

不同形态氮对微囊藻叶绿素 a 合成及产毒的影响*

张亚丽¹, 李 涵^{1,2}, 许秋瑾^{1**}, 储昭升¹, 席北斗¹

(1: 中国环境科学研究院, 北京 100012)

(2: 中国矿业大学(北京)化学与环境工程学院, 北京 100083)

摘 要: 利用室内培养实验比较研究了铵氮和硝氮对河北洋河水库微囊藻(*Microcystis* sp.) 生长、叶绿素 a 合成及产毒的影响。结果显示, 铵氮培养条件下, 在对数生长期, 生物量及叶绿素 a 含量随铵氮浓度的升高而逐渐增多, 但高铵氮浓度(10.0 mg/L)培养条件则下降。藻细胞 MCRR 含量随铵氮浓度的升高呈波动变化, 高铵氮浓度(10.0 mg/L)条件下, 微囊藻毒素含量骤升, 高达 $6.345 \times 10^{-8} \mu\text{g}/\text{cell}$, 与其他处理组相比有明显差异。硝氮培养条件下, 叶绿素 a 含量随硝氮浓度的增大呈波动式上升, 各浓度组间差异不显著; 藻毒素含量随着硝氮浓度的增加趋于增加, 5.0 mg/L 处理组达最大值, 为 $1.223 \times 10^{-8} \mu\text{g}/\text{cell}$, 但绝对值远小于铵氮处理组。两氮源对藻类生长的影响没有显著差别, 对数生长期, 当氮浓度处于 1.5–5.0 mg/L 时, 随着浓度的增加, 铵氮较利于藻类合成叶绿素; 在 1.0–10.0 mg/L 范围内, 铵氮组藻毒素的产量显著大于硝氮组, 铵氮较硝氮更易导致藻细胞合成藻毒素。

关键词: 微囊藻; 铵氮; 硝氮; 叶绿素 a; 微囊藻毒素

Effects of different forms of nitrogen on chlorophyll-a and microcystin production of *Microcystis* sp.

ZHANG Yali¹, LI Han^{1,2}, XU Qiuji¹, CHU Zhaosheng¹ & XI Beidou¹

(1: Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, P. R. China)

(2: College of Chemical and Environmental Engineering, China University of Mining and Technology (Beijing), Beijing 100083, P. R. China)

Abstract: Adopting the method of batch culture, the effect of ammonia nitrogen and nitrate nitrogen at different concentrations on the production of chlorophyll-a and microcystin of *Microcystis* sp. isolated from Yanghe Reservoir was investigated. Results showed that, when *Microcystis* sp. was cultured with ammonia nitrogen, contents of chlorophyll-a increased with ammonia nitrogen concentration in the logarithmic growth phase. However, the high concentration inhibited the growth of algae cells. The productions of MCRR fluctuated with the increase of ammonia nitrogen concentration. There was a remarkable rise of microcystin productions, reaching to $6.345 \times 10^{-8} \mu\text{g}/\text{cell}$, when the concentration of ammonia nitrogen was 10.0 mg/L. This was significantly different with other treatments. When *Microcystis* sp. was cultured with nitrate nitrogen condition, contents of chlorophyll-a increased undulately with the increasing of nitrate nitrogen concentration, and there was no difference among different groups. The productions of microcystin under high concentration increased with the concentration during the logarithmic growth phase. They increased to $1.223 \times 10^{-8} \mu\text{g}/\text{cell}$ when the concentration was 5.0 mg/L, and reached the maximum value which was far less than that of the ammonia nitrogen group. There was no significant difference on the growth of algae between the two nitrogen sources. Ammonia nitrogen was more beneficial to the synthesis of chlorophyll-a in algae cells with nitrogen concentration increasing under lower concentration(1.5–5.0 mg/L) during the logarithmic growth phase. The productions of microcystin under ammonia nitrogen condition were far larger than nitrate nitrogen group at the range of 1.0–10.0 mg/L, and there was significant difference among the groups. Overall, ammonia nitrogen was more easily to lead to the secretion of MCRR in algae cells.

* 国家自然科学基金项目(200809145)、国家“973”计划项目(2009ZX07106–001)和2009环保公益性专项项目(200909048)联合资助。2010–12–29 收稿; 2011–05–23 收修改稿。张亚丽, 女, 1988年生, 硕士研究生; E-mail: zhangdouli@163.com.

** 通讯作者; E-mail: xuqi@caes.org.cn.

Keywords: *Microcystis* sp.; ammonia nitrogen; nitrate nitrogen; chlorophyll-a; microcystin

近年来,随着水体富营养化程度加剧,我国乃至世界范围内蓝藻水华暴发的频度逐步增加. 其中微囊藻(*Microcystis* sp.) 因含微囊藻毒素(Microcystin, MC), 更是对生态环境和人类健康构成严重威胁^[1-2]. 高浓度的藻毒素对沿岸区域的人畜饮水安全造成了极大的威胁. 目前,常规的水处理工艺尚不能有效地处理微囊藻毒素,因此,进一步深入研究影响藻毒素合成的环境因素,对从根本上减少水体中的藻毒素含量有着重要意义. 国内外关于微囊藻生长及产毒的影响因子研究涉及氮、磷、pH 值、温度以及光照等^[3-4]. 其中关于不同形态氮营养盐对微囊藻的生长及其产毒影响的报道多集中于铵氮,且观点不尽一致:有研究认为适宜的铵氮浓度促进其生长^[5],也有研究认为铵氮不利于铜绿微囊藻的生长^[6];还有研究认为当铵氮浓度小于 1.83 mg/L(1.0 mmol/L) 时,微囊藻毒素的产量随着铵氮浓度升高而增大,铵氮浓度过大对其生长、生理和产毒均有抑制作用^[7]. 因此,本文针对性地选择了两种形态氮(铵氮和硝氮),研究其对微囊藻不同生长阶段下生长和产毒的影响,以期揭示氮源对微囊藻生长和产毒的机理,旨在为防治湖泊、水库等水体水华及减少藻毒素提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 藻种及培养基

试验用藻种为河北洋河水库水华暴发时分离的微囊藻. 藻种保存在中国环境科学研究院藻类培养室, 25 °C 和 2500 lx 条件下使用 M11 培养基^[8]培养.

整个实验以 M11 培养基为基础,配置成无氮培养基,实验采用 500 ml 三角瓶,内置 200 ml 培养液. 置于光照培养箱中进行培养. 实验分为硝氮和铵氮两个处理组,参考《地表水环境质量标准基本项目标准限值》, 每组分别设置 8 个铵氮和硝氮浓度,分别为 0.05、0.15、0.5、1.0、1.5、2.0、5.0、10 mg/L,每个浓度分别设 3 个平行,根据设定浓度添加相应量的 NaNO₃ 或 NH₄Cl. 培养条件为:光照强度为 2000 - 2500 lx,光暗比为 12 h:12 h,每天人工摇动 5 次.

将处于对数增长期的微囊藻进行接种. 接种前使用含正常氮量 1/10 的 M11 培养基进行 4 天的饥饿培养. 初始接种浓度为 5×10^4 cells/ml. 经前期研究证实,1 - 6 d 为对数生长期,7 - 16 d 为稳定生长期^[9]. 实验周期内(6 d,16 d)测定叶绿素 a 含量和胞内藻毒素的含量.

1.2 藻细胞计数

用血球计数板(Minato TAT AI)在光学显微镜(Olympus BH-2)下计数,每次计数细胞 30 - 300 个,每个样品计数三次.

1.3 叶绿素 a 含量的测定方法^[10]

根据藻液浓度取一定体积藻样,用抽滤瓶抽滤藻液,过滤后取下滤膜,将其对折,将滤膜剪碎,加 5 ml 丙酮提取液,研磨 3 - 5 min,然后将液体移入离心管,再取 5 ml 丙酮提取液润洗研钵. 然后将所有提取液放置在黑暗低温的环境中提取 2 - 4 h,不得超过 24 h. 将提取液放入冷冻离心机中离心,转速 12000 r/min 下离心 20 min,将上清液移入试管. 分别在 630、647、664 和 750 nm 下测定吸光度.

根据公式 $C(\text{mg/L}) = 11.85(A_{664} - A_{750}) - 1.54(A_{647} - A_{750}) - 0.08(A_{630} - A_{750})$ (在 90% 的丙酮溶液中) 计算叶绿素 a 的含量, A_{664} 、 A_{647} 、 A_{630} 和 A_{750} 分别表示提取液在波长为 664、647、630 和 750 nm 时的吸光度.

1.4 微囊藻毒素测定方法

采用固相萃取(SPE)结合高效液相色谱(HPLC)法^[11]. 测定 MC 前,取一定量的藻液,用孔径为 0.4 μm 的玻纤膜过滤,取滤膜上的部分分析藻毒素含量. 样品在 -25 °C 下冷冻,经冻干器冻干 3 d 后,用 50 ml 甲醇(色谱纯)(75%)提取.

测定 MC 的仪器为美国安捷伦公司高效液相色谱(Agilent 1200),配有自动进样器和紫外检测器. 使用反相色谱柱(Agilent, 5 μm, 2.1 mm × 150 mm)进行梯度洗脱,流动相由流动相 A(水 + 0.05% (V/V) TFA) 和流动相 B(甲醇 + 0.05% (V/V) TFA) 组成,据多次实验结果比对后,确定梯度洗脱程序为:55% B(保持 2 min)20 min 内升至 65% B(保持 7 min),再在 5 min 内回至 55% B(保持 5 min),流速为 1.0 ml/min,进样量

为10 μ l. 藻毒素的标准品 Microcystin-RR(简称为 MCRR)购自美国 Sigma-Aldrich 公司,纯度(HPLC) >99%. 使用紫外检测器(UV)进行检测,最大吸收波长 λ_{\max} = 238 nm. 按照这样的色谱条件,在保留时间 5.897 min 处出现微囊藻毒素 MCRR 特征吸收峰.

1.5 统计学方法

采用 SPSS 10.0 分析软件中 One way ANOVA 进行多个样本均值间的比较.

2 结果

2.1 不同铵氮浓度及硝氮浓度对微囊藻生长特性的影响

当铵氮浓度 $\rho(\text{NH}_4^+ \text{-N})$ 处于 0.05 – 2 mg/L 范围时,微囊藻最大生物量和比生长速率均随铵氮浓度的增加而逐步增大,与低浓度组相比有明显差异($P < 0.01$),但当 $\rho(\text{NH}_4^+ \text{-N})$ 为 10 mg/L 时,最大生物量和比生长速率趋于下降(图 1 和图 2). 结果表明,硝氮浓度 $\rho(\text{NO}_3^- \text{-N})$ 的升高,能明显促进微囊藻的生长,各浓度组存在显著性差异($P < 0.01$).

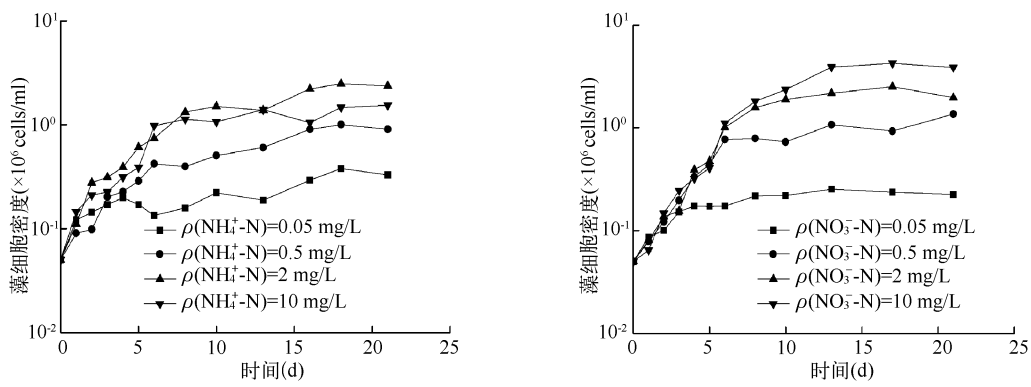


图 1 不同 $\rho(\text{NH}_4^+ \text{-N})$ 及 $\rho(\text{NO}_3^- \text{-N})$ 下微囊藻的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of *Microcystis* sp. under different ammonia and nitrate nitrogen conditions

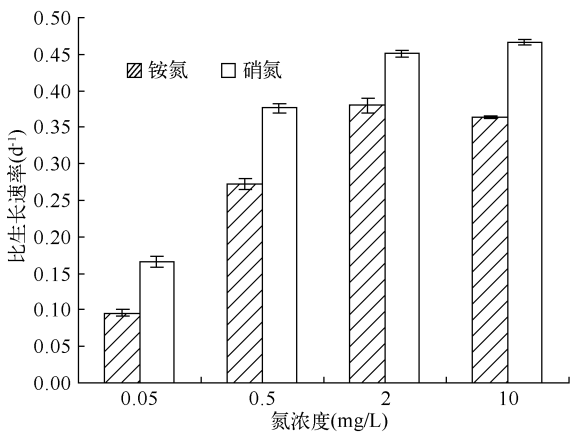


图 2 不同 $\rho(\text{NH}_4^+ \text{-N})$ 及 $\rho(\text{NO}_3^- \text{-N})$ 下微囊藻的比生长速率

Fig. 2 Specific growth rates of *Microcystis* sp. under different ammonia and nitrate nitrogen conditions

2.2 不同形态氮下不同时期(对数期和稳定期)单位藻细胞叶绿素 a 含量

各浓度铵氮培养条件下,在对数生长期,随着铵氮浓度的升高,单位微囊藻细胞的叶绿素 a 合成量呈先升后降的趋势,在 1.5 mg/L 处达最大值,为 2.384×10^{-7} mg/cell. 小于 1.0 mg/L 与大于 1.0 mg/L 的各浓度组间存在显著性差异 ($P < 0.01$). 高浓度铵氮培养条件下,对数期叶绿素 a 含量下降. 稳定生长期,叶绿素 a 含量总体呈上升趋势,并在 10.0 mg/L 达到最大值 1.210×10^{-7} mg/cell(图 3a). 5.0、10.0 mg/L 两处理组与其余各组均有显著性差异 ($P < 0.01$),表明高浓度铵氮在稳定生长期能促进微囊藻生长. 不同铵氮浓度下,对数期叶绿素 a 含量均大于稳定期.

各浓度硝氮培养条件下,在对数生长期,叶绿素 a 合成量呈波动式上升趋势,1.0、10.0 mg/L 处相对较大,分别为 1.402×10^{-7} 、 1.464×10^{-7} mg/cell,各浓度组间差异不显著;稳定期,总体呈上升趋势,5.0、10.0 mg/L 处明显高于其它组,为 1.840×10^{-7} 、 1.800×10^{-7} mg/cell(图 3b),小于 2.0 mg/L 与大于 2.0 mg/L 的各浓度组间均存在显著性差异 ($P < 0.01$),大于 2.0 mg/L 的各浓度组对叶绿素 a 合成有显著促进作用.

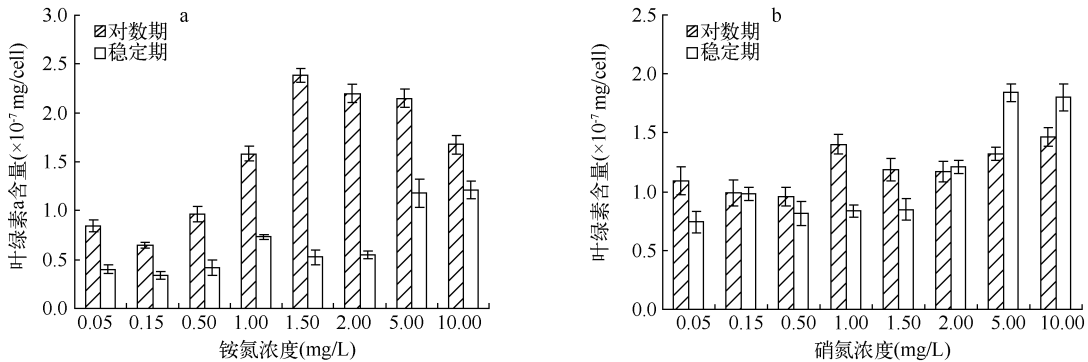


图 3 不同铵氮(a)和硝氮(b)浓度下单位微囊藻细胞的叶绿素 a 含量

Fig. 3 Contents of chlorophyll-a per cell under different ammonia nitrogen (a) and nitrate nitrogen (b) conditions

对数生长期,当氮浓度处于 1.5 – 5.0 mg/L 范围时,两处理组间相比有显著差异 ($P < 0.01$). 表明随着浓度的增加,铵氮较利于藻类合成叶绿素,但高浓度铵氮会抑制微囊藻合成叶绿素;稳定生长期,各浓度培养条件下,铵氮组中叶绿素 a 合成量均小于硝氮组,但两处理组相比,没有显著性差异 ($P > 0.01$).

2.3 不同形态氮下不同时期(对数期和稳定期)单位藻细胞 MCRR 含量

各浓度铵氮培养条件下:对数生长期,单位藻细胞 MCRR 含量随铵氮浓度的增加呈波动变化趋势,10.0 mg/L 培养条件下毒素含量骤升,达最高值 5.851×10^{-8} μ g/cell,与其余各浓度组相比有显著差异 ($P < 0.01$);稳定生长期,同样显示 MCRR 含量在 10.0 mg/L 处达最大,为 6.345×10^{-8} μ g/cell,与其余各组的差异显著 ($P < 0.01$)(图 4a).

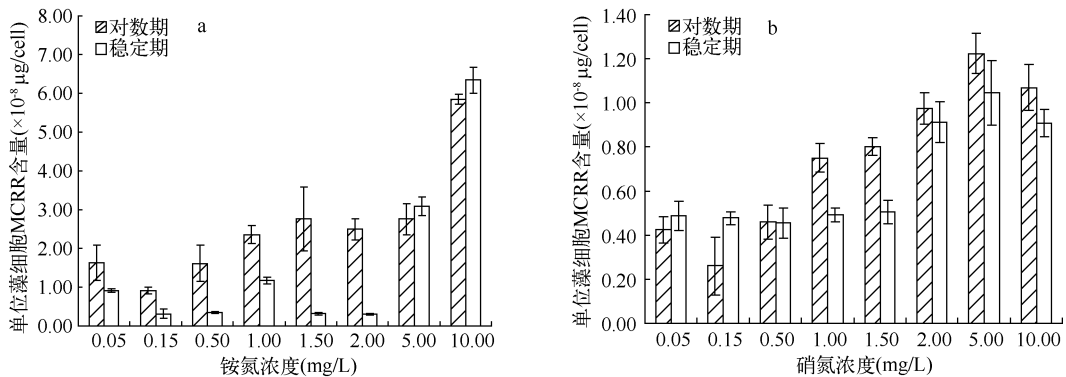


图 4 不同铵氮(a)和硝氮(b)浓度下单位微囊藻细胞的 MCRR 含量

Fig. 4 Contents of MCRR cell under different ammonia nitrogen (a) and nitrate nitrogen (b) conditions

各浓度硝氮培养条件下,在对数生长期,MCRR 含量总体呈上升的态势,在 5.0 mg/L 处 MCRR 含量达最大,为 $1.223 \times 10^{-8} \mu\text{g}/\text{cell}$. 小于 1.0 mg/L 与大于 1.0 mg/L 的各浓度组间存在显著性差异 ($P < 0.01$);稳定期,硝氮浓度大于 2.0 mg/L 时,MCRR 含量迅速上升,同样显示 5.0 mg/L 浓度组达最大,为 $1.047 \times 10^{-8} \mu\text{g}/\text{cell}$ (图 4b). 小于 2.0 mg/L 与大于 2.0 mg/L 的各浓度组间均存在显著性差异 ($P < 0.01$).

对数生长期,铵氮组 MCRR 含量大于硝氮组,且有显著性差异 ($P < 0.01$);稳定生长期,当氮浓度大于 5.0 mg/L 后,铵氮组产毒远大于硝氮组 ($P < 0.01$),相比有显著性差异. 总体而言,铵氮组 MCRR 含量大于硝氮组,表明铵氮培养较硝氮更易导致藻细胞合成藻毒素.

3 讨论

氮素是叶绿素 a 的主要成分,对植物光合速率、暗反应的主要酶以及光呼吸等都有明显的作用,直接或间接影响着光合作用^[12],即叶绿素 a 的形成主要依靠细胞提供氮素. 细胞利用氮源时,叶绿素 a 合成量随着细胞内含氮量的增大而升高. 相反,细胞对氮源利用减少后叶绿素 a 含量则随之减少^[13]. 有研究表明,相对于其他形式的氮,藻细胞更易吸收铵氮,但通常又认为高浓度铵氮抑制微囊藻的生长^[14]. 本研究结果也表明,对数生长期,随着铵氮浓度升高,生物量及叶绿素合成增加,但高浓度铵氮对微囊藻的生长有抑制作用. 唐全民等指出^[7],铵氮浓度大于 0.5 mmol/L (7 mg/L) 时,藻细胞比生长速率略降低,达到 40 mmol/L,微囊藻的生长则受到严重抑制,这和本研究中铵氮浓度为 10 mg/L 条件下藻细胞比生长速率降低的结果类似. 张突等研究认为当细胞内铵氮浓度增加,对藻细胞产生了一定的毒性,一定程度上就会抑制细胞的大分子有机物,如蛋白质等的合成,细胞的生长受到影响^[15]. 可能的原因是较高的铵氮浓度抑制藻细胞 GS 酶(谷氨酰胺合成酶)的活性,进而影响氨基酸的代谢和蛋白质的合成,同时较高的氮浓度不利于蓝藻糖份积累^[16]. 虽然高浓度铵氮对微囊藻叶绿素 a 合成有抑制作用,但本实验显示总体上小于 5.0 mg/L 的铵氮能明显促进叶绿素 a 的合成. 韩茂森等^[17]研究指出:藻类生长所需铵氮含量的最低值为 1.0 mg/L. 本实验研究亦显示小于 1.0 mg/L 与大于 1.0 mg/L 的各浓度处理组间存在显著性差异 ($P < 0.01$),表明当铵氮浓度大于 1.0 mg/L,能明显促进叶绿素合成. 据查,1.0 mg/L 对应《地表水环境质量标准》(GB3838-2002) III 类水质标准,一定意义上印证了 III 类水质标准制定的合理性. 对数生长期,当氮浓度处于 1.5–5.0 mg/L 范围时,两处理组间生长速率相比有显著性差异,说明一定浓度范围内,铵氮较硝氮更利于藻类生长,其原因是蓝藻优先利用铵氮,利用其他氮源之前均须先转化为铵氮,铵氮再与谷氨酸在谷氨酰胺合成酶(GS)作用下合成谷氨酰胺,进而被藻细胞利用^[14]. 本实验结果表明铵氮处理组最大生物量和叶绿素 a 合成量在对数期大于稳定期,可能是由于在对数生长期,相对于其他形式的氮,藻细胞更易吸收铵氮^[14];而硝氮处理组在 5、10 mg/L 时最大生物量和叶绿素 a 合成量则稳定期大于对数期,显示藻细胞经过适应性培养后,高浓度硝氮(5、10 mg/L)反而能持续促进藻类的生长,此实验结果和机理仍需进一步研究. 目前我国主要江、湖、河流域铵氮值基本处在 0.02–3.5 mg/L 范围内,个别地区超过 20.0 mg/L^[18]. 如能持续有效地监测氮源的种类及浓度,应能对富营养化发生起到预警作用.

在已发现的各种不同藻毒素中,MC 是一种在蓝藻水华污染中出现频率最高、产生量最大和造成危害最严重的藻毒素种类^[19]. MC 在藻体中的含量因环境条件和藻类的不同生长阶段而变化. 目前,关于氮素影响微囊藻毒素的研究结果不完全一致^[6,20–25],在实验模拟研究中,Vézic 等研究表明改变基质中氮磷的含量会导致微囊藻毒素产量的明显变化^[21]. Watanabe 和 Oishi 的研究结果表明毒素含量在氮缺乏的条件下变化不明显^[26],Sivonen 报道微囊藻在氮浓度较高时毒素含量最高. Codd 和 Poon 报道当降低氮浓度时毒素的含量仅为原来的 1/10^[27];而 Kameyama 等却发现对数生长期内胞内 MC 与氮浓度没有显著的相关关系^[28]. 野外研究中,Zheng 等对莲花湖的调查发现微囊藻毒素和 NH_4^+ -N 呈负相关关系^[29],Ame 等也得出相同结论^[30];Kotak 和 Rapala 等对加拿大 Albert 的湖泊研究表明 MC-LR 含量与 NO_3^- -N 呈负相关关系^[22,31]. 张杭君等对太湖流域的研究则表明 MCRR 与 NO_3^- -N 呈显著正相关, NO_3^- -N 可能是 MCRR 生物合成中利用的主要无机氮源^[32]. 本研究表明,低浓度的铵氮和硝氮组,微囊藻合成 MCRR 减少. 类似研究表明氮源不足时,进入藻细胞内的氮会被重新分配,优先用于生长等代谢活动,毒素作为次生代谢产物,其合成量并不高^[33];本研究结果为单位藻细胞 MCRR 含量随铵氮浓度的增加呈波动变化趋势,在 10.0 mg/L 时毒素含量骤升,达最高

值 $5.851 \times 10^{-8} \mu\text{g}/\text{cell}$; 硝氮浓度大于 $2.0 \text{ mg}/\text{L}$ 时, MCRR 含量迅速上升, $5.0 \text{ mg}/\text{L}$ 处理时达最大, 为 $1.047 \times 10^{-8} \mu\text{g}/\text{cell}$. 总体而言, 铵氮培养较硝氮更易导致藻细胞合成藻毒素. 张玮等^[7]研究表明当铵氮浓度为 $18.3 \text{ mg}/\text{L}$ 时, *M. aeruginosa* 的 MCRR 含量明显较大. 与之相比, 本文实验结果有相似之处. 高浓度铵氮下毒素含量的骤升, 很有可能是微囊藻对不利条件的一种应激反应, 是自身在不利环境下启动的一种防御机制. 有研究表明^[34-35]铵氮能影响藻类细胞中氨基酸库的组成, 而微囊藻毒素为一类 7 个 RR 氨基酸组成的环肽化合物, 从而推断铵氮影响产毒微囊藻的毒素生产也可能与细胞谷氨酸含量相关. 对于利用硝氮时细胞内毒素含量比铵氮低的现象, 其原因可能是微囊藻在硝酸盐下生长, 毒素合成受到硝酸还原酶 (NR) 的限制^[36]. 目前, 不同学者研究成果存在差异, 主要是由于蓝藻的生长和毒素合成是受多种物理、化学、生物等综合因素共同作用的结果, 而且各种产毒藻之间还存在一定的种群差异.

4 结论

(1) 铵氮培养条件下: 叶绿素 a 含量总体随铵氮浓度的升高而逐渐增加, 但高铵氮浓度 ($10.0 \text{ mg}/\text{L}$) 对微囊藻生长和叶绿素合成起抑制作用. 藻细胞 MCRR 含量随铵氮浓度的升高有增加的趋势; 而高铵氮浓度 ($10.0 \text{ mg}/\text{L}$) 条件下, 微囊藻毒素含量骤升, 高达 $6.345 \times 10^{-8} \mu\text{g}/\text{cell}$.

(2) 硝氮培养条件下: 叶绿素 a 含量随硝氮浓度的增大呈波动式上升, 各浓度组间差异不显著; 藻毒素含量随着硝氮浓度增加趋于增加, $5.0 \text{ mg}/\text{L}$ 处理组达最大值, 为 $1.223 \times 10^{-8} \mu\text{g}/\text{cell}$.

(3) 两氮源对藻类生长的影响没有显著差别. 对数生长期, 当氮浓度处于 $1.5 - 5.0 \text{ mg}/\text{L}$ 范围时, 表明随着浓度的增加, 铵氮较利于藻类合成叶绿素; 在 $1.0 - 10.0 \text{ mg}/\text{L}$ 范围内, 铵氮组藻毒素的产量远大于硝氮组, 差异显著, 铵氮较硝氮更易导致藻细胞合成藻毒素.

(4) 目前我国主要江、湖、河流域铵氮值基本处在 $0.02 - 3.5 \text{ mg}/\text{L}$ 范围内, 从本研究结果推论, 从控氮角度, 我国湖泊富营养化治理与控制, 应优先控制铵氮.

5 参考文献

- [1] 韩博平, 韩志国, 付翔. 水库蓝藻和蓝藻毒素分布与检测——广东省典型供水水库研究. 北京: 科学出版社, 2003.
- [2] 李效宇. 微囊藻毒素的毒理研究[学位论文]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2001.
- [3] Wicks RJ, Thiel PG. Environmental factors affecting the production of peptide toxins in floating scums of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in a hypertrophic African reservoir. *Environmental Science and Technology*, 1990, **24**: 1413-1418.
- [4] Downing TG, Meyer C, Gehring MM *et al.* Microcystin content of *Microcystis aeruginosa* is modulated by nitrogen uptake rate relative to specific growth rate or carbon fixation rate. *Environmental Toxicology*, 2005, **20**: 257-262.
- [5] 刘红涛. 铜绿微囊藻生长与环境因子的关系及其铜胁迫下的毒理学效应[学位论文]. 武汉: 华中师范大学, 2003.
- [6] 唐全民, 陈峰, 向文洲等. 铵氮对铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) FACHB905 的生长、生化组成和毒素生产的影响. 暨南大学学报(自然科学版), 2008, **29**(3): 290-294.
- [7] 张玮, 林一群, 郭定芳等. 不同氮、磷浓度对铜绿微囊藻生长、光合及产毒的影响. 水生生物学报, 2006, **30**(3): 318-322.
- [8] 胡小贞, 金相灿, 储昭升等. 太湖铜绿微囊藻与四尾栅藻的光竞争及模拟优势过程初探. 农业环境科学学报, 2005, **24**(3): 538-543.
- [9] 李涵, 许秋瑾, 储昭升等. 不同形态氮对洋河水库螺旋鱼腥藻和惠氏微囊藻生长的影响. 环境科学研究, 2010, **23**(12): 1494-1498.
- [10] Jeffrey SW, Humphrey GF. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae, and natural phytoplankton. *Biochem Physiol Pflanz*, 1975, **167**: 191-194.
- [11] 刘碧波, 肖邦定, 刘剑彤等. 天然水体中痕量微囊藻毒素的高效液相色谱测定方法优化. 分析化学研究简报, 2005, **33**(11): 1577-1579.
- [12] 赵平, 孙谷畴, 彭少麟. 植物氮素营养的生理生态学研究. 生态科学, 1998, **17**(2): 37-42.
- [13] 华汝成. 单细胞藻类的培养与利用. 北京: 农业出版社, 1986.

- [14] Muro-pastor MI, Florencio FJ. Regulation of ammonium assimilation in cyanobacteria. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2003, **41**: 595-603.
- [15] 张 突, 陈 荔, 洪华生等. 硝酸盐浓度对南极亚历山大藻毒素含量和组成的影响. 厦门大学学报(自然科学版), 2007, **46**(1): 115-119.
- [16] 唐全民, 陈 峰, 向文洲等. 铵氮对铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*) FACHB905 的生长、生化组成和毒素生产的影响. 暨南大学学报(自然科学版), 2008, **29**(3): 290-294.
- [17] 韩茂森等. 淡水生物学. 北京: 农业出版社, 1981: 234.
- [18] 国家地表水水质自动监测系统. (<http://58.68.130.147/>).
- [19] 闫 海, 潘 纲, 张明明. 微囊藻毒素研究进展. 生态学报, 2002, **22**(11): 1968-1975.
- [20] 史红星, 曲久辉, 刘会娟等. 微囊藻毒素产生过程中氮素作用同位素示踪研究. 科学通报, 2008, **53**(4): 407-412.
- [21] Vézic C, Rapala J, Vaitomaa J *et al.* Effect of nitrogen and phosphorus on growth of toxic and nontoxic *Microcystis* strains and on intracellular microcystin concentrations. *Microbial Ecology*, 2002, **43**(4): 443-454.
- [22] Kotak BG, Lam AKY, Prepas EE *et al.* Variability of the hepatotoxin microcystins-LR concentration in phytoplankton of eutrophic lakes. *Journal of Phycology*, 1995, **31**(2): 248-263.
- [23] 孔 倩, 杨柳燕, 肖 琳等. 黑暗下不同氮源对铜绿微囊藻生长和 pH 的影响. 生态学报, 2008, **28**(5): 2060-2064.
- [24] 许 海, 杨林章, 刘兆普. 铜绿微囊藻和斜生栅藻的氮营养动力学特征. 环境科学研究, 2008, **21**(1): 69-73.
- [25] Lee SJ, Jang MH, Kim HS *et al.* Variation of microcystin content of *Microcystis aeruginosa* relative to medium N:P ratio and growth stage. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, **89**(2): 323-329.
- [26] Watanabe MF, Oishi S. Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. *Applied Environmental Microbiology*, 1985, **49**: 1342-1344.
- [27] Sivonen K. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Applied Environmental Microbiology*, 1990, **56**: 2658-2666.
- [28] Kameyama K, Sugiura N, Isoda H *et al.* Effect of nitrate and phosphate concentration on production of microcystins by *Microcystis viridis* NIES 102. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 2002, **5**(4): 443-449.
- [29] Zheng L, Xie P, Li YL *et al.* Variation of intracellular and extracellular microcystins in a shallow, hypereutrophic subtropical Chinese lake with dense cyanobacterial blooms. *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*, 2004, **73**(4): 698-706.
- [30] Ame MV, Diaz MDP, Wunderlin DA. Occurrence of toxic cyanobacterial blooms in san roque reservoir (cordoba, Argentina); a field and chemometric study. *Environmental Toxicology*, 2003, **18**: 192-201.
- [31] Rapala J, Sivonen K, Lyra C *et al.* Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. *Applied Environmental Microbiology*, 1997, **63**: 2206-2212.
- [32] 张杭君, 张建英, 陈英旭等. 微囊藻毒素含量与自然水体环境影响因子的相关性. 环境科学, 2006, **27**(10): 1970-1973.
- [33] 李天深. 氮、磷营养盐对链状亚历山大藻(东海株)[学位论文]. 北京: 中国科学院研究生院, 2007.
- [34] 于仁成. 塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)产毒生理学研究[学位论文]. 北京: 中国科学院海洋研究所, 1998.
- [35] Merida A, Candau P, Florencio FJ. Regulation of glutamine synthetase activity in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 by the nitrogen source; effect of ammonium. *Journal of Bacteriology*, 1991, **173**: 4095-4100.
- [36] Guerrero MG, Vega JM, Losada M. The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Plant Physiology*, 1981, **32**: 169-204.