

汾河(太原市景区段)微囊藻的分子多样性及产毒能力*

王捷^{1,2}, 谢树莲¹, 王中杰², 徐瑶², 李仁辉^{2**}

(1: 山西大学生命科学学院, 太原 030006)

(2: 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 对太原市汾河景区采集到的微囊藻进行分离纯化, 得到 7 株微囊藻菌株, 运用 ITS、PC-IGS 和 *gyrB* 基因序列构建系统树来研究其分子多样性. 结果表明, 太原市汾河景区微囊藻具有一定的分子多样性. 采用 *mcyA* 基因和 ELISA 检测两种方法, 即全细胞 PCR 测定微囊藻毒素合成酶基因 A(*mcyA*), 对这些菌株的微囊藻毒素进行测定, 检测的 7 株微囊藻中有 6 株含有 *mcyA* 基因, ELISA 检测微囊藻细胞干粉产毒量在 0.003 - 0.043mg/g 之间, 属于产低毒藻种. 本文是首次报道太原市汾河景区微囊藻产毒量, 也为汾河水环境保护提出了更高的要求.

关键词: 汾河景区; 微囊藻; 分子多样性; 毒素

Molecular diversity and microcystin production of *Microcystis* in Fenhe River of Taiyuan

WANG Jie^{1,2}, XIE Shulian¹, WANG Zhongjie², XU Yao² & LI Renhui²

(1: School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, P. R. China)

(2: Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, P. R. China)

Abstract: To study the molecular diversity of *Microcystis* in Fenhe River of Taiyuan, phylogenetic analyses based on ITS、PC-IGS and *gyrB* genes were performed from 7 isolated strains of *Microcystis*. These seven *Microcystis* strains formed distinct lineages, suggesting high diversity of *Microcystis*. ELISA and whole-cell PCR targeting microcystin synthetase gene (*mcyA*) were used to determine microcystin production. Results showed that six of the seven strains contain *mcyA* gene and the microcystin concentrations of the six *Microcystis* strains ranged from 0.003mg/g to 0.043mg/g. This is the first report of toxic *Microcystis* in Fenhe River, and it is urgent that more critical measures should be taken for the protection of Fenhe River.

Keywords: Fenhe River; *Microcystis*; molecular diversity; microcystin

水体的富营养化和蓝藻水华已成为全球关注的重要环境问题^[1]. 研究表明蓝藻水华涵盖了许多种(属), 如微囊藻属(*Microcystis*)、鱼腥藻属(*Anabaena*)、浮丝藻属(*Planktothrix*)、束丝藻属(*Aphanizomenon*)、拟柱胞藻属(*Cylindrospermopsis*)等, 其中以微囊藻水华最为常见^[2].

微囊藻水华的形成给淡水环境带来了极大的影响. 一些种类微囊藻能产生次生代谢物微囊藻毒素(microcystin, MC), 该毒素是富营养化水体中最主要的蓝藻毒素类型, 直接威胁水中鱼类及其它生物的生存, 引发中毒甚至死亡. 饮用水源中的微囊藻毒素会对人类的肝脏造成损伤并会引起肝癌, 影响人类的健康和生存^[3]. 我国是微囊藻水华较为严重的国家, 尤其是南方地区长江流域的大中型浅水湖泊是主要的微囊藻水华发生地, 因此对微囊藻的多样性和分类及微囊藻毒素等研究大多集中在南方地区水体. 近年来, 虞功亮等^[4-5]对昆明滇池微囊藻种类的多样性以及我国的微囊藻新类别进行了报道, 吴忠兴^[6]分析了中国中北部和南部 20 株微囊藻的多样性, 刘海林等^[7]对江苏太湖和潮州汤溪水库微囊藻的分子多样性进行了研究. 但是, 目前关于我国北方地区的蓝藻水华研究非常少, 有关黄河流域水体中水华蓝藻的报道更少, 这样的研究现状和格局对于我国水华蓝藻多样性的认识具有一定的局限性.

* 中国科学院“百人计划”项目(082303-1-501)资助. 2010-10-19 收稿; 2011-01-10 收修改稿. 王捷, 男, 1984 年生, 硕士研究生; E-mail: wangjie901@126.com.

** 通讯作者; E-mail: reli@ihb.ac.cn.

太原市汾河景区,即汾河太原城区段治理美化工程,全长 6km.它是集休闲、度假、观光旅游为一体的大型公园,也是太原市目前规模最大的公共绿地游乐场所^[8].近年来,由于大量工业废水和生活污水的排入,致使汾河水污染日趋严重,微囊藻的数量也呈上升趋势.本文从该景区汾河水体中分离得到了微囊藻,并在实验室纯化培养,通过分子生物学的方法来研究微囊藻的分子多样性,并对其微囊藻毒素进行了分子生物学和化学分析.

1 材料与方法

1.1 采样位点与藻株分离

样品采于 2009 年 8 月,采用 25 号浮游生物网在位于太原市景区段的汾河水体中采集多次,置于 5ml 离心管中.采用经典的毛细管法,即用巴斯德吸管制成的毛细管(Pasteur Micropipette)在解剖镜下挑取单个群体,使用无菌纯水清洗 6-8 次,最后放入含有 2ml MA 培养基^[9]的 24 孔培养平板中培养,4-5 周便可得到单克隆藻种,纯化后的藻种编号分别为:TY001、TY002、TY003、TY004、TY005、TY006、TY007.

1.2 形态观察

显微观察和拍照的设备为 Olympus BX51 型光学显微镜,外接 500 万像素的数码相机(QIMAGING Micropublish 5.0 RTV),与台式计算机相连.用附带的图像分析软件(Image-proexpress 5.1)进行数码拍照和细胞直径测量,图像测量前,使用 Olympus 的 10 μ m 台测微尺校正检验,测量误差小于 0.001 μ m.观察时取一滴水,置于载玻片上,盖上盖玻片,直接用于镜检和显微拍照.

1.3 PC-IGS、*gyrB* 和 ITS 序列的 PCR 扩增

采用全细胞 PCR 对 PC-IGS、*gyrB* 和 ITS(16S 和 23S rRNA 基因的间隔区)序列进行扩增,PC-IGS 基因的扩增引物包括正向引物 PC β F(5'-GGCTGCTGTTTACGCGACA-3')和反向引物 PC α R(5'-CCAGTACCAC-CAG-CAACTAA-3')^[10].*gyrB* 基因的扩增引物为正向引物 *gyr*BF(5'-CGATGAGGCCGTAGCCGGTTACTG-3')和反向引物 *gyr*BR(5'-CTCTTCGCTACAATCAGCCA-3')^[11].ITS 基因的扩增引物为正向引物(5'-AAGGGAGACCTA-ATTCVGGT-3')和反向引物(5'-TTGCGGTCYTCITTTTTGGC-3')^[12],均由上海英骏生物技术有限公司合成.用 DNA 进行 PCR 扩增,PCR 反应体系为 20 μ l,包含 200 μ M dNTPs,1.5mM MgCl₂,10 \times bufferPCR 缓冲液 2 μ l,10mg/ml BSA 1 μ l,引物各 10pmol,1U TaqDNA 聚合酶,微囊藻悬浮液(约 3 \times 10⁵ cells/ml)1 μ l,其余用双蒸水补足.20 μ l 反应体系于 MJ Mini BioRad PCR 仪(BioRad,USA)上扩增,扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3min;94 $^{\circ}$ C 变性 30s,55 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 50s,共 35 次循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10min.扩增产物用 PCR 纯化试剂盒(Qiagen,Germany)进行纯化.

1.4 ITS、*gyrB*、PC-IGS 序列测定及分析

PCR 测序由北京华大基因科技有限公司进行正、反向测序,将测序得到的序列整理拼接后,用 Clustal X1.83 软件对测得的基因序列和 GenBank 数据库中的微囊藻以及集胞藻(*Synechocystis* sp. PCC6803)的基因序列进行多序列对齐排列.运用分子进化遗传分析软件 MEGA4.0 中的 Kimura2-parameter 模型计算各序列间的距离和序列相似性等,采用邻接法(neighbor-joining method, NJ)构建 NJ 树,空位或缺失位点均当作配对删除(pairwise deletion)处理.构树方法用自举检验(bootstrap)估计系统树分支节点的置信度,自展数据集为 1000,以集胞藻(*Synechocystis* sp. PCC6803)为外类群.

1.5 微囊藻细胞毒素测定

各取 1 μ l 微囊藻细胞于 PCR 管中,用 *mcyA*(上游引物:5'-AAAATTTAAAAGCCGTATC AAA-3',下游引物:5'-AAAAGTGTTTTATTAGCGGCTCAT-3')^[13],引物全细胞 PCR 检测微囊藻毒素合成酶基因 A,实验设阳性对照(*M. aeruginosa* 7806)和阴性对照(加无菌纯水),PCR 反应体系和条件同 1.2 所述.

微囊藻总毒素的测定用微囊藻毒素 ELISA^[14]检测试剂盒(中国科学院水生生物研究所)进行检测.

2 结果与分析

2.1 微囊藻形态特征

群体团块较大,自由漂浮.细胞球形,直径 4.3-5.9 μ m,有气囊(gas vesicle).群体发育早期为球形或椭

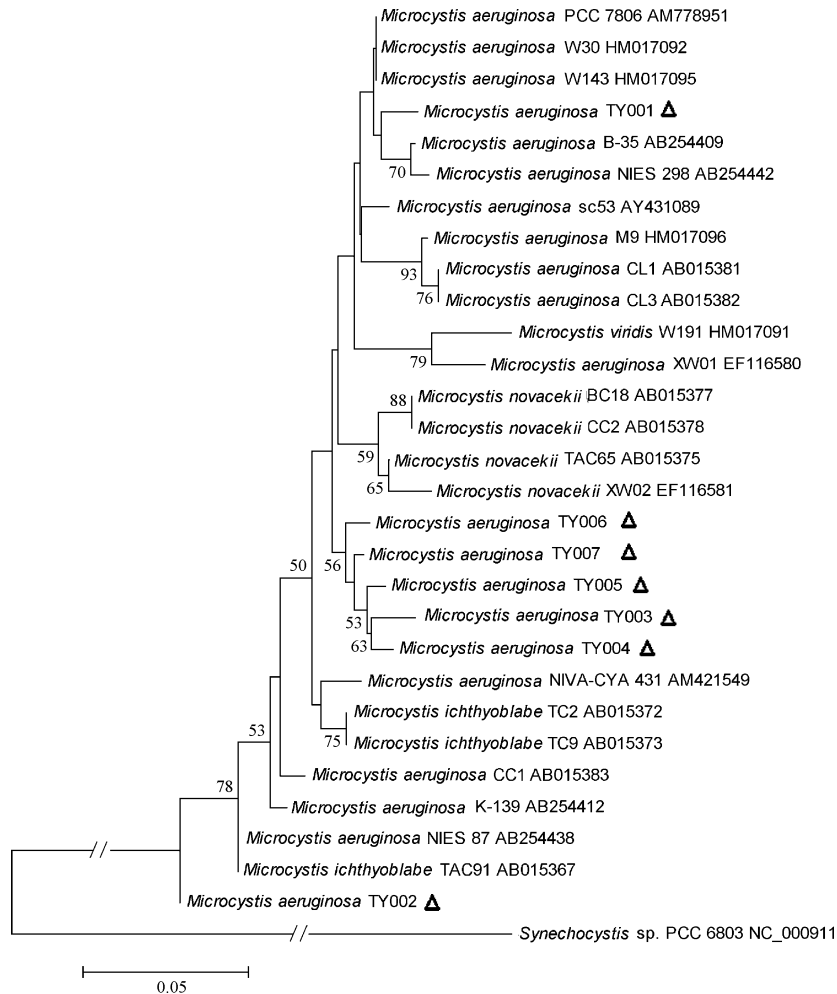


图 1 基于 ITS 基因构建的 NJ 树(标尺每刻度代表 0.05 的进化距离,节点处数字代表 1000 次重复 Bootstrap 值的百分数低于 50% 的未显示;▲代表本研究所用藻株,其余藻株来自 GenBank)

Fig. 1 Neighbour-Joining Tree of *Microcystis* strains based on sequences of ITS gene

圆形,中实,为青绿色或黑绿色,随着生长群体不断增大,最终形成不规则形状,胶被破裂或穿孔,群体成为树枝状或似窗格的网状体。胶被不密贴细胞,距离 $2\mu\text{m}$ 以上。胶被无色或微黄绿色,无折光,无分层,不明显。胶被内细胞排列较紧密。参照胡鸿钧和魏印心《中国淡水藻类——系统、分类及生态》^[15]、虞功亮等^[4] 所描述铜绿微囊藻形态特征,可以确定 7 株微囊藻均为铜绿微囊藻。

2.2 蓝藻 ITS 基因的序列及多样性分析

用于 ITS 基因序列研究的蓝藻共计 30 株,其中包含 29 株微囊藻,另外还有 1 株外类群集胞藻(*Synechocystis* sp. PCC6803)。7 株铜绿微囊藻经 Clustal X1.83 软件排序和手工调整后,得到序列矩阵总长度为 320bp。用 MEGA 4.0 分析发现变异位点数(V)为 28,简约信息位点数(Pi)为 14,变异位点和简约位点分别占总位点的 8.75% 和 4.38%。不同样品的碱基含量差异不大,碱基 A、T、C 和 G 的平均含量分别为 33.8%、18.5%、21.1% 和 26.6%。G + C 的含量为 47.7%,A + T 的含量为 52.3%,G + C 的含量稍低于 A + T 的含量。基于 ITS 基因构建的 NJ 树显示, TY001 和两株日本藻种 *M. aeruginosa* B-35、*M. aeruginosa* NIES298 为一个聚类,说明 TY001 和这两株日本藻种亲缘关系较近。TY003、TY004、TY005、TY006、TY007 为一个聚类, TY002 单独为一个聚类,未与来自中国北部和中部的四株铜绿微囊藻(*M. aeruginosa* CC1, *M. aeruginosa*

XW01, *M. aeruginosa* CL1, *M. aeruginosa* CL3) 聚为一类(图 1)。

2.3 蓝藻 PC-IGS 基因的序列及多样性分析

用于 PC-IGS 基因序列研究的蓝藻共计 44 株, 其中包含 43 株微囊藻, 7 株铜绿微囊藻经 Clustal X1.83 软件排序和手工调整后, 得到序列矩阵总长度为 626bp。用 MEGA4.0 分析发现变异位点数为 72, 简约信息位点数为 47, 变异位点和简约位点分别占总位点的 11.5% 和 7.5%。不同样品的含量差异不大, 碱基 A、T、C 和 G 的平均含量分别为 24.8%、24.2%、27.6% 和 23.4%。G + C 的含量为 51%, A + T 的含量为 49%, G + C 的含量稍高于 A + T 的含量。基于 PC-IGS 基因构建的 NJ 树显示(图 2), 用于本实验研究的 7 株铜绿微囊藻, 有 6 株和 GenBank 数据库中的铜绿微囊藻和西班牙的三株水华微囊藻 (*M. flos-aquae* UAM-FMF-1、*M. flos-aquae* UAM246 和 *M. flos-aquae* UAM-CMF-3) 为一个聚类, 它们是 TY001, TY003, TY004, TY005, TY006, TY007。这个聚类中的铜绿微囊藻有 6 株来自于中国的云南滇池 FACHB940、中国武汉东湖、上海淀山湖、黑龙江五大连池药泉, 其它中国藻株均来自于中部和南部地区, 但是没有和这 6 株藻聚为一类。TY002 和 *M. panniformis* SPC702 为一个聚类, 分支支持率为 62%, 这表示它和巴西的这株微囊藻亲缘关系较近。

2.4 基于 *gyrB* 基因的序列及多样性分析

用于 *gyrB* 基因序列研究的蓝藻共计 26 株, 其中, 包含 25 株微囊藻, 另外还有 1 株是外类群, 即集胞藻 (*Synechocystis* sp. PCC6803)。调整后的序列长度为 960bp, 用 MEGA4.0 分析发现变异位点数为 22, 简约信息位点数为 10, 变异位点和简约位点分别占总位点的 2.29% 和 1.04%。不同样品的含量差异不大, 碱基 A、T、C 和 G 的平均含量分别为 29.3%、22.7%、23.4% 和 24.6%。G + C 的含量为 48%, A + T 的含量为 52%, G + C 的含量稍低于 A + T 的含量。基于 *gyrB* 基因构建的 NJ 树显示(图 3), 本实验所用的 7 株铜绿微囊藻, TY002, TY003, TY004, TY005, TY006, TY007 和日本的 *M. ichthyoblabe* TAC125 聚为一类, 说明这 6 株铜绿微囊藻和日本的这株鱼害微囊藻亲缘关系较近。TY001 和三株日本藻种(克隆) *M. aeruginosa* clone: gy10380. icb、*M. aeruginosa* NIES-91 和 *M. aeruginosa* NIES-101 聚在同一分支上, 分支支持率为 64%。

2.5 毒素检测

微囊藻毒素采用 *mcyA* 基因和 ELISA 检测两种方法进行测定, *mcyA* 基因 PCR 结果发现, 除 TY002 外, 其他 6 株微囊藻均扩增出 290bp 的目标条带(图 4)。

ELISA 检测实验室培养的铜绿微囊藻毒素浓度, 结果显示, TY001, TY003, TY004, TY005 和 TY007 产低浓度的毒素, 毒素浓度分别为 0.043、0.003、0.004、0.018 和 0.008mg/g, TY006 虽含有产毒基因 *mcyA*, 但是未检测出毒素。利用测序得到的 TY001, TY003, TY004, TY005, TY006 和 TY007 *mcyA* 基因核苷酸序列推导出氨基酸序列, 并和 GenBank 下载的有毒微囊藻 *M. aeruginosa* 7806 (GenBank 登陆号 AM778952) 氨基酸序列进行比对, 结果显示, TY006 相当于 *M. aeruginosa* 7806 的两个氨基酸 Leu-1608 和 Gln-1609 分别变化为 Tyr 和 Lys, 即 L、Q 变为 Y 和 K。

3 讨论

3.1 微囊藻分子多样性讨论

到目前为止, 在全球范围内已经报道了 50 多种微囊藻, 但是微囊藻的分类还是比较混乱。造成这些混乱的原因主要有: 1) 室内培养和野外群体微囊藻种区别较大, 同一微囊藻种有很高的生态表型多样性, 不同的微囊藻有时会出现相同的生态表型和过渡类型。2) 应用生理生化、分子生物学等方法显示, 微囊藻属种类的基因型相似性较高^[4]。传统的分类学方法即通过显微镜观察细胞的形状、大小、细胞排列和胶鞘等特征来对微囊藻进行分类, 但是细胞形态会随着生理生态等因素的影响而发生变化, 出现复合型或过渡类型, 如果仅依靠形态特征分类, 会出现一些偏差。因此, 通过形态、生理生化、分子生物学等综合方法对不同生境的微囊藻属种类进行系统研究, 揭示微囊藻属的系统分类和多样性变得非常重要^[4, 11, 13]。目前为止, 我国对于微囊藻分子多样性的研究还很少, 尤其是中国北部地区。本研究从我国北方的黄河流域汾河中分离出了 7 株铜绿微囊藻, 这也是首次得到黄河流域微囊藻藻种并对其进行多样性研究。一些研究者曾使用 16S rRNA 基因进行分类和分子多样性的研究, 但是最近的研究发现, 此基因比较保守而不宜作为种及种以下分类水平的分类^[16]。为了探明这些形态种的分子多样性, 本文选用突变频率较高、含有丰富遗传信息的三个基因



图2 基于PC-IGS基因构建的NJ树
 (标尺每刻度代表0.05的进化距离,节点处数字代表1000次重复
 Bootstrap值的百分数低于50%的未显示;▲代表本研究所用藻株,其余藻株来自GenBank)

Fig. 2 Neighbour-Joining Tree of *Microcystis* strains based on sequences of PC-IGS gene

(ITS、PC-IGS、*gyrB*)作为研究的目标基因。近年来,国内外许多研究利用ITS序列的差异来探讨微囊藻种群之间的基因型以及种群之间的动态变化和演替^[17-18]。陈月琴等^[19]报道不同微囊藻种间ITS序列相似性为94.8%,Otsuka等^[20]报道的ITS序列相似性为93.3% - 100%,铜绿微囊藻种内序列相似性为95.9%。Wu

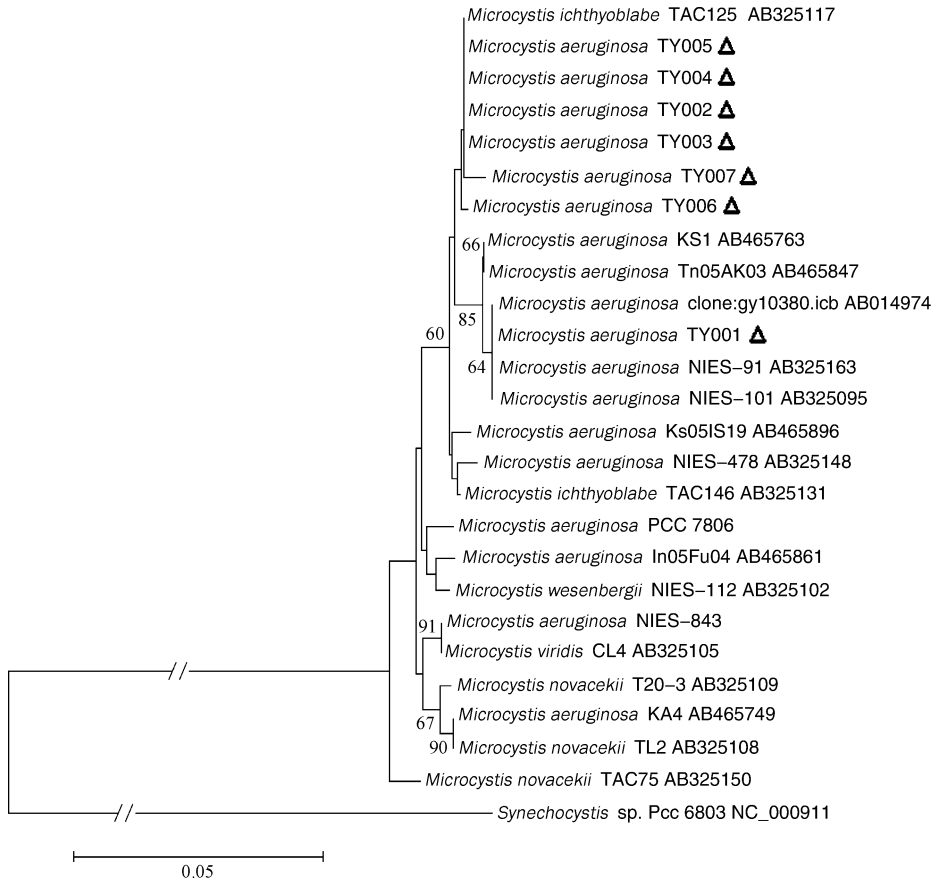


图3 基于 *gyrB* 基因构建的 NJ 树
 (标尺每刻度代表 0.05 的进化距离, 节点处数字代表 1000 次重复
 Bootstrap 值的百分数低于 50% 的未显示; ▲代表本研究所用藻株, 其余藻株来自 GenBank)
 Fig. 3 Neighbour-Joining Tree based on sequences of *gyrB* gene

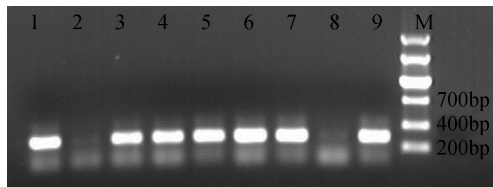


图4 微囊藻全细胞 PCR 扩增 *mcyA* 基因电泳图
 (1: TY001; 2: TY002; 3: TY003; 4: TY004; 5: TY005; 6: TY006;
 7: TY007; 8: 阴性对照; 9: 阳性对照; (*M. aeruginosa* 7806) M; marker)
 Fig. 4 Gel image of whole-cell PCR for microcystin synthetase genes (*mcyA*) of *microcystis*

等^[16]报道的微囊藻种间 PC-IGS 序列相似性为 94.0% - 99.8%。刘海林等^[7]报道微囊藻 *gyrB* 基因 (974bp) 种间序列相似性 $\geq 96.7\%$, 铜绿微囊藻种内序列相似性为 98.5%。本研究中, 7 株铜绿微囊藻 ITS 基因 (320bp) 序列相似性为 97% - 100%, PC-IGS 基因 (626bp) 序列相似性为 94% - 100%, *gyrB* 基因 (960bp) 种内序列相似性为 97% - 100%。比较这三个基因, 我们可以判定 PC-IGS 序列的变异度要大于 ITS 和 *gyrB*。基于 ITS、PC-IGS 基因构建的 NJ 树显示, 山西汾河铜绿微囊藻具有一定的分子多样性, 并且汾河的铜绿微囊藻

与我国北部其它地区和中南部地区的铜绿微囊藻基因型存在差异. 吴忠兴^[6]通过对我国部分地区的微囊藻进行研究,表明中国中北部和南部地区的微囊藻有不同的基因型,这和本文结论一致. 综合以上结果表明,中国不同地区分布的微囊藻具有较高的基因多样性. 使用这三个基因构建的 NJ 树显示的结果不相同,说明同一地域表型相同的微囊藻,基因型可能不同,但基因型的聚类和表型没有直接关系.

3.2 微囊藻产毒素分析

淡水水华中发现的最常见蓝藻毒素是微囊藻毒素,它是一类具有强烈促癌作用的肝毒素,主要来自于微囊藻、浮丝藻和鱼腥藻等浮游性蓝藻^[21-22]. 本研究在汾河中首次发现产毒微囊藻,分离纯化得到的7株铜绿微囊藻藻株中有5株为产毒微囊藻,但是其产毒量较低,这远远低于一般微囊藻干粉产毒量0.30-2.00mg/g^[23]. 有研究表明,环境因子对微囊藻毒素产生有很大的影响,这些环境因子主要包括光照、温度、pH值、氮元素、磷元素、溶解氧等,Watanabe等^[24]发现,当光强增加时,*M. aeruginosa* M-228株的毒性逐渐增加,达到一定的强度后,毒性保持稳定.Wicks等^[25]研究南非Hartbeespoort水库中的微囊藻毒素与环境因子的关系时发现,毒素浓度与太阳辐射呈正相关.何振荣等^[26]在研究*M. aeruginosa* M 8641时,让它在温度分别为31℃、25℃和20℃条件下生长,发现25℃时毒性最低,细胞增长最快,低温有利于毒素的产生.连民等^[27]研究不同浓度的氮、磷、锌、铁对HGZ培养基中的*M. aeruginosa* NIES-90产毒藻株的生长和产毒的影响时发现,藻毒素含量与氮、磷、锌、铁浓度呈正相关.本研究发现,TY006藻株含有*mcyA*基因,但是未检测出毒素.为了验证TY006藻株*mcyA*基因测序结果的准确性,分别由北京华大基因科技有限公司和上海美吉生物医药科技有限公司测序三次,得到的结果是相同的.基因比对结果显示,以已经报道的有毒微囊藻*M. aeruginosa* 7806的*mcyA*基因为参照,藻种TY006具有连续两个氨基酸的置换变化.Bozarth等^[28]发现在加利福尼亚州Copco水库中的微囊藻*mcyA*氨基酸Lys-1610和Ser-1611中间插入了两个氨基酸Thr和Phe,本研究中铜绿微囊藻TY006中*mcyA*氨基酸并没有像Bozarth发现的插入氨基酸,而是出现连续两个氨基酸的置换变化,这是本研究中首次发现的.当然,是否由于这种变化造成铜绿微囊藻TY006的微囊藻毒素未被检出还有待于进一步研究.Mikalsen等^[29]也发现一些微囊藻藻株含有*mcy*基因,但是不产微囊藻毒素.Kaebnick等^[30]推测,这可能是由于微囊藻在生长过程中,*mcy*基因簇突变.Kurmayer等^[31]对*Planktothrix rubescens*产毒基因和产毒能力进行研究发现,*P. rubescens*的产毒基因与产毒能力并不一致.

致谢:感谢中国科学院水生生物研究所有害藻类学科组老师和同学们在实验中给予的宝贵意见和建议,保证实验顺利完成.在此向他们致以我最真挚的谢意.

4 参考文献

- [1] 施丽梅,蔡元锋,杨华林等.太湖梅梁湾水华微囊藻基因型组成和产毒微囊藻丰度的变化.湖泊科学,2009,21(6):801-805.
- [2] 邵继海.生物源物质和溶藻菌对铜绿微囊藻抑制作用机理研究[学位论文].武汉:中国科学院水生生物研究所,2010.
- [3] Pouria S, Andrade A, Barbosa J *et al.* Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru. *Lancet*, 1998, 352: 21-26.
- [4] 虞功亮,宋立荣,李仁辉.微囊藻属常见种类的分类学讨论——以滇池为例.植物分类学报,2007,45(5):727-741.
- [5] 虞功亮,李仁辉.中国淡水微囊藻三个新记录种.植物分类学报,2007,45(3):353-358.
- [6] 吴忠兴.我国微囊藻多样性分析及其种群优势的生理学机制研究[学位论文].武汉:中国科学院水生生物研究所,2006.
- [7] 刘海林,章群,李名立等.太湖与广东汤溪水库微囊藻*gyrB*基因序列分析.湖泊科学,2010,22(2):221-226.
- [8] 郭春燕,李砧,谢树莲.太原市汾河景区浮游藻类及水质评价研究.山西大学学报,2006,29(2):205-208.
- [9] Kasai F, Kawachi M, Erata M *et al.* NIES-Collection, List of Strains, seventh ed. National Institute for Environmental Studies Tsukuba, 2004: 257.
- [10] Neilan BA, Jacobs D, Goodman AE. Genetic Diversity and Phylogeny of Toxic Cyanobacteria Determined by DNA Polymorphisms within the Phycocyanin Locus. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(11): 3875-3883.
- [11] Yoshida M, Yoshida T, Satomi M *et al.* Intra-specific phenotypic and genotypic variation in toxic cyanobacterial *Microcystis*

- strains. *J Appl Microbiol*, 2008, **105**: 407-415.
- [12] Hisbergues M, Christiansen G, Rouhiainen L *et al.* PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. *Arch Microbiol*, 2003, **180**: 402-410.
- [13] Otsuka S, Suda S, Li RH *et al.* Morphological variability of colonies of *Microcystis* morpho-species in culture. *J Gen Appl Microbiol*, 2000, **46**: 39-50.
- [14] 雷腊梅, 甘南琴, 张小明等. 三种检测微囊藻毒素的 ELISA 方法比较研究. 高技术通讯, 2004, **7**: 89-92.
- [15] 胡鸿钧, 魏印心编著. 中国淡水藻类——系统、分类及生态. 北京: 科学出版社. 2006: 62-68.
- [16] Wu ZX, Gan NQ, Song LR. Genetic diversity: Geographical distribution and toxin profiles of *Microcystis* strains (Cyanobacteria) in China. *J Integr Plant Biol*, 2007, **49**(3): 262-269.
- [17] Briand E, Escoffier N, Straub C *et al.* Spatiotemporal changes in the genetic diversity of a bloom-forming *Microcystis aeruginosa* (cyanobacteria) population. *ISME J*, 2009, **3**: 419-429.
- [18] Sabart M, Pobel D, Latour D *et al.* Spatiotemporal changes in the genetic diversity in French bloom-forming populations of the toxic cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *Environ Microbiol Rep*, 2009, **1**(4): 263-272.
- [19] 陈月琴, 何家菀, 庄丽等. 二种淡水微囊藻 rDNA 16S-23S 基因间隔区的序列测定与分析. 水生生物学报, 1999, **23**(1): 41-46.
- [20] Otsuka S, Suda S, Li RH *et al.* Phylogenetic relationships between toxic and nontoxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence. *FEMS Microbiol Lett*, 1999, **172**: 15-21.
- [21] 谢平. 微囊藻毒素对人类健康影响相关研究的回顾. 湖泊科学, 2009, **21**(5): 603-613.
- [22] 张维吴, 徐小清. 固相萃取高效液相色谱法测定水中痕量微囊藻毒素. 分析化学研究报告, 2001, **29**(5): 522-525.
- [23] 杨松芹, 巴月, 张慧珍等. 郑州市主要生活饮用水源中微囊藻细胞的分离培养与毒性鉴定. 郑州大学学报(医学版), 2008, **43**(1): 95-97.
- [24] Watanabe MF, Oishii S. Effects of Environmental Factors on Toxicity of a Cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under Culture Conditions. *Appl Environ Microbiol*, 1985, **49**(5): 1342.
- [25] Wicks RJ, Thiel PG. Environmental Factors Affecting the Production of Peptide Toxins in Floating Scums of Cyanobacterium *Microcystis Aeruginosa* in a Hypertrophic African Reservoir. *Environ Sci Technol*, 1990, **24**(9): 1413-1418.
- [26] 何振荣, 何家菀, 李仁辉等. 武汉东湖铜绿微囊藻毒株 M. 8641 的毒性与生长、温度的关系. 水生生物学报, 1990, **14**(4): 343-349.
- [27] 连民, 刘颖, 俞顺章. 氮、磷、铁、锌对铜绿微囊藻生长及产毒的影响. 上海环境科学, 2001, **20**(4): 166-170.
- [28] Bozarth CS, Schwartz AD, Shepardson JW *et al.* Population Turnover in a *Microcystis* Bloom Results in Predominantly Nontoxic Variants Late in the Season. *Appl Environ Microbiol*, 2010, **76**(15): 5207-5213.
- [29] Mikalsen B, Boison G, Skulberg OM *et al.* Natural Variation in the Microcystin Synthetase Operon *mcyABC* and Impact on Microcystin Production in *Microcystis* Strains. *J Appl Bacteriol*, 2003, **185**(9): 2774-2785.
- [30] Kaebemick M, Rohrlack T, Christoffersen K. A spontaneous mutant of microcystin biosynthesis: genetic characterization and effect on *Daphnia*. *Environ Microbiol*, 2001, **3**: 669-679.
- [31] Kurmayer R, Christiansen G, Fastner J *et al.* Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. *Environ Microbiol*, 2004, **6**(8): 831-841.