

胁迫因子对杜氏藻生长和色素积累的影响研究进展

Progress in the study of effects of stress factors on the growth and pigment accumulation in *Dunaliella*王培磊¹, 张学成², 孟振²

(1. 临沂师范学院, 山东 临沂 276000; 2. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

中图分类号: S942.5 文献标识码: A 文章编号: 1009-3096(2006)12-0087-05

盐生杜氏藻能适应盐度高达 350 的高盐湖泊, 在适宜的条件下合成的 β 胡萝卜素可达细胞干质量的 10% ~ 14%, 为自然界其它生物所不及^[1]。 β 胡萝卜素是维生素 A 的前体, 不仅能抑制致癌物质的活性、预防消化道溃疡、心脑血管疾病、防治青光眼和白内障, 增强人体免疫力和抗辐射能力, 而且还能大幅度提高人体对艾滋病的免疫指数^[2]。杜氏藻还是一种优质的单细胞蛋白饲料, 且甘油含量达干质量的 50%, 具有生产甘油的潜在发展前途。杜氏藻还是用来研究水生生物适应高盐环境机制的模式生物^[3], 澳大利亚、美国、日本、中国、以色列、西班牙、加拿大等相继开展了杜氏藻的形态、生理、生态和医学研究, 并已经投入生产和商业化运营^[4], 其中澳大利亚科研和生产规模居领先地位。中国具有漫长的海岸线和众多的内陆盐湖, 具有培养杜氏藻生产 β 胡萝卜素得天独厚的自然条件。作者综述了国内外有关学者在胁迫因子对杜氏藻生长和 β 胡萝卜素合成方面的研究方法、所用材料等最新的研究成果。

1 杜氏藻的形态、分类和生态分布

杜氏藻 (*Dunaliella*) 是由 Teodoresco 1905 年为纪念 Dunal 1837 年首次报道高盐水库中的红色是由一种微藻所产生的这一发现而命名的。其后有许多新的杜氏藻种类在世界各地被发现。杜氏藻细胞形状像衣藻 (*Chlamydomonas*), 通常为卵圆形, 当外界渗透压发生改变时, 可变为球形、梨形、纺锤形。它有两条等长的鞭毛和一个杯状叶绿体。在海生和高盐生种类中, 细胞中央含有一个造粉核。杜氏藻与衣藻的最大区别在于前者缺少细胞壁, 但具有由糖蛋白形成的包被。

杜氏藻属由于具有典型的衣藻类细胞结构, 因此被列为团藻目的 Polyblepharidaceae 科。Massyuk 1973 年对该属进行了修订, 并在属内定了 29 个种和许多变种。但 Ettl 后来又将其提升为新的目, 即杜氏藻目 (Dunaliellales)。杜氏藻种的命名

也存在一些混乱, 如 Amotz 和 Avron 发表的 *Dunaliella bardawil* 按照 Massyuk 的分类标准应该属于 *D. salina* Teod. 的一个品系, 因为该种的所有品系均可在极端条件下积累 β 胡萝卜素而使细胞呈橘红色。而 Amotz 等人称为 *D. salina* 的种应属于 *D. parva*, 因为该种仅积累少量的 β 胡萝卜素, 在极端条件下呈黄色。还有一些 *D. salina* 品系在一些实验室被称为 *D. viridis* 和 *D. parva*。由于种名的混乱, 许多研究者获得的数据无法进行比较。

杜氏藻的生活史中存在有性时代和无性时代^[3]。海产杜氏藻因种的不同, 耐盐范围从 0.5 ~ 5 mol/L NaCl; 对 pH 的忍耐范围也很宽, 从 pH 1 (*D. acidophila*) 到 pH 11 (*D. salina*)。杜氏藻属对其它环境因素的耐受能力也很强。在普通自然水体藻类区系组成中, 杜氏藻数量极少, 而在高盐水体中常常成为优势种群, 并可形成绿色或红色水华。因此, 杜氏藻通常是世界高盐湖泊和盐场蒸发池中第一生产者。在南极高盐湖泊和法国、罗马尼亚、意大利的一些盐湖, 美国的加州、犹他州的盐湖, 澳大利亚南部的艾瑞湖 (Lake Eyre), 埃及的某些湖泊, 克里米亚的盐湖以及中国沿海盐池及内陆盐湖等生长着许多种类的杜氏藻^[5]。

2 胁迫条件对杜氏藻细胞形态结构、生化组成和生长速度的影响

杜氏藻被转到高渗或低渗环境中, 细胞会迅速缩小或膨大, 直到胞内外渗透压达到平衡。将 *D. salina* 从 1.71 mol/L NaCl 中转入 3.42 mol/L 中, 细胞体积减小 1/3, 细胞膜发生折叠, 同时核、线粒体、叶绿

收稿日期: 2006 09 30; 修回日期: 2006 11 10

基金项目: 国家 863 计划资助项目 (863-819-04-10)

作者简介: 王培磊 (1966), 男, 山东临沂人, 副教授, 博士, 研究方向: 海洋微藻, 电话: 0539 2068903, E-mail: wpl660814@163.com

体的表面积均减小,这可能是由于膜系统与内质网进行了融合^[5]。将藻从盐度 24 转至盐度 5 的水环境中 2 min 内,细胞体积增大 50%。电子自旋共振法和电子显微镜观察发现,膜的扩张来源于胞内的囊泡膜。这一过程与低分子量(28~30 ku)的 GTP 结合蛋白有关^[6]。作者的试验表明,当杜氏藻从高盐直接转到低盐,盐度跨度超过 50 时,细胞即胀破,但如逐渐适应(降盐速度为 10/d),则能忍受盐度大幅变化(150)。较低的盐度有利于杜氏藻生长,但在大规模室外养殖时,低盐度也有利于原生动物和其它杂藻的繁衍,反而不利于杜氏藻生长,而且高盐度有利于 β -胡萝卜素的积累,故在生产上,在兼顾生长速度的前提下,尽可能采用较高盐度的培养基培养杜氏藻。Carlos 等^[6]研究了温度、盐度和氮盐对杜氏藻生长的影响,发现 30℃ 和 1 mol/L NaCl 盐度条件下杜氏藻生长最好;NaCl 超过 4 mol/L,细胞分裂速度和细胞密度均显著下降;低温会阻碍细胞分裂,但增加细胞的最大密度;色素产量随盐度增加而降低,但随温度升高而升高;氮盐浓度对生物量和色素产量有显著影响,但对细胞分裂速度影响甚微; NO_3^- 浓度为 5 mmol/L 时杜氏藻生长最好,而 NO_3^- 浓度过高(如 10 mmol/L)反而导致细胞密度和色素浓度下降。

氮盐种类和浓度是影响杜氏藻生长的另一重要因子。最好的氮源是 $\text{NO}_3^- \text{N}$, 最适生长浓度为 10 mmol/L^[7]。铵盐在高浓度或高温条件下,易对藻体产生毒性,引起藻体死亡。硝酸铵抑制 β -胡萝卜素的合成,导致培养液酸化,影响藻体的旺盛生长或引起藻体死亡。可用尿素代替硝酸盐,特别是用强缓冲能力的海水或卤水培养杜氏藻时效果为佳。氮浓度为 1 mmol/L 对积累 β -胡萝卜素最适宜。而郝建欣等的研究表明,氮浓度为 3 mmol/L 有利于藻细胞的增殖,而 0.59 mmol/L 有利于 β -胡萝卜素的积累。Uriarte^[8]指出,生长速度与氮盐浓度呈正相关;氮饥饿的细胞基本不生长,且在 3 d 内死亡;与高氮培养的细胞相比,低氮培养的细胞其体积和单细胞干质量均明显高于前者;向 $\text{NO}_3^- \text{N}$ 质量浓度为 353 $\mu\text{g/L}$ 的培养液中加入 187 $\mu\text{g/L}$ 的 $\text{NH}_4^+ \text{N}$ 后生长速度并没有明显提高;可利用氮盐增加后,单个细胞的蛋白质含量显著降低(从 20.1 $\mu\text{g/个}$ 降到 9.7 $\mu\text{g/个}$),而碳水化合物则显著提高(从 10.6 到 26.74 $\mu\text{g/个}$)。姜建国^[9]进行的营养动力学研究发现 N/P 比是影响杜氏藻生长的一个重要因素。他们认为,N/P 比为 25 时,杜氏藻的生长最佳;N/P 比值变化对甘油含量影响不大;N/P 比值小于 15 时,叶绿素含量随 N/P 比值的增加而增加,比值大于 15 时,叶绿素含量基本

不受 N/P 比值变化的影响。Berner^[10]研究了杜氏藻对强光适应的机制,指出杜氏藻对强光的适应,43%~49% 是归因于色素的变化,而 51%~57% 归因于包装效果;细胞大小对包装效果影响不大,而类囊体的堆积及类囊体膜的透明度是影响包装效果的重要因子;在光适应过程中,类囊体膜中蛋白质和脂类的比例常有变化,且这一变化影响叶绿体 a 对光的有效采收率。

Richard^[11]等进行的营养盐缺乏对杜氏藻光合作用的影响研究发现,在 N 和 P 都受限时,叶黄素对叶绿素 a 的比例增加;而只有在 P 受限时,新叶黄素对叶绿素 a 的比例才增加;N 受限时,保护性色素(胡萝卜素 α 和 β)对叶绿素 a 的比例增加;尽管色素成分不同,N 和 P 缺乏时,叶绿素 a 的特定光吸收指数差异不大,且大于营养饱和时的吸收指数;相比之下,光合作用光照反应曲线在营养缺乏的条件下呈下降趋势;在 N、P 缺乏的细胞中光合作用的最大量子指数有少许下降。Fuggi 等^[12]以 *D. acidophila* 为材料研究了溶液渗透压和溶质类型、浓度对杜氏藻生长的影响。试验表明,培养液中溶质类型对杜氏藻生长影响不大。Senje 等^[13]研究了铁饥饿、铁限制和铁饱和对细胞分裂周期、细胞大小、生长速度的影响及修复机制,结果显示,适宜于杜氏藻生长的铁质量浓度为 1.25~3.75 mg/L,高浓度的铁抑制杜氏藻生长。

3 胁迫条件对杜氏藻 β -胡萝卜素积累的影响

杜氏藻有很强的抗强光伤害能力,胡萝卜素含量很高的红色细胞光饱和点明显高于那些绿色细胞。大量积累的 β -胡萝卜素浓缩于脂肪球中,分散于叶绿体的类囊体间。关于胡萝卜素对光伤害所起的防护作用,一般认为是 β -胡萝卜素对光过度激发叶绿素而产生的有害物质——单态氧起的猝灭作用^[9]。杜氏藻中的 β -胡萝卜素主要有两种立体异构体,即全反式和 9 顺式(表 1)。Amotz 等^[14]研究了红、白、蓝三种不同光质对 *D. bardawil* 光防护能力的影响,结果显示,无论胡萝卜素含量高低,藻都不能抵御强红光的伤害,而在强蓝光下,细胞却可被保护,白光介于二者之间。这一结果说明大量积累在杜氏藻中的胡萝卜素主要起光过滤屏蔽作用,它吸收过量的蓝光,防止光伤害作用的发生。研究还发现 β -胡萝卜素,特别是其中的 9 顺式异构体可优先于叶绿素被光漂白(photobleaching),从而使叶绿素免受强光的漂白。Borrowiska 等^[15]的研究表明, β -胡萝卜素的合成在细胞中还有碳库的作用。

表 1 *D. salina* 中 β -胡萝卜素立体异构体分析^[15]

异构体	占总 β -胡萝卜素的质量分数 (%)
15 顺 β 胡萝卜素	10
9 顺 β 胡萝卜素	41
全反式 β 胡萝卜素	42
2 种未确定异构体	6

研究者普遍认为,三高一低(高光照、高盐度、高温、低营养盐特别是低氮)有利于 β -胡萝卜素的合成^[12, 16]。高盐胁迫可诱导杜氏藻合成胡萝卜素。将 *D. salina* 从 15% NaCl 中移到 25% NaCl 中,经过 4~5 d,细胞蛋白质中总胡萝卜素质量比从不足 10 mg/g 增加到 260 mg/g,主要是 β 胡萝卜素含量的增加^[20]。它在总胡萝卜素中所占比例从 50% 增加到 90%,其它类胡萝卜素的增加并不明显。与甘油积累不同,当积累了 β -胡萝卜素的细胞从高渗环境转回低渗环境时,胡萝卜素含量的下降与高盐下的快速积累相比是很缓慢的。这一特性也不同于血球藻 (*Haematococcus*),后者积累的类胡萝卜素可迅速分解。Borowitzka^[15] 试验也表明,较高的盐度(大于 20)有利于 β -胡萝卜素的积累。作者以 *Dunaliella salina* 为材料进行的试验表明,在 60~180 的盐度范围内,单位体积藻液的 β 胡萝卜素含量随盐度升高而下降,而单个细胞的 β 胡萝卜素含量随盐度上升而上升。

营养盐缺乏对藻类合成类胡萝卜素有促进作用,尤其是氮缺乏时更明显。陈晗华^[17] 研究认为,杜氏藻生长最适的营养盐质量浓度为氮 1 m mol/L,磷 0.3 m mol/L;而细胞个体积累 β -胡萝卜素的最适条件是无氮、无磷,经 10 d 培养,其 β -胡萝卜素含量分别达 11.24 $\mu\text{g}/\text{个}$ 和 10.28 $\mu\text{g}/\text{个}$ 。杜氏藻缺氮时其 β -胡萝卜素积累增加。硫酸盐的缺乏也会使细胞停止生长并刺激 β -胡萝卜素的积累。重金属 Cu、Pb 达到 *D. salina* 半致死浓度时,也有促进 β -胡萝卜素积累的作用。一般来说,在生长速度较低的亚适生长条件下,胡萝卜素积累量最大^[18]。

温度是影响 β -胡萝卜素合成的一个极重要的因子。Sandra 等^[9] 指出,温度从 34 $^{\circ}\text{C}$ 降到 17 $^{\circ}\text{C}$, α 胡萝卜素的含量增加了 7.5 倍,而 β -胡萝卜素含量不变;温度的降低对 α 胡萝卜素的成分无影响。而 Amotz 等^[20] 研究了低温对杜氏藻合成的胡萝卜素成分的影响,认为从 30 $^{\circ}\text{C}$ 下降到 10 $^{\circ}\text{C}$, β 胡萝卜素的合成量增加了 2 倍,9 顺式 β 胡萝卜素对全反式 β 胡萝卜素的比例增加了 4 倍,而其它色素含量不变;温度变化所引起的 β 胡萝卜素的变化同培养所用的光照也有关系; β 胡萝卜素小球内 9 顺式异构体的大量积

累被认为是用来抵抗低温时全反式异构体的结晶化。

光是影响杜氏藻生产 β -胡萝卜素最重要的因子之一。实验表明^[21],杜氏藻光补偿点为 30 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光饱和点为 600 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。600 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 以上的强光对杜氏藻生长不利,但有利于 β -胡萝卜素积累。Amotz 等^[14] 研究了光谱(波长)对杜氏藻胡萝卜素积累的影响,指出杜氏藻在强光照条件下才大量积累 β 胡萝卜素;该胡萝卜素主要由 9 顺式与全反式异构体 β 胡萝卜素组成;9 顺式与全反式异构体的比例和 β -胡萝卜素积累主要取决于光强而与光质(光谱)无关;细胞生长在连续红光(大于 645 nm)或白光(500 W/ m^2)时, β -胡萝卜素含量为 32 $\mu\text{g}/\text{个}$,而在红光或白光的低光照(25 W/ m^2)时, β -胡萝卜素才为 3 $\mu\text{g}/\text{个}$,其中 9 顺式与全反式异构体的比例为 0.3:1。N/P 比为影响杜氏藻生长及甘油和色素积累另一重要因子。姜建国^[9] 报道,单细胞 β -胡萝卜素含量随 N/P 比值的增加而减少,而单位体积培养液中的 β -胡萝卜素含量在比值小于 15 时基本不受影响,比值大于 15 时,则 N/P 比值越高, β -胡萝卜素含量越低。

收获时间对 β -胡萝卜素产量有不可忽视的作用。Nellis^[22] 研究表明,藻液中的 β -胡萝卜素含量不随硝酸盐浓度的改变而有显著改变,但受盐度和采收时间影响显著。而 Johan^[23] 的试验也有类似的结果。他认为培养时间极为重要,较长的时间会导致产生较大的细胞,其中含有高含量的 β -胡萝卜素,采收时间的重要性甚至大于光照和营养盐含量。 β -胡萝卜素的日积累量在接种后逐渐增加,第 7 天达高峰后逐渐下降,这与细胞密度的上升和培养基老化有关。实验还发现杜氏藻密度增至一定程度,生长受抑制时, β -胡萝卜素才大量积累^[9]。作者试验中也发现 β -胡萝卜素的积累是个时间很长的过程(16~24 d),但实际生产一般以 5~7 d 为一个生产周期。杜氏藻不同品系对环境条件要求不同。一些环境因子在影响 β -胡萝卜素合成方面还有交互作用,包括累加、协同和拮抗作用。Amotz 等^[14] 的研究表明盐度和光照在控制 β -胡萝卜素合成方面有累加作用。Chor^[23] 认为强光照和低氮组合能刺激 β -胡萝卜素的积累。王勇等^[24] 试验认为:盐度、温度和光强三因子对杜氏藻积累 β -胡萝卜素有很强的协同胁迫作用;光强 10 000lx、盐度 18、温度 25 $^{\circ}\text{C}$ 是较适宜的 β -胡萝卜素综合胁迫条件。

4 杜氏藻的功用

4.1 培养杜氏藻生产 β -胡萝卜素

β -胡萝卜素是一种橙黄色色素,广泛存在于植物

中,是类胡萝卜素的一种,其化学组成为碳氢化合物,极易被氧化。组织学研究表明, β -胡萝卜素有很强的抑制肿瘤转化作用;动物试验也表明,饲料中加入 β -胡萝卜素可明显减少紫外光和化学肿瘤促进剂,如二甲基苯叉蒽(DMDM)和1,2-二甲基肼(DMH)诱发的癌变^[25]。胡萝卜素对多种移植肿瘤也有抑制作用;在肿瘤的治疗和化疗过程中, β -胡萝卜素可降低毒害作用,增强治疗效果。 β -胡萝卜素分子中含有多个共轭双键而成为一种良好的抗氧化剂。它可提高机体的解毒功能,抑制致癌物质的活性。 β -胡萝卜素具有抗癌功效的机理之一是它可提高宿主的免疫功能^[26]。实验证明, β -胡萝卜素可促进吞噬细胞和淋巴细胞的功能,并可促进细胞释放一些抗肿瘤因子。 β -胡萝卜素对眼睛白内障和黄斑变性病以及心脑血管病也有一定的防护作用^[27]。

4.2 用杜氏藻生产甘油

甘油是重要的有机化工原料,目前主要从石油中提取,售价3~5美元/kg。但随石油资源的耗尽,其价格不断上涨,利用杜氏藻生产甘油具有潜在的发展前景。综合提取胡萝卜素和甘油,可使甘油生产成本降至0.752美元/kg,低于石油生产甘油的成本(0.88美元/kg,2003年价格)^[27]。但这一计算是在理想状态下进行的,目前从杜氏藻提取甘油在经济上还不划算。

4.3 用作单细胞蛋白饲料

除了 β -胡萝卜素和甘油外,杜氏藻还含有约40%的蛋白质,其氨基酸组成与植物蛋白相似,可用作动物饲料蛋白源。杜氏藻在适宜的条件下具有很高的生物量产量,最高可达30~40g/(m²·d),大规模生产的平均水平亦可达到15~25g/(m²·d),高于大多数其它藻类的产量^[29]。杜氏藻还含较高的维生素C、E及其它维生素,可用作维生素的来源。总之,因杜氏藻含有各种丰富的营养成分,可大量培养作为优良的水产饲料。另外,杜氏藻有很宽的盐度适应范围,*D. salina*可在10~350的盐度范围内生长,是自然界最耐盐的真核生物,可作为研究生物体对高渗环境适应机制的模式生物^[30]。

5 杜氏藻研究开发应用前景及需要解决的问题

早在1966年,Massyuk^[31]就提出可大规模培养杜氏藻用以提取 β -胡萝卜素。另外,杜氏藻可以在高盐的极端环境下生长,较易控制其它藻类和原生动物造成的污染,可进行大规模的室外培养。 β -胡萝卜素越来越多的医疗功能正在被发现,国内和国际市

场对杜氏藻产品的需求也在不断扩大。目前国内 β -胡萝卜素的市场价格为合成的1.1万元/kg左右,天然的1.8万元/kg左右。国际上天然 β -胡萝卜素的价格也是合成的2倍左右,但天然 β -胡萝卜素只占 β -胡萝卜素总产量的5%~6%。国内对 β -胡萝卜素的年需求量约900t,全世界年需求量在2500t,年销售额为5~6亿美元(2003年),且每年以7%~10%的速度递增,因此养殖杜氏藻生产 β -胡萝卜素产业发展空间极大。那些靠近盐湖或海边的具有强烈光辐射的干旱、沙漠地区可作为杜氏藻培养的场地,有利于 β -胡萝卜素的积累。目前中国的杜氏藻养殖主要集中在内蒙、天津、甘肃等地。在杜氏藻研究和生产中,以下问题尚待解决:

(1) 培养杜氏藻的目的不在于获取大量的生物量,而在于获得 β -胡萝卜素。有利于杜氏藻积累 β -胡萝卜素的高盐、高光照、低氮均是不利于藻生长的条件。综合考虑温度、光谱、光强、盐度、营养盐、CO₂、pH值、水深、养殖面积等环境因子对生长二阶段的不同影响,将计算机技术引入杜氏藻培养过程,用计算机对众多的环境因子进行综合分析和监控,是杜氏藻研究和开发的一个必然方向。

(2) 目前应用于生产的杜氏藻仅是*D. salina*和*D. bardawil*,因为这两种藻可积累较高的 β -胡萝卜素。利用不同种类、不同品系甚至同一品系不同藻株及个体在形态结构、生化组成、生态要求、生长速度、 β -胡萝卜素产量均有差别的特点,使用选择育种或紫外线、X射线或化学诱变剂处理藻液,筛选出个体大、生长快、 β -胡萝卜素含量高、抗逆性强、上浮性好的突变株用作藻种,是提高 β -胡萝卜素产量的关键技术之一。

(3) 深入研究不同种类、不同生长阶段的杜氏藻对各种营养盐(N、P、C、Fe)的吸收机制(饱和吸收量、最适需要量、喜好程度、吸收先后顺序、肥效持续时间等),这方面尚待进一步系统和深入研究。

(4) 杜氏藻的收获是生产上的一个难题。一般生产所得藻密度较低(30~60万个/mL),且藻体小,脆弱,易损伤破裂,用常规的动力离心、过滤及自然沉淀法均不能有效收集。其它一些收获技术,如高压过滤法、上浮收集法、碱絮凝法、趋光性收集法、硅化玻璃珠吸附法、微气泡悬浮法等^[34]已被开发出来,但到目前为止尚无理想的收获工艺。

(5) 理顺杜氏藻的分类,探索 β -胡萝卜素新的生物学及医学功效,优化 β -胡萝卜素提取工艺,藻产品的深加工,杜氏藻室外水泥池大规模开放培养过程中防治大变形虫(*A. moeba proteus*)、丰年虫(*Chiroceph-*

alus nankinensis)、脊尾白虾(*Exopalaemon carincauda*)等造成的污染等方面还有不少工作要做。

参考文献:

- [1] Amotz A B, Avron M. The wavelength dependence of massive carotene synthesis in *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae) [J]. **Phycologia**, 1989, 25: 175-178.
- [2] Tan C K, Lee Y K. Effect of light intensity and ammonium N on carotenogenesis of *Trentepohlia odorata* and *Dunaliella bardawil* [J]. **Journal of Applied Phycology**, 1993, 5: 547-549.
- [3] Mendoza H, Ramazanov Z. Low temperature induced β -carotene and fatty acid synthesis, and ultrastructural reorganization of the chloroplast in *Dunaliella salina* (Chlorophyta) [J]. **European Phycology**, 1996, 31: 329-331.
- [4] Lu S, Zhang X N, Li P Y, et al. A salt-induced chloroplast protein in *Dunaliella salina* (Chlorophyta) [J]. **Phycology**, 1996, 32: 983-986.
- [5] 郝建欣, 孙玉, 丛威. 杜氏藻生长过程中氮磷利用与色素积累[J]. 海洋科学, 2003, 27(2): 41-47.
- [6] Carlos J, Niell F X. Growth of *Dunaliella viridis* Teodoresco: effect of salinity, temperature and nitrogen concentration [J]. **Journal of Applied Phycology**, 1991, 3: 319-327.
- [7] Sosik H M, Mitchell B G. Effects of temperature on growth, light absorption, and quantum yield in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) [J]. **Phycologia**, 1994, 30: 833-840.
- [8] Uriarte I, Bayne B L. Cell characteristics and biochemical composition of *Dunaliella primolecta* Butcher conditioned at different concentrations of dissolved nitrogen [J]. **Journal of Applied Phycology**, 1993, 5: 447-453.
- [9] 姜建国, 姚汝华. 氮磷比对杜氏藻生长及甘油和色素积累的影响[J]. 热带海洋, 1999, 18(1): 68-72.
- [10] Berner T, Dubinsky Z. Photoadaptation and the "package" effect in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) [J]. **Phycologia**, 1989, 25: 70-78.
- [11] Kelly A B, Dodge J D. Effects of chronic salt stress on the ultrastructure of *Dunaliella bioculata* (Chlorophyta, Volvocales): mechanisms of response and recovery [J]. **European Phycology**, 1999, 34: 117-123.
- [12] Fuggi A, Pollio A. Effects of NaCl, Na₂SO₄, H₂SO₄ and glucose on growth, photosynthesis, and respiration in the acidophilic alga *Dunaliella acidophila* [J]. **Phycologia**, 1988, 27(3): 334-339.
- [13] Senjie L, Gobler C J. Cytological and biochemical responses of *Dunaliella tertiolecta* (Volvocales, Chlorophyta) to iron stress [J]. **Phycologia**, 2001, 40(5): 403-410.
- [14] Amotz A B. New mode of *Dunaliella* biotechnology: two phase growth for β -carotene production [J]. **Journal of Applied Phycology**, 1995, 7: 65-68.
- [15] Borowitzka L J, Borowitzka M A. Mass culture of *Dunaliella*: from laboratory to pilot plant [J]. **Hydrobiologia**, 1984, 116: 115-121.
- [16] 陈晗华, 钱凯先. 氮磷比对杜氏藻生长及其 β -胡萝卜素积累的影响[J]. 浙江大学学报, 1997, 31(6): 732-735.
- [17] Borowitzka L J, Borowitzka M A. Mass culture of *Dunaliella*: from laboratory to pilot plant [J]. **Hydrobiologia**, 1984, 116: 115-121.
- [18] Giordano M. Organic carbon release by *Dunaliella salina* (Chlorophyta) under different growth conditions of CO₂, nitrogen, and salinity [J]. **Phycologia**, 1994, 30: 249-257.
- [19] 刘建国, 吴超元. 杜氏藻和 β -胡萝卜素研究述评[J]. 海洋与湖沼, 1995, 26(3): 323-328.
- [20] Francisco J L. Effects of light intensity, CO₂ and nitrogen supply on lipid class composition of *Dunaliella viridis* [J]. **Journal of Applied Phycology**, 1998, 10: 135-144.
- [21] Carlos J, Niell F X. Influence of temperature and nitrogen concentration on photosynthesis of *Dunaliella viridis* Teodoresco [J]. **Journal of Applied Phycology**, 1990, 2: 309-317.

(下转第95页)

- [22] Amotz A B. Effect of low temperature on the stereoisomer composition of β -carotene in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil* (Chlorophyta) [J]. **Phycology**, 1996, 32: 272-275.
- [23] Graziano L M , Roche J L. Physiological responses to phosphorus limitation in batch and steady-state cultures of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta): a unique stress protein as an indicator of phosphate deficiency [J]. **Phycologia**, 1996, 32: 825-838.
- [24] Geider R J, Macintyre H L. Responses of the photosynthetic apparatus of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to nitrogen and phosphorus limitation [J]. **Phycology**, 1998, 33: 315-332.
- [25] Roche J L, Harrison W G. Reversible kinetic model for the short-term regulation of methylammonium uptake in two phytoplankton species, *Dunaliellateriolecta* (Chlorophyceae) and *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) [J]. **Phycology**, 1989, 25: 36-48.
- [26] Cifuentes A S, Mariela A. Reappraisal of physiological attributes of nine strains of *Dunaliella* (Chlorophyceae): growth and pigment content across salinity gradient [J]. **Phycologia**, 2001, 37: 334-344.
- [27] Roche J L, Bertrand A M. Light intensity-induced changes in cab mRNA and light harvesting complex II apoprotein levels in the unicellular Chlorophyte *Dunaliella tertiolecta* [J]. **Plant Physiology**, 1991, 97: 147-153.
- [28] Gerhard E, Gimmler H. The glycerol permeability of the plasmalemma of the halotolerant green alga *Dunaliella parva* (Volvocales) [J]. **Phycology**, 1980, 16: 524-532.
- [29] Orset S. Low-temperature induced synthesis of α -carotene in the microalga *Dunaliella salina* (Chlorophyta) [J]. **Phycologia**, 1999, 35: 520-527.
- [30] Powtongsook S. Isolation and characterization of *Dunaliella salina* from Thailand [J]. **Journal of Applied Phycology**, 1995, 7: 75-76.
- [31] Hard B C, Gilmour D J. A mutant of *Dunaliella parva* CCAP 19/9 leaking large amounts of glycerol into the medium [J]. **Journal of Applied Phycology**, 1991, 3: 367-372.
- [32] Giordano A. Adaptation of *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyceae) to growth on NH_4^+ as the sole nitrogen source [J]. **Phycologia**, 1997, 36 (5): 345-350.
- [33] Huber M E, Lewin R A. Ethanol induced flagellar autotomy in *Dunaliella tertiolecta* Butcher [J]. **Phycologia**, 1987, 26 (1): 138-151.
- [34] Grobbelar J U. Influence of areal density on β -carotene production by *Dunaliella salina* [J]. **Journal of Applied Phycology**, 1995, 7: 69-73.