

无机碳与雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 细胞调节物质*

刘建国 孙艳妮 殷明焱 刘伟 张展

(中国科学院海洋研究所海洋生物技术研究发展中心 青岛 266071)

提要 以单细胞雨生红球藻为材料,采用酸碱滴定和 CO_2 加富通气培养微藻的方法,对旧液中 HCO_3^- 和 CO_3^{2-} 浓度变化以及对红球藻细胞生长的影响进行了研究。结果表明,旧液具有限制红球藻细胞生长和诱导细胞转化的作用。同时,旧液中无机碳离子浓度明显高于新液。培养液中富含 CO_3^{2-} 时,各细胞数量与 CO_3^{2-} 浓度呈正相关,相关系数为 0.88。溶液中仅有 HCO_3^- 时,各细胞数与 HCO_3^- 浓度也呈正相关性。因此,排除了 CO_3^{2-} 和 HCO_3^- 作为旧液中的调节物质,限制红球藻细胞生长和诱导细胞转化的可能性。旧液乙酸乙酯提取物生物检测实验表明,在粗提取物中有降低细胞增长和诱导细胞转化的活性,表明调节物质能溶于有机相,也反过来证实无机碳离子不是旧液中的调节物质。DNA 含量和倍性分析结果表明,红球藻游动细胞 DNA 复制可以加倍后不经过原生质分裂就可以再次进行,因此推测旧液中的调节物质对原生质分裂过程产生抑制作用,而不对 DNA 复制过程产生抑制作用。

关键词 雨生红球藻,粗提取物,调节物质, CO_3^{2-} , HCO_3^-

中图分类号 Q28

虾青素在食品、医药和水产饲料中具有很大的开发潜力。利用雨生红球藻生产虾青素是近年来微藻领域中倍受关注的热点问题。稳定快速的细胞培养是关键生产技术,目前还有待进一步提高。作者认为,光、温、pH、盐度和矿物质营养等传统的常规因子影响着红球藻细胞生长、转化和虾青素累积(刘建国等,2000a, b),除此之外其它因素也发挥作用,应当引起重视。例如,张展等(2003)证实细胞高密度诱导红球藻细胞产生两种完全不同的适应机制,并对红球藻细胞生长产生影响。孙艳妮等(2001)也证实红球藻旧液(指曾培养过红球藻耗掉营养的旧溶液,重新添加营养后配制的培养液的简称)中确实存在降低游动细胞生长并促使游动细胞向不动细胞转化的调节物质。

那么,究竟旧液中调节物质是什么? 又是怎

样产生的? 是细胞本身产生并释放到培养液中的? 还是细胞代谢活动,导致培养水体发生某些物理化学反应,反应产物进一步对红球藻细胞产生间接影响? 目前尚不明确。Mandalam 等(1995)发现小球藻旧液中 HCO_3^- 增加,认为 HCO_3^- 抑制了小球藻原生质分裂,降低了细胞生长。作者也注意到,红球藻培养过程中 pH 常常发生很大变化。pH 变化确实导致溶液中 CO_2 、 HCO_3^- 和 CO_3^{2-} 平衡体系发生变动。那么,是否无机碳离子作为调节物质,在红球藻细胞周期和生长过程中发挥调节作用? 作者结合 CO_2 加富通气培养结果,以及不同培养条件下 HCO_3^- 和 CO_3^{2-} 与红球藻游动细胞、不动细胞和总细胞数相关性结果,加之利用有机溶剂粗提取物的生物检测的反证实验,对无机碳作为红球藻调节物质的可能性予以探讨,旨在为工程培养红球藻,大量生产虾

* 国家自然科学基金资助项目,39500114 号,39970575 号;国际科学基金项目(IFS)资助,A/2786-2 号;国家农业成果转化基金资助项目,02EFN216601213 号;中国科学院知识创新重要方向项目,L48032409D 号;中国科学院海洋研究所创新项目,L86032523 号。刘建国,博士,研究员,E-mail:jgliu@ms.qdio.ac.cn

收稿日期:2003-12-01,收修改稿日期:2004-05-12

青素奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验藻种和培养方法

雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 为本实验室的 H₀ 品系,原种来自中国科学院水生生物研究所微藻生物种质库。

培养液按 MCM 为基础的修正配方(张京浦等, 1994)配制。以蒸馏水配制的新鲜培养液简称为新液。将静置培养雨生红球藻一段时间的藻液经 4000r/m 离心 5min, 上清液中加入与新液等量营养盐, 这种以藻处理过的旧溶液配制的培养液简称为旧液。

重新接种以游动细胞为主(90%左右)的红球藻于上述新、旧液中, 在人工光照[光强为 400 μ E/(m²·s); 光照时间为 14h] 和室温条件下, 根据不同的实验目的, 进行静置或通气培养。定期采样, 显微观察细胞生长和无机碳的变化。

1.2 细胞数量的测定

在培养期间定时取样, 血球计数板显微计数。观测游动细胞、不动细胞和总细胞的数目变化。实验至少有 2 组以上重复。在每组中细胞显微计数 16 次。

1.3 培养液中 CO₃²⁻、HCO₃⁻ 浓度分析

培养液中的 CO₃²⁻、HCO₃⁻ 浓度采用黄祥飞(1999)酸碱滴定的修正方法测定和计算。

1.4 旧液中调节物质粗提方法

取等体积的低密度(4 × 10⁵ 个细胞/ml)和高密度(1.3 × 10⁶ 个细胞/ml)红球藻的旧液(分别称为低旧液和高旧液), 离心去掉藻泥, 上清液用滤纸过滤, 用盐酸将过滤液调 pH 至 2—3。按每 1000ml 过滤液中加入 80ml 乙酸乙酯的比例连续提取 3 次, 40℃ 旋转蒸发提取液, 除去乙酸乙酯, 获得棕黄色粗提取物。二甲基亚砜溶解该粗提取物, 添加到新接种的红球藻游动细胞藻液中, 以添加相应浓度二甲基亚砜的藻液为对照, 在 CO₂ 加富通气条件下培养, 观察乙酸乙酯粗提取物对红球藻生长的影响。

1.5 DNA 提取和测定

细胞计数后的红球藻经 4000r/m 离心 5min, 蒸馏水悬浮藻泥于 Eppendorff 管中, 12000r/min 离心 5min, 同样方法水洗藻泥 3 次。加 10% 蛋白酶 K 和 5% 巯基乙醇(V/V), 冻融 4 次。再加 1ml 裂解液混匀, 37℃ 静置 1h。14000r/min 低温离心

20min, 向上清中加入等体积的苯酚, 混匀抽提蛋白。14000r/min 低温离心 20min, 向上清中加等体积的氯仿-异戊醇(24: 1), 轻轻摇动混合。14000r/min 低温离心 20min, 上清中加入 0.1 体积 3mol/L 醋酸钠和 0.7 体积异丙醇, 混匀后过夜沉淀 DNA。14000r/min 低温离心 20min, 弃去上清。用 75% 的乙醇 200 μ l 将 DNA 洗 2 次, 真空抽干, 加适量 ET 溶解 DNA, 用紫外分光光度计测 DNA 含量。

1.6 细胞流式仪 DNA 相对倍性测定

红球藻培养液 4000r/min 离心 5min, 加 1ml 冰预冷乙醇悬浮藻泥, 4℃ 保存 48h。1500r/min 离心 10min, 加 1ml 甲醇悬浮沉淀, 室温下静置 45min, 1500r/min 离心 10min, PBS 溶液冲洗后重新离心, 最后悬浮细胞于 1ml PBS 溶液中。

加 1ml DAPI 染色剂于上述溶液中染色, 染色细胞通过细胞流式仪测定 DNA 相对含量, 每次测定 6000 个细胞以上。

2 结果与讨论

2.1 CO₂ 加富通气培养条件下, 旧液对红球藻生长的抑制作用

CO₂ 加富通气培养条件下, 旧液中红球藻无论总细胞量还是游动细胞的数量都较对对照明显低(表 1), 特别是在实验后期, 旧液中红球藻总细胞量只有新液的 55% 左右, 而游动细胞仅有 30% 左右。表明旧液中确实存在着抑制红球藻细胞生长的调节物质, 并且该物质是通过抑制游动细胞生长, 实现对总细胞数量增加产生抑制的。

在 CO₂ 加富通气条件下, 从旧液中红球藻不动细胞相对变化分析, 旧液不仅没有降低不动细胞数量, 相反明显有利于不动细胞形成。由于不动细胞分裂速度很慢, 主要是通过游动细胞转化形成的(刘建国等, 2000a), 因此本结果表明旧液中的调节物质有促进红球藻不动细胞形成作用。

上述 CO₂ 加富通气培养结果, 与孙艳妮等(2001)通空气培养红球藻所获得的结果完全一致。即旧液中的调节物质可降低游动细胞生长, 并诱导游动细胞向不动细胞转化是完全一致的。

究竟旧液中的什么物质对红球藻细胞产生了影响, 目前还不清楚。Pratt(1942, 1944)、Pratt 等(1940, 1945)对小球藻培养旧液进行研究, 发现该藻生长过程中能产生一种可以抑制本身细胞生长的热敏物质, 并定义为小球藻素。而 Mandalam 等(1995)对小球藻进行的研究并不支持存在小球

表1 CO₂ 加富培养条件下,旧液中红球藻总细胞、游动细胞和不动细胞数量
较对照组(新液)中的相对变化(%)

Tab.1 Relative content (%) of total cells, motile cells and non-motile cells in *H. pluvialis* inoculated in old culture supernatant (with same level of nutrients) compared to the fresh medium (Culture was stirred by bubbling CO₂ enriched air during experimental periods)

项目		培养时间(d)						
		1	2	3	4	5	6	7
细胞总数	对照	100	100	100	100	100	100	100
	旧液	100	105.8	80.9	47.9	62.8	56.2	57.4
游动细胞数	对照	100	100	100	100	100	100	100
	旧液	100	95.7	72.9	35.3	46.3	37.0	30.8
不动细胞数	对照	100	100	100	100	100	100	100
	旧液	100	1050	800	1733	1150	1452	572

藻素的观点,认为是旧液中过高的 HCO₃⁻ 导致细胞分裂受阻,旧液中小球藻较新液 DNA 倍性加大,较早出现 2 或 4 倍 DNA 的细胞,而且随后有不断增多的趋势,尤其是 4 倍 DNA 的细胞不断增多。为此,有必要了解红球藻旧液中无机碳状况及其与红球藻细胞生长之间的关系。

2.2 旧液中 CO₃²⁻、HCO₃⁻ 变化和红球藻 DNA 状况

表 2 示红球藻静置培养过程中,新、旧液中 HCO₃⁻ 和 CO₃²⁻ 含量变化。结果显示新液中 HCO₃⁻ 和 CO₃²⁻ 浓度都较低,而旧液中上述离子浓度比较高。旧液中的无机碳浓度始终都高于对照组的。这同 Mandalam 等(1995)对旧液中小球藻分析结果类似。那么,红球藻细胞是否也出现 2 倍和 4 倍 DNA 现象?

表 2 主要无机碳在红球藻旧液和新液中的含量(mmol/L)

Tab.2 Concentration changes (mmol/L) of main inorganic carbon in *H. pluvialis* inoculated in fresh medium and in old culture

项目		培养时间(d)							
		0	1	2	3	4	5	6	7
HCO ₃ ⁻	旧液	6.95	6.69	4.96	3.15	2.12	2.33	2.48	2.45
	新液	0.30	0.53	0.43	0.61	0.67	0.77	0.59	0.89
CO ₃ ²⁻	旧液	0.00	0.25	0.94	1.92	2.43	2.42	2.28	2.20
	新液	0.00	0.00	0.10	0.08	0.08	0.09	0.21	0.13

利用紫外光谱法测绘的 DNA 含量表明,从不动细胞刚刚释放出的游动细胞 DNA 含量较低,为 6.2×10^{-12} g。经过一段时间培养后,游动细胞 DNA 含量升高,其量大约是刚释放游动细胞 DNA 含量的 3—5 倍。上午 11:00 左右,细胞分裂完成,新的游动细胞形成,这时 DNA 含量较低。晚上部分游动细胞处于待分裂状态,DNA 平均含量

大约为上午细胞的 1.5 倍。

细胞流式仪测量红球藻游动细胞 DNA 倍性也表明,上午 11:00 游动细胞有两个吸收峰,分别在 55 和 110 左右(图 1a),说明此时的细胞有两种类型,部分刚刚释放出来的细胞 DNA 含量低,是没有进行细胞分裂的一半。而晚上 9:00 的游动细胞只测到一个峰,大约在 110(图 1b),与上面没

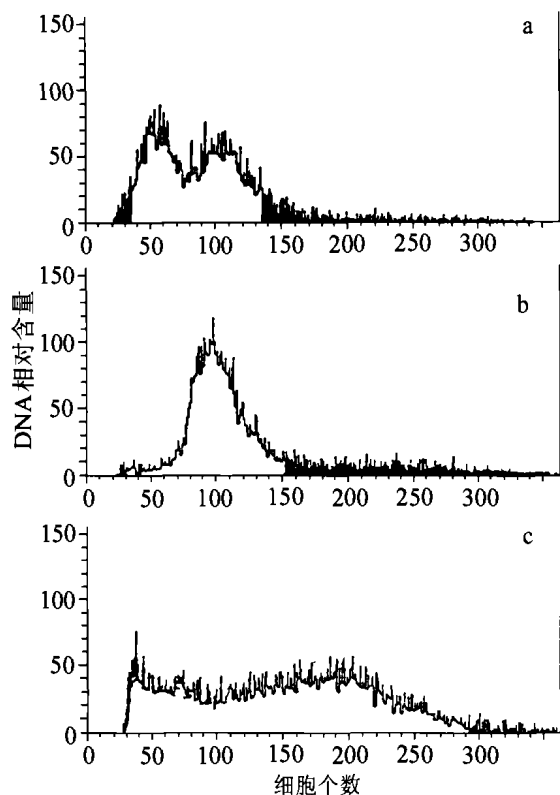


图1 红球藻游动细胞的DNA倍性图谱

Fig. 1 The DNA histograms of *H. pluvialis* motile cells

- a. 上午11:00的游动细胞; b. 晚上9:00的游动细胞;
c. 在旧液培养较长时间的游动细胞

有分裂的细胞一致,此时的细胞大部分处于待分裂状态。但是在培养时间较长、pH较高的旧液中,测到的游动细胞DNA倍性图谱没有明显的

峰,表明DNA分布十分分散,其中有的细胞DNA高达290(图1c)。如果假定细胞DNA量值55为单倍,那么红球藻游动细胞的DNA倍性至少在1—4倍之间。

上述DNA含量和倍性实验进一步印证:红球藻DNA在加倍后不经过原生质分裂就可以再次进行DNA复制。在DNA复制顺畅而细胞质分裂受阻这一点上,作者的结果与Mandalam等(1995)对小球藻的分析结果也是一致的。

尽管如此,旧液中无机碳含量高和旧液抑制红球藻生长之间的关系如何,即 HCO_3^- 或 CO_3^{2-} 是否如上面小球藻部分所述,就是红球藻生长抑制物或诱导不动细胞转化物质?还需要进一步分析静置、通气 and CO_2 加富通气培养时,新、旧液中 CO_3^{2-} 、 HCO_3^- 和 CO_2 浓度变化与红球藻游动细胞、不动细胞和总细胞的相互关系,才能确定。

2.3 CO_3^{2-} 与红球藻各细胞指标间的关系

尽管在静置培养条件下,新液中 CO_3^{2-} 浓度与红球藻细胞总数、游动细胞数和不动细胞数都呈线性负相关(表3),但这不表明 CO_3^{2-} 可能是抑制红球藻细胞生长的物质。因为旧液中 CO_3^{2-} 浓度与红球藻细胞总数、游动细胞数和不动细胞数都呈线性正相关,其中以细胞总数与 CO_3^{2-} 浓度相关系数最大,为0.88。上述静置培养条件下的结果表明:旧液中 CO_3^{2-} 增加有利于红球藻细胞数量增加,因此不可能是旧液中抑制红球藻细胞生长的物质。

表3 静止条件下,新液和旧液中的各细胞数与 CO_3^{2-} 浓度之间的线性关系

Tab. 3 Relationship between each type of cells and the CO_3^{2-} concentration of fresh and old culture medium in static culture of *H. pluvialis*

细胞数($10^4/\text{ml}$)	新液		旧液	
	线性方程式	相关系数 R^2	线性方程式	相关系数 R^2
总细胞数	$Y = -20.726X + 12.013$	0.382	$Y = 3.2544X + 12.414$	0.881
游动细胞数	$Y = -17.356X + 11.059$	0.331	$Y = 1.8015X + 11.599$	0.442
不动细胞数	$Y = -3.3694X + 0.9531$	0.409	$Y = 1.4529X + 0.8158$	0.567

注:式中Y为细胞数,X为 CO_3^{2-} 浓度(mmol/L)

通气培养的条件下,新液中 CO_3^{2-} 浓度很低,几乎为0,各细胞指标变化与 CO_3^{2-} 浓度基本没有相关性。而通气培养的条件下的旧液中,各细胞

指标变化都与 CO_3^{2-} 浓度呈线性正相关性(表4),进一步表明旧液中 CO_3^{2-} 不是旧液中抑制红球藻细胞生长的物质。

表 4 通气条件下,旧液中的各细胞数和 CO_3^{2-} 浓度之间的线性关系Tab. 4 Relationship between each type of cells and the CO_3^{2-} concentration of old culture medium in aerated culture of *H. pluvialis*

细胞数($10^4/\text{ml}$)	线性方程式	相关系数 R^2
总细胞数	$Y = 18.086X + 9.6962$	0.787
游动细胞	$Y = 10.788X + 10.169$	0.762
不动细胞	$Y = 7.2512X - 0.4601$	0.766

注:式中 Y 为细胞数, X 为 CO_3^{2-} 浓度(mmol/L)

CO_2 加富通气培养时,无论新液还是旧液中 CO_3^{2-} 浓度很低,几乎没有(结果未列出)。因此,红球藻细胞生长与 CO_3^{2-} 基本无关。

综上所述, CO_3^{2-} 本身没有抑制细胞生长的作用。相反作为无机碳源(特别是旧液中的 CO_3^{2-}) 在一定程度上有利于红球藻细胞生长。因此,

CO_3^{2-} 不可能是调节红球藻细胞生长的调节物质。

2.4 HCO_3^- 与红球藻各细胞指标间的关系

静置条件下,新、旧液中 HCO_3^- 浓度与红球藻细胞总数、游动细胞数目和不动细胞数目关系如表 5 所示。

表 5 静止条件下,新液和旧液中的各细胞数和 HCO_3^- 浓度之间的线性关系Tab. 5 Relationship between each type of cells and the HCO_3^- concentration of fresh and old culture medium in static culture of *H. pluvialis*

细胞数($10^4/\text{ml}$)	新液		旧液	
	线性方程式	相关系数 R^2	线性方程式	相关系数 R^2
总细胞数	$Y = -9.4248X + 15.868$	0.590	$Y = -1.6525X + 23.905$	0.914
游动细胞	$Y = -8.2285X + 14.489$	0.556	$Y = -0.9444X + 18.075$	0.489
不动细胞	$Y = -1.1963X + 1.3788$	0.385	$Y = -0.7081X + 5.8304$	0.542

注:式中 Y 为细胞数, X 为 HCO_3^- 浓度(mmol/L)

从表 5 可以看出,无论新液还是旧液中的 HCO_3^- 浓度与红球藻细胞总数、游动细胞数目和不动细胞数目都呈一定的负相关性,特别是旧液中的细胞总数与 HCO_3^- 浓度之间呈明显线性负相关,相关系数高达 0.914。

但是,进一步的通气培养实验(表 6)却表明,新液中细胞总数和游动细胞数与 HCO_3^- 浓度呈现

很强的线性正相关(相关系数都在 0.96 左右),没有产生抑制作用,相反有利于细胞生长。同样,对不动细胞数形成也没有促进作用(相关系数也很低,仅为 0.17)。而旧液实验中,尽管红球藻各细胞指标与 HCO_3^- 浓度呈负相关的,但相关性几乎没有(相关系数仅在 0.1—0.15 之间)。因此, HCO_3^- 也不可能是抑制红球藻生长的物质。

表 6 通气条件下,新液和旧液中的各细胞数和 HCO_3^- 浓度之间的线性关系Tab. 6 Linear relationship between different cell forms and the HCO_3^- concentration in fresh and old culture of aerated *H. pluvialis*

细胞数($10^4/\text{ml}$)	新液		旧液	
	线性方程式	相关系数 R^2	线性方程式	相关系数 R^2
总细胞数	$Y = 23.456X + 3.9535$	0.956	$Y = -1.6525X + 23.905$	0.133
游动细胞	$Y = 23.002X + 3.7228$	0.961	$Y = -0.9444X + 18.075$	0.149
不动细胞	$Y = 0.4545X + 0.2307$	0.171	$Y = -0.7081X + 5.8304$	0.101

注:式中 Y 为细胞数, X 为 HCO_3^- 浓度(mmol/L)

CO₂ 加富通气培养时,新液和旧液中,红球藻细胞总数、游动细胞数目和不动细胞数目都与 HCO₃⁻

浓度呈一定的正相关(表7),也不支持 HCO₃⁻ 是抑制红球藻生长的物质观点。

表7 CO₂ 加富通气培养条件下,新液和旧液中的各细胞数和 HCO₃⁻ 浓度之间的线性关系

Tab.7 Linear relationship between each kind of cells and the HCO₃⁻ concentration in fresh and old culture of CO₂ enriched aerated of *H. pluvialis*

细胞数(10 ⁴ /ml)	新液		旧液	
	线性方程式	相关系数 R ²	线性方程式	相关系数 R ²
总细胞数	$Y = 17.644X + 3.3799$	0.966	$Y = 5.7324X - 22.391$	0.754
游动细胞	$Y = 17.279X + 3.1500$	0.957	$Y = 2.3046X - 2.0256$	0.387
不动细胞	$Y = 0.3644X + 0.2300$	0.187	$Y = 3.4278X - 20.365$	0.516

注:式中 Y 为细胞数, X 为 HCO₃⁻ 浓度(mmol/L)

上述结果(表6和表7)表明,旧液中 HCO₃⁻ 与抑制红球藻生长和诱导游动细胞向不动细胞转化的调节物质之间没有必然联系,特别是培养液中有 HCO₃⁻, 而没有 CO₃²⁻ 存在时(如通气培养的新液, CO₂ 加富通气培养的新液和旧液), 各细胞数都与 HCO₃⁻ 浓度正相关, 说明 HCO₃⁻ 本身并不抑制红球藻的生长, 因此 HCO₃⁻ 不是限制和调节红球藻细胞生长的调节物质。相反, HCO₃⁻ 作为无机碳源有利于红球藻细胞生长。至于静置和通空气培养(此时旧液中 HCO₃⁻ 和 CO₃²⁻ 并存), HCO₃⁻ 浓度与各细胞指标呈负相关, 有可能是其它因素作用的膺像。

虽然红球藻培养液中无机碳变化和 Mandalam 等(1995)关于高密度小球藻培养液中的基本一致, 但作者得出了不完全相同于 Mandalam 的结论, 即不认为红球藻旧液产生的细胞分裂受阻是由于 HCO₃⁻ 的作用。相反, 红球藻的细胞分裂

受阻至少部分可能是由于尚不被认知的调节物质作用的结果。

在排除无机碳可能影响红球藻细胞生长的基础上, 是否旧液中的调节物质是有机物? 为此, 作者利用有机溶剂对旧液进行了提取, 并验证粗提取物在调节红球藻细胞周期中的生物活性。

2.5 乙酸乙酯粗提取物对红球藻生长的影响

低密度和高密度培养红球藻后的旧液, 经过乙酸乙酯提取获得粗提取物。提取物对红球藻细胞相对生长影响如表8所示。对比结果不难发现, 乙酸乙酯粗提取物中存在有明显降低红球藻总细胞和游动细胞数量, 抑制细胞生长的活性物质。并且该物质对细胞生长的抑制程度与原来藻细胞密度有关, 原旧液的细胞密度越高, 对红球藻细胞(特别是游动细胞)数量降低作用就越明显, 这意味着高密度旧液乙酸乙酯粗提取物中的调节物质含量较多。

表8 不同密度培养的旧液提取物对红球藻各细胞生长的抑制作用

Tab.8 Inhibitory effects of crude ethyl acetate extracts from old culture supernatant on cell growth of each type of cells in *H. pluvialis*

细胞类型	细胞总数			游动细胞			不动细胞		
	5	6	7	5	6	7	5	6	7
培养时间(d)									
对照	100	100	100	100	100	100	100	100	100
低旧液	78	79	80.1	77	77	82	106	129	70
高旧液	53	49	43.8	41	36	33	353	296	330

注:高、低旧液分别表示来自于高密度和低密度培养红球藻的旧液

该粗提取物没有降低对红球藻不动细胞的形成, 相反大大增加了不动细胞数量, 并且旧液中藻

密度越高, 不动细胞量就越多。

上述关于乙酸乙酯粗提取物的实验结果, 印

证了作者利用旧液进行的生物检测结果,即旧液中有降低细胞增长和诱导细胞转化的调节物质(孙艳妮等,2001),这与 Imada 等(1991,1992)在中肋骨条藻和 Zhang 等(2004)¹⁾在微拟球藻、Liu 等(2002)在雪藻乙酸乙酯粗提取物的生物检测结果基本一致。同时,该结果意味着旧液中的调节物质不是无机碳离子,是可以由乙酸乙酯提取出来的某种有机物,反证了旧液中过高的碳酸根和碳酸氢根离子不是抑制红球藻细胞生长的调节物质。至于抑制物质的具体成分和结构尚需进一步研究探明。

另外,以往一直难以理解为什么红球藻很难建立稳定培养体系(Lee *et al*, 1994),而实验重新接种(即使接种到蒸馏水中)或在自然降雨后,红球藻又能够快速繁殖(殷明焱,1998)²⁾。如果从抑制物角度分析就很容易解释了,因为培养过程中不断有抑制性调节物产生,影响了红球藻细胞生长,而上述接种和降雨过程有效地稀释了抑制性调节物质浓度,从而解除了对细胞生长的抑制作用。

参 考 文 献

- 刘建国,殷明焱,张京浦等,2000a. 雨生红球藻的细胞周期初探. 海洋与湖沼, 31(2): 145—150
- 刘建国,张京浦,2000b. 雨生红球藻光合和呼吸速率研究. 海洋与湖沼, 31(5): 490—495
- 孙艳妮,殷明焱,刘建国,2001. 雨生红球藻的调节物质. 海洋湖沼通报, 89(3): 22—28
- 张京浦,刘建国,1994. 温度对雨生红球藻光合作用的影响. 植物生物学学报, 4(1): 6—10
- 张展,刘建国,2003. 微藻高密度培养中的生长指标和适应机制. 海洋水产研究, 24(4): 36—43
- 黄祥飞,1999. 湖泊生态调查观测与分析. 北京: 中国标准出版社, 33—36
- Imada N, Kobayashi K, Tahara K *et al*, 1991. Production of an autoinhibitor by *Skeletonema costatum* and its effect on the growth of other phytoplankton. Nippon Suisan Gakkai-shi, 57(12): 2285—2290
- Imada N, Kobayashi K, Isomura K *et al*, 1992. Isolation and identification of an autoinhibitor produced by *Skeletonema costatum*. Nippon Suisan Gakkai-shi, 58(8): 1687—1692
- Lee Y-K, Ding S-Y, 1994. Cell cycle and accumulation of astaxanthin in *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta). J Phycol, 30: 445—449
- Liu J G, Cohen Z, Richmond A, 2002. Physiological inhibitory effect of OCS in arachidonic acid-rich *Parietochloris incisa* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). Chin J Ocean Limnol, 20(3): 248—255
- Mandalam R K, Palsson B O, 1995. *Chlorella vulgaris* (Chlorellaceae) does not secrete autoinhibitors at high cell densities. American J Botany, 82(8): 955—963
- Pratt R, 1942. Studies on *Chlorella vulgaris*. V. Some properties of the growth-inhibitor formed by *Chlorella* cells. American J Botany, 29: 142—148
- Pratt R, 1944. Studies on *Chlorella vulgaris*. IX. Influence on growth of *Chlorella* of continuous removal of chlorellin from the culture solution. American J Botany, 31: 418—421
- Pratt R, Fong J, 1940. Studies on *Chlorella vulgaris*. II. Further evidence that *Chlorella* cells form a growth-inhibiting substance. American J Botany, 27: 431—436
- Pratt R, Oneto J F, Pratt J, 1945. Studies on *Chlorella vulgaris*. X. Influence of the age of the culture on the accumulation of the chlorellin. American J Botany, 32: 405—408

INORGANIC CARBON AND THE CELL GROWTH REGULATOR IN MICRO-ALGA *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*

LIU Jian-Guo, SUN Yan-Ni, YIN Ming-Yan, LIU Wei, ZHANG Zhan

(Research & Development Center of Marine Biotechnology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract Auto-regulation, probably a common phenomenon in micro-algae cultivation has been long over-

1) Zhang C W, Richmond A, 2004. Interrelationship between the optical path, the optimal population density and cell growth inhibition with reference to efficient use of strong light for photosynthetic productivity in high-density algal culture. J Biotech (accepted)

2) 殷明焱, 1998. 雨生红球藻细胞周期及调控研究. 中国科学院海洋研究所硕士学位论文, 46

looked in the low-cell-density cultures, especially at early culture stages because of the low auto-regulator concentration. In high-cell-density culture, however, auto-regulation become an important issue and occurs heavily at the later culture stages. To date, scientists are unsure exactly what kind of substance the auto-regulator is.

Our early data has revealed an unknown bioactive substance produced by *Haematococcus* cell that feedback influences cell growth and transformation and effectively regulates cell cycles. About 60 years ago, Pratt (1942, 1944) and Pratt *et al* (1940, 1945) showed some auto-produced signal substances termed chlorellin feedback regulating *Chlorella* cell growth. Mandalam *et al* (1995) considered autoinhibitor does not exist in the old culture, and it is inorganic carbons play the inhibitory role on *Chlorella* growth.

In this study, the relationship of HCO_3^- or CO_3^{2-} to cell growth and cell transformation of *H. pluvialis* in static, aerated and/or CO_2 -enriched aerated culture was investigated comparatively in Qingdao from 1999 to 2002 using a fresh medium and an old culture supernatant with equal content of nutrients. Results of CO_2 -enriched aerated culture showed that motile cell growth rate in *Haematococcus* old culture was reduced, meanwhile cell transformation from motile cells to non-motile cells accelerated. These results imply that some unknown substances, such as an auto-regulator, existed in the old culture blocking *Haematococcus* motile cell division and inducing the process of cell transformation.

Although CO_3^{2-} and HCO_3^- concentration in supernatant of *Haematococcus* old culture was similar to that in *Chlorella* old culture supernatant, and the growth rate of motile cells in the old culture was significantly affected (much lower than that of fresh medium), further studies did not support a positive connection between inorganic carbons (CO_3^{2-} or HCO_3^-) and the auto-regulator. On the contrary, inorganic carbons promoted motile cell growth rates in some aspects.

In addition, crude ethyl acetate extracts from the old culture supernatant also showed similar bioactivity i. e. inhibiting motile cell growth and promoting cell transformation from motile cells to non-motile cells. Therefore, auto-regulators in *Haematococcus* old culture supernatant, unlike inorganic substance, are organic dissoluble substances.

Our DNA data and histogram of motile cells also showed that the process of DNA replication in the motile cells did not stop, but the process of the plasmid division was heavily blocked by the old culture supernatant.

Although no evidence indicated that inorganic substances were the respected auto-inhibitors, however, from the auto-inhibitors' point of view, some obscure issues (for example, the reason why *Haematococcus* culture was hardly kept as stable as other microalgae, why *Haematococcus* suddenly grew fast after inoculation even in distill water, why *Haematococcus* can only be found as dominant specie in shallow water pools on the rocks after raining in nature) were easily understood.

Key words *Haematococcus pluvialis*, Crude extracts, Auto-regulator, CO_3^{2-} , HCO_3^-