产毒的,在应用化感物质抑藻时,化感物质对有毒藻类藻毒素产生和

收稿日期: 2006-11-02; 修订日期: 2007-01-04

基金项目: NSFC-JST 国际重大合作项目

作者简介: 门玉洁(1983~),女,硕士研究生,主要研究方向为富营养化藻类的控制, E-mail: menyj@mails.tsinghua.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: hyhu@tsinghua.edu.cn

释放产生的影响直接关系到抑藻化感物质应用的生态安全性,因此是研究者非常关注的问题.

本研究以蓝藻毒素中最为常见、毒性最大^[4]的微囊藻毒素 MC-LR 为代表,在建立了 MC-LR 实验室定量分析方法的基础上,通过测定 EMA 对铜绿微囊藻 PCC7806 的生长抑制情况以及细胞内外 MC-LR 的含量,得到 EMA 对铜绿微囊藻 PCC7806 中微囊藻毒素 MC-LR 产生和释放的影响规律,以期为 EMA 在实际水体中的应用提供一定的理论依据.

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验藻种铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa* PCC7806)由中国科学院水生生物研究所淡水藻种库提供.实验前采用 BG11 培养基,预培养 9~10 d,使之处于对数增长期. BG11 培养基成分如表 1 所示.

表 1 BG11 培养基成分/mg·L⁻¹

Table 1 Composition of BG11 medium/mg·L⁻¹

化学成分	浓度	化学成分	浓度
NaNO ₃	1 500	Na ₂ EDTA	1
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	40	H ₃ BO ₃	2.86
MgSO ₄ ·7H ₂ O	75	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81
CaCl ₂ ·2H ₂ O	36	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.22
柠檬酸	6	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.079
柠檬酸亚铁铵	6	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.39
Na ₂ CO ₃	20	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.049

芦苇化感物质 EMA 和微囊藻毒素 MC-LR 标准品从 Sigma 公司购买.

1.2 实验方法

1.2.1 抑藻活性检测方法

采用培养液法,通过摇瓶实验对芦苇化感组分做抑藻活性检测. 500 mL 锥形瓶内放入总体积为 200 mL 藻类培养混合液,其中包括 5 mL 处于对数生长期的藻种液、一定量的培养液(121℃ 灭菌 20 min)和化感物质 EMA. EMA 的浓度梯度为 0、0.5、1.0、1.5、2.0 和 3.0 mg·L⁻¹,每个浓度设 3 个平行样. 将上述培养混合液置于温度 25℃,相对湿度 75%,光照强度 40~60 μmol·(m²·s)⁻¹,光暗时间比 14 h:10 h 的人工气候箱中培养 16 d.

1.2.2 藻类生长测定方法

采用显微镜计数法,每天在显微镜下用血球计数板进行计数,测定藻密度.每个样品用血球计数板平行计数 2 次,取平均值作为此样品计数结果.

藻细胞在 10 000 r/min, 30 min, 4℃ 的条件下离心后,经冷冻干燥,用称量法测定藻细胞干重.

1.2.3 藻毒素测定方法

微囊藻毒素 MC-LR 的测定采用固相萃取(SPE)结合高效液相色谱(HPLC)法^[16].在使用 HPLC 测定 MC-LR 前,需对待测的铜绿微囊藻培养液进行预处理.具体操作步骤为:取一定体积(100~150 mL)藻类培养液,在 10 000 r/min, 30 min, 4℃ 的条件下离心.收集胞外培养上清液,准备进行固相萃取.将收集到的藻细胞冷冻干燥并称量后于 -20℃ 条件下保存,进行胞内 MC-LR 的提取.

先用 20~30 mL 5% 乙酸溶解干燥后的藻细胞,搅拌 20~30 min, 10 000 r/min, 10 min 条件下离心,收集上清液备用.再用 20~30 mL 80% 乙醇溶解沉淀,搅拌 20~30 min,离心收集上清液^[16, 17].旋转浓缩除去上清液中的甲醇.将剩余溶液与用 5% 乙酸提取分离后得到的上清液合并,进行固相萃取.如果用 80% 甲醇提取不够完全,可重复操作 1~2 次,最后将每次操作得到的上清液合并进行固相萃取.

固相萃取使用 C₁₈ (Supelclean ENVI-18)固相萃取小柱,先用 10 mL 甲醇活化小柱,再用 15 mL 去离子水清洗.上待测样品(胞外培养上清液或胞内提取上清液).用 15 mL 20% 甲醇洗脱柱上杂质,再用 10 mL 甲醇(0.1% 体积比, TFA)洗脱柱上藻毒素.旋转浓缩至干,用 1 mL 60% 甲醇溶解并收集,离心去杂质后进行 HPLC 测定.

HPLC 测定的条件为: Shim-pack VP-ODS 250 mm×4.6 mm ZD 色谱柱,柱温 40℃, 60% 甲醇(0.05% 体积比, TFA)为流动相,流速 1 mL/min,进样量 10 μL.使用 UV 检测器,在 238 nm 波长下进行检测.本实验所使用的藻细胞内 MC-LR 检测方法的总回收率为 76.4%,HPLC 的检出下限是 0.1 mg·L⁻¹,实际检出下限与前处理浓缩倍数有关.

分别在培养对数期(7 d)和稳定期(16 d)测定胞外培养液和藻细胞中 MC-LR 的含量.

1.2.4 数据分析方法

EMA 对铜绿微囊藻(PCC7806)抑制效果的分析,根据藻密度计算相对抑制率.对具有抑制作用的受试藻类,求出其半效应浓度(EC₅₀)值.化感组分对藻类的相对抑制率计算公式为: IR(%)=(1-N/N₀)×100%,式中,IR 为相对抑制率, N 为加入化感组分实验组的藻密度(个·mL⁻¹), N₀ 为对照组藻密度(个·mL⁻¹).

采用 SPSS for Windows 10.0 对 EMA 对铜绿微囊藻(PCC7806)MC-LR 产生和释放影响的的结果进行统计分析.

2 结果与讨论

2.1 EMA 对铜绿微囊藻(PCC7806)的生长抑制作用

投加 EMA 培养 16 d 后,不同 EMA 浓度的藻类培养液中铜绿微囊藻的生长曲线如图 1 所示.由藻类培养 7 d 和 16 d 后的藻密度分别得到 EMA 在 7 d 和 16 d 后的抑制率曲线,如图 2 所示.在 1 周的培养时间内,随着 EMA 投加浓度的升高,对铜绿微囊藻的生长抑制作用也逐渐增强,从抑制率曲线求得 $EC_{50,7d}$ 的值为 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,这与笔者前期研究结果^[15]略有差异,这可能与先后使用藻种的品系特征不同有关.培养 16 d 后,各 EMA 投加浓度对铜绿微囊藻的抑制率较培养 7 d 时均有所下降,最高抑制率降为 20% 左右.

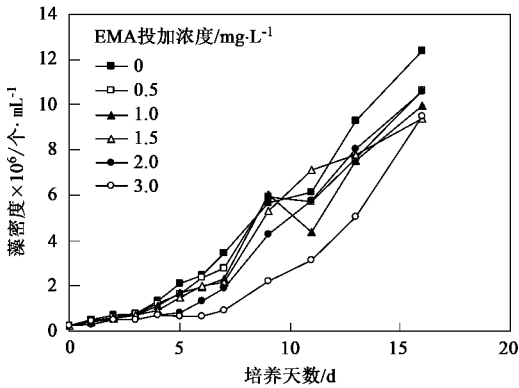


图 1 铜绿微囊藻 PCC7806 的生长曲线

Fig.1 Growth curve of *Microcystis aeruginosa* PCC7806

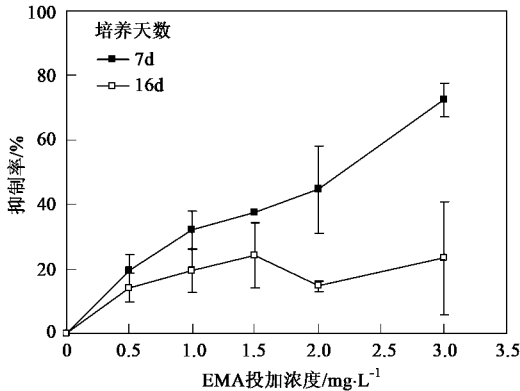


图 2 EMA 对铜绿微囊藻 PCC7806 的抑制率曲线 ($n=3$)

Fig.2 Inhibition curve of EMA on *Microcystis aeruginosa* PCC7806

Nakai 等人^[9]研究大型植物浸提液对铜绿微囊藻的生长抑制作用时,在一次性投加情况下,培养约 8 d 后,藻细胞开始恢复生长,抑制效果有所下降,这与本研究结果相似.而在半连续投加情况下,培养

15 d 后,加入浸提液的藻类培养液中藻细胞数量仍保持较低水平.这表明一次性投加 EMA 后,对铜绿微囊藻的抑制率会随着培养时间的延长而由高逐渐降低.其原因可能是藻类培养液中的化感物质在培养过程中逐渐被降解转化,从而培养液中 EMA 有效浓度逐渐降低,抑制率下降.因此,后续实验还需研究 EMA 连续或半连续投加下的抑制效果,并进一步探索 EMA 投加后的降解转化规律.

2.2 EMA 对铜绿囊藻(PCC7806)MC-LR 释放的影响

在培养 7 d 后,胞外培养液中 MC-LR 的浓度如表 2 所示.培养 16 d 后,胞外培养液中均未检测出与 MC-LR 标准品(出峰时间 12.3 min)相对应的出峰.

从表 2 可以看出,对照组 7 d 时胞外 MC-LR 浓度很低,小于 $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,此时藻细胞向胞外释放的藻毒素很少. Robilllot 等人^[18]的研究认为,在培养前 3 d 时,胞外藻毒素浓度很低,可以忽略.其研究也发现,在藻细胞生长开始进入稳定期之前,胞外藻毒素浓度会维持在较低的水平.而培养 16 d 后,即藻细胞生长开始进入稳定期时,对照组胞外 MC-LR 浓度仍未能检出.

与此同时,其它投加 EMA 的实验组中,胞外 MC-LR 浓度都与对照组胞外 MC-LR 浓度相似,小于 $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组第 3 个平行样除外).这说明,在本研究 16 d 的培养时间内,EMA 的投加对铜绿微囊藻 PCC7806 中微囊藻毒素 MC-LR 的释放无显著影响. Jones 等人^[19]研究了使用硫酸铜杀藻剂处理水华水体后,水体中溶解的 MC-LR (即胞外 MC-LR) 的变化情况,结果表明 MC-LR 的浓度先显著上升,之后逐渐减小.对于使用化学杀藻剂抑藻,虽能在短时间内起到显著的杀藻效果,但同时也引起了死亡藻细胞内藻毒素的大量释放,从而使水体中的藻毒素浓度迅速上升,影响水质安全.与此相比较,本实验条件下,使用化感物质抑藻,在有效控制藻细胞增殖的同时不会促进胞内藻毒素向胞外的释放.

表 2 投加 EMA 7 d 后胞外 MC-LR 的浓度¹⁾/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

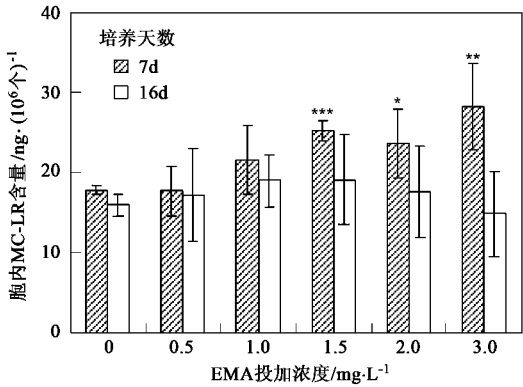
Table 2 Extracellular MC-LR concentration after a 7-day cultivation with EMA/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

平行样编号	EMA 投加浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$					
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	0.46	0.74	ND	ND	ND	ND
3	ND	0.87	0.52	0.59	ND	1.32

1) ND 表示小于检出下限 $0.3\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

2.3 EMA 对铜绿微囊藻(PCC7806)MC-LR 胞内产生的影响

培养 7 d 和 16 d 后投加不同浓度 EMA 的培养液中,藻细胞内 MC-LR 的含量(用单位个数藻细胞内 MC-LR 的质量来表示)如图 3 所示.对照组单个藻细胞内 MC-LR 含量与 Wiedner 等^[20]和 Downing 等人^[21]的测定结果在同一水平.7 d 后投加 EMA 的藻类培养液中单个藻细胞 MC-LR 的含量随 EMA 投加浓度的增加而升高,且投加浓度大于 1.5 mg·L⁻¹时,胞内 MC-LR 的产生量显著增加.



与对照组相比的显著性差异水平: * 为 $p < 0.1$,
* * 为 $p < 0.05$, * * * 为 $p < 0.01$; $n = 3$

图 3 投加 EMA 后胞内 MC-LR 含量

Fig.3 Amount of intracellular MC-LR after the addition of EMA

EMA 在投加后的前 1 周内对铜绿微囊藻表现出了较强的抑制作用,使其生长速度减慢.同时,单个藻细胞内 MC-LR 的产生量具有显著上升的趋势.EMA 投加后,藻细胞的数量保持在较低水平,但存活下来的藻细胞为了应对 EMA 的存在所造成的外界胁迫而在细胞内产生了更多的藻毒素.一般认为藻细胞内的能量大致有 2 种用途:一是用于自身生长的营养物质的合成,二是抵抗环境胁迫.EMA 的存在作为一种环境胁迫,使藻细胞将能量更多地用于藻毒素的合成,这也可作为藻细胞生长缓慢的一个原因.

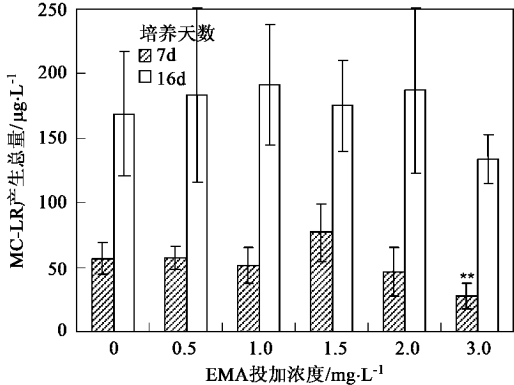
Kearns 等人^[22]的研究发现雷氏衣藻胞外分泌物能够促进水华鱼腥藻中类毒素的产生;Jang 等人^[23]的研究发现当铜绿微囊藻直接或间接与浮游动物(水蚤)接触时,单位干重藻细胞产生的藻毒素总量显著增加,其中直接接触的样品增加了 4 倍,同样,在另一研究中^[24],向铜绿微囊藻的培养液中加入植食和杂食性鱼类,单位藻细胞干重所产生藻毒素的量增加更为显著.上述研究中绿藻、浮游动物和食藻

鱼类加入到产毒藻类培养液中后,藻细胞产毒的变化情况类似,由于化感物质 EMA 也给铜绿微囊藻的生长带来压力,从而会使藻细胞受到诱导而产生更多的藻毒素来抵御这一环境,属于一种诱导抵御(inducible defense)机制^[24, 25].

培养 16 d 后,EMA 对铜绿微囊藻的生长抑制作用减弱,培养液中的藻细胞恢复生长,此时,单个藻细胞中 MC-LR 的含量随 EMA 投加浓度的增大有先升高后降低的趋势,但这些变化均不显著.因此,可以认为培养 16 d 后,EMA 对培养液中铜绿微囊藻胞内 MC-LR 产生的促进作用减弱,投加 EMA 的实验组中胞内 MC-LR 含量基本恢复到对照组水平.

由于在培养期间,向胞外释放的 MC-LR 的量非常少($< 5\%$),假设可忽略不计,则单个藻细胞内 MC-LR 含量结合相应的藻密度测定值即可得到培养期间培养液中所产生的 MC-LR 总量.7 d 和 16 d 时 MC-LR 的产生总量如图 4 所示.培养 7 d 后,培养液中 MC-LR 产生总量随 EMA 投加浓度的增加先增大后减小,EMA 投加浓度为 3 mg·L⁻¹时,MC-LR 产生总量显著减少.MC-LR 产生总量与单个藻细胞内 MC-LR 的产生量和藻密度有关.随着 EMA 投加浓度的增加,培养液中藻密度降低,同时单个藻细胞内 MC-LR 的含量却升高,于是,在培养 7 d 后 MC-LR 产生总量随 EMA 投加浓度的增加存在 1 个先增大后减小的趋势.

培养 16 d 后,培养液中 MC-LR 的产生总量同样随 EMA 投加浓度的增加有微弱的先增后减的变化,但这种变化趋势并不显著.



与对照组相比的显著性差异水平: * * 为 $p < 0.05$; $n = 3$

图 4 投加 EMA 后 MC-LR 产生总量

Fig.4 Total amount of MC-LR produced after the addition of EMA

3 结论

(1) EMA 对铜绿微囊藻 PCC7806 具有较强的生

长抑制作用, $EC_{50,7d}$ 为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 随着培养时间的延长, 抑制率逐渐降低. 后续实验需研究 EMA 连续投加时对 PCC7806 的抑制效果, 以及 EMA 投加后的降解转化规律.

(2) 在本实验 16 d 的培养时间内, EMA 对 MC-LR 的释放无显著影响, 投加 EMA 的培养液中胞外 MC-LR 浓度与对照组一样保持在较低水平, 小于 WHO 推荐使用的 水体中藻毒素浓度的最高限值 $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.

(3) 在本实验条件下, 培养 7 d 后单个藻细胞中 MC-LR 的产生量随着 EMA 投加浓度的升高而增加, EMA 投加浓度为 $1.5 \sim 3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时增加显著. 这可能是由于藻细胞的诱导防御机制引起的. 培养 16 d 后, EMA 对胞内 MC-LR 的产生无显著影响.

(4) 培养液中 MC-LR 总量随 EMA 投加浓度的升高而呈减小趋势, $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 显著减小. 因此, 在本实验投加 EMA 抑制铜绿微囊藻生长过程中, 不会使培养液中 MC-LR 的总量增大.

致谢: 衷心感谢中国科学院水生生物研究所宋立荣研究员及其课题组在藻毒素测定方法的建立中所给予的帮助和指导.

参考文献:

- [1] Codd G A. Cyanobacterial toxins: occurrence, properties, and biological significance [J]. Water Science and Technology, 1995, **32**(4): 149 ~ 156.
- [2] Codd G A. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control [J]. Ecological Engineering, 2000, **16**(1): 51 ~ 60.
- [3] Codd G A, Morrison L F, Metcalf J S. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2005, **203**(3): 264 ~ 272.
- [4] de Figueiredo D R, Azeiteiro U M, Esteves S M, et al. Microcystin-producing blooms-a serious global public health issue [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2004, **59**(2): 151 ~ 163.
- [5] 张维昊, 徐小清, 丘昌强. 水环境中微囊藻毒素研究进展 [J]. 环境科学研究, 2001, **14**(2): 57 ~ 61.
- [6] WHO. Cyanobacterial toxins: microcystin-LR. In: Guidelines for drinking water quality [A]. (2nd Edition), Addendum to Vol. 2. Health criteria and other supporting information [M]. Geneva: World Health Organization, 1998. 95 ~ 110.
- [7] Gross E M. Allelopathy of aquatic autotrophs [J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2003, **22**(3&4): 313 ~ 339.
- [8] Gross E M, Meyer H, Schilling G. Release and ecological impact of algicidal hydrolysable polyphenols in *Myriophyllum spicatum* [J]. Phytochemistry, 1996, **41**(1): 133 ~ 138.

- [9] Nakai S, Inoue Y, Hosomi M, et al. Growth inhibition of blue-green algae by allelopathic effects of macrophytes [J]. Water Science and Technology, 1999, **39**(8): 47 ~ 53.
- [10] 俞子文, 孙文浩, 郭克勤, 等. 几种高等水生植物的克藻效应 [J]. 水生生物学报, 1992, **16**(1): 1 ~ 7.
- [11] 李锋民, 胡洪营. 大型水生植物浸出液对藻类的化感抑制作用 [J]. 中国给水排水, 2003, **12**(11): 18 ~ 21.
- [12] Nakai S, Inoue Y, Hosomi M, et al. *Myriophyllum spicatum* released allelopathic polyphenols inhibiting growth of blue-green algae *Chlorella pyrenoidosa* [J]. Water Research, 2000, **34**(11): 3026 ~ 3032.
- [13] 戴树桂, 赵凡, 金朝晖, 等. 香蒲植物提取物的抑藻作用及其分离鉴定 [J]. 环境化学, 1997, **16**(3): 268 ~ 271.
- [14] 李锋民, 胡洪营. 芦苇抑藻化感物质的分离及其抑制蛋白核小球藻效果研究 [J]. 环境科学, 2004, **25**(5): 89 ~ 92.
- [15] Li F M, Hu H Y. Isolation and characterization of a novel antialgal allelochemical from *Phragmites communis* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, **71**(11): 6545 ~ 6553.
- [16] 宋立荣, 雷腊梅, 何振荣, 等. 滇池水华蓝藻铜绿微囊藻和绿色微囊藻的生长生理特性及毒素分析 [J]. 水生生物学报, 1999, **23**(5): 402 ~ 408.
- [17] 邓琳, 张维昊, 邓南胜, 等. 微囊藻毒素的提取与分析研究进展 [J]. 重庆环境科学, 2003, **11**(25): 177 ~ 180.
- [18] Robillot C, Vinh J, Puisieux-Dao S, et al. Hepatotoxin production kinetics of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7820, as determined by HPLC-mass spectrometry and protein phosphatase bioassay [J]. Environmental Science and Technology, 2000, **34**(16): 3372 ~ 3378.
- [19] Jones G J, Orr P T. Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay [J]. Water research, 1994, **28**(4): 871 ~ 876.
- [20] Wiedner C, Visser P M, Fastner J, et al. Effects of light on the Microcystin Content of *Microcystis* Strain PCC 7806 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, **69**(3): 1475 ~ 1481.
- [21] Downing T G, Sember C S, Gehringer M M, et al. Medium N:P ratios and specific growth rate modulate microcystin and protein content in *Microcystis aeruginosa* PCC7806 and *M. aeruginosa* UV027 [J]. Microbial Ecology, 2005, **49**(1 ~ 6): 1 ~ 6.
- [22] Kearns K D, Hunter M D. Green algal extracellular products regulate antialgal toxin production in a cyanobacterium [J]. Environmental Microbiology, 2000, **2**(3): 291 ~ 297.
- [23] Jang M H, Ha K, Joo G J, et al. Toxin production of cyanobacteria is increased by exposure to zooplankton [J]. Freshwater Biology, 2003, **48**(9): 1540 ~ 1550.
- [24] Jang M H, Ha K, Lucas M C, et al. Changes in microcystin production by *Microcystis aeruginosa* exposed to phytoplanktivorous and omnivorous fish [J]. Aquatic Toxicology, 2004, **68**(1): 51 ~ 59.
- [25] Brönmark C, Hansson L A. Chemical communication in aquatic system: an introduction [J]. Oikos, 2000, **88**(1), 103 ~ 109.