

不同氮源及 CO₂ 浓度下湖泊微拟球藻的生长及产油特性分析

李凤娟¹ 万 秀² 方仙桃² 胡 锐² 高大文¹ 胡晗华²

(1. 哈尔滨工业大学城市水资源与水环境国家重点实验室, 哈尔滨 150090; 2. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

EFFECTS OF NITROGEN SOURCES AND CO₂ LEVELS ON THE GROWTH AND OIL ACCUMULATION IN *NANNOCHLOROPSIS LIMNETICA*

LI Feng-Juan¹, WAN Xiu², FANG Xian-Tao², HU Rui², GAO Da-Wen¹ and HU Han-Hua²

(1. State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China;
2. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

关键词: 湖泊微拟球藻; 三酰基甘油; 生物柴油; 氮利用

Key words: *Nannochloropsis limnetica*; Triacylglycerols; Biodiesel; Nitrogen Utilization

中图分类号: Q948.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2015)02-0436-05

工业生产排放的各种废气与污水污染人类赖以生存的环境。化石燃料燃烧除排放出大量CO₂外, 还释放出含有粉尘、SO_x和NO_x等直接危害人类健康的有毒成分^[1]。其中NO_x与水结合后最终会转化成硝酸盐或亚硝酸盐等^[2], 导致污水中的含氮化合物氨氮、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮和有机氮的含量通常偏高。如何有效去除污水中的氮是防治水体污染最关键的步骤之一, 而利用微藻培养去除水体中的氮源是目前研究的热点。尽管生物燃料生产的成本远高于化石燃料, 且微藻培养过程中消耗仅与产出的能量相当, 但生物燃料包括微藻生物质在替代减排上的潜力巨大, 使得微藻生物质仍被认为是最有前途的生物燃料之一^[3]。将微藻生物质生产与污水处理和废气利用相结合, 可在减少碳排放的同时增加经济效益, 由此使得利用微藻作为生产生物物质的原料变得经济可行。

微拟球藻(*Nannochloropsis*)是一类属于真眼点藻纲(Eustigmatophyceae)、球形或近似球形的单细胞真核生物, 具有较高的光合作用效率、生物量和油脂含量^[4]。目前, 对有些微拟球藻株已建立了成熟的大规模封闭式光生物反应器和开放池的户外培养体系, 多个藻株的全基因组序列业已公布, 遗传转化体系也已建立^[5-8]。因而, 该属的种类被认为是最有潜力的工业产油的模式研究藻种^[4]。

该属有6个已定种^[9], 其中仅有一个种类为淡水类型^[10]。尽管利用海洋种类作为微藻生物质原料的生产有许多优势, 然而, 从污水处理角度考虑利用淡水种类更为合适。迄今, 尚未见对淡水湖泊微拟球藻(*N. limnetica*)产油特性的报道, 也没有关于其对碳耐受及不同氮源利用效率的研究。本文以湖泊微拟球藻为对象, 分析在不同浓度CO₂下, 其对不同类型氮源的利用及油脂与脂肪酸含量, 为利用淡水微拟球藻生产生物能源的同时进行污水及废气中氮去除的应用潜力提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 藻株和培养

湖泊微拟球藻(*N. limnetica* KR 1998/3)由德国淡水生态和内陆渔业研究所(Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries, Neuglobsow)Lothar Krienitz教授提供, 经稀释涂平板纯化后得到无菌藻落。常规培养使用BG11培养基, 在温度为22℃、光强为60 μmol photons/(m²·s)的连续光照下进行。

三种氮源实验分别用1 mmol/L的NH₄Cl、NaNO₂或NaNO₃替代BG11培养基中的NaNO₃。培养使用内径为3 cm, 长为60 cm的柱状玻璃管。接种起始A₇₃₀ = 0.15, 培

收稿日期: 2014-04-30; 修订日期: 2014-08-23

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2011CB200901)资助

作者简介: 李凤娟(1982—), 女, 黑龙江哈尔滨人; 博士研究生; 主要从事环境生物学研究。E-mail: lifj_hit@163.com

通信作者: 胡晗华, E-mail: hanhuahu@ihb.ac.cn

养体积为300 mL。培养在通入空气、2%或5%的CO₂ (v/v), 光强约为120 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 的连续光照条件进行。每天定时取样测定生长、培养液pH及氮和磷的消耗。

1.2 常规参数测定

通过测定培养液的 A_{730} 值监测藻细胞的生长。藻细胞培养液经离心后用pH计测定pH。培养液中NO₂⁻和NO₃⁻的浓度利用分光光度法(A_{220})检测^[11]。NH₄⁺的测定采用纳氏剂-分光光度法(A_{420})^[12]。磷酸盐浓度用磷钼酸分光光度法测定^[13]。

1.3 藻株中性脂含量分析

分别在培养的第2、第4、第6和第8天收集相同数目的藻细胞, 提取总脂, 利用薄层层析法比较总脂的组成及含量。藻细胞的总脂按照Bligh和Dyer^[14]的方法提取。经6000 r/min离心收集的藻细胞加入一定体积的氯仿: 甲醇(1:1), 在旋涡振荡器上以最大速度振荡1—2min, 然后加入3/10体积的1 mol/L氯化钾的0.2 mol/L磷酸溶液, 稍振荡后12000 r/min离心5min, 吸取下层氯仿相至新的EP管中, 置于通风橱中吹干, -20℃保存备用。薄层层析参考文献[15]进行。薄层层析板的型号是Silica gel 60 F254 (Merk KgaA Darmstadt, Germany), 展层剂体系为正己烷: 乙醚: 乙酸(70:30:1, v/v/v)。展层完毕从展层缸中取出层析板, 置于通风橱内吹干展层剂, 然后放置到含有一定量颗粒碘的烧杯中于37℃下显色5—10min^[16]。标准品三油酸甘油酯(Glyceryl trioleate)购自Sigma公司。

1.4 总脂含量的测定及脂肪酸组成分析

6000 r/min离心收集培养8d的藻细胞, 用灭菌ddH₂O洗涤三次, 将收集的藻细胞液氮速冻后, 冷冻干燥备用。总脂的提取及定量参考文献[14]。称取100 mg干藻粉加入一定体积的氯仿: 甲醇(1:2)溶剂萃取充分, 然后加入一定比例的灭菌ddH₂O促使分层, 离心收集下层的氯仿层, 转入已称重的称量瓶中, N₂吹干有机溶剂, 然后用

分析天平称重, 计算总脂的含量。

总脂甲酯化按如下步骤进行: 将一定量的总脂转移到1.5 mL Aglient 玻璃瓶中, 加入1 mL 1 mol/L的硫酸甲醇溶液, 充N₂后密封, 于100℃反应1h。冷却后, 加入200 μL 蒸馏水, 混匀后, 以200 μL 正己烷萃取三次, 合并有机相, N₂吹干后用正己烷定容至100 μL , 取1 μL 用Ultra Trace气相色谱分析仪 (Thermo Scientific, United States) 进行脂肪酸组成分析。色谱柱为毛细管柱(60 m $\times$ 0.25 mm); 进样口温度为250℃, FID检测器的温度为280℃; 实验采用程序升温: 150℃, 1min; 150—220℃, 5℃/min; 220—280℃, 20℃/min; 280℃, 33min; 载气为高纯氮, 流速2 mL/min。用面积归一法计算各脂肪酸组分的相对百分比。

2 结果与讨论

2.1 生长

预实验显示, 在CO₂浓度为5%的条件下, 湖泊微拟球藻的生长即受到明显的抑制。研究显示, 其他所有5种海洋微拟球藻在通入5%的CO₂时生长并没有受到促进, 相反一半以上种类的生长被严重抑制^[17]。可见, 微拟球藻属的种类属于CO₂敏感型(不耐受)的类型^[18]。在本实验中, 湖泊微拟球藻在通入2%CO₂时(0—0.28/d)的比生长速率均低于通空气培养条件(0.27—0.29/d)。尤其是在NH₄Cl为氮源条件下, 通入2%CO₂培养湖泊微拟球藻几乎不能生长, 培养液的pH维持在6左右(图1)。研究表明, 在高CO₂条件下观察到光合作用的快速抑制, 是由高CO₂压力下叶绿体间质的酸化引起卡尔文循环的关键酶失活所导致的^[19]。通空气培养时培养液的pH为7—8.5, 在通入2%CO₂时, 培养液的pH降至6—7.5。以NH₄Cl为氮源将使得培养液的pH进一步下降, 图1的结果也显示在使用NH₄Cl作为氮源的条件下培养液的pH至少低于以NaNO₂和NaNO₃为氮源条件时1个单位。

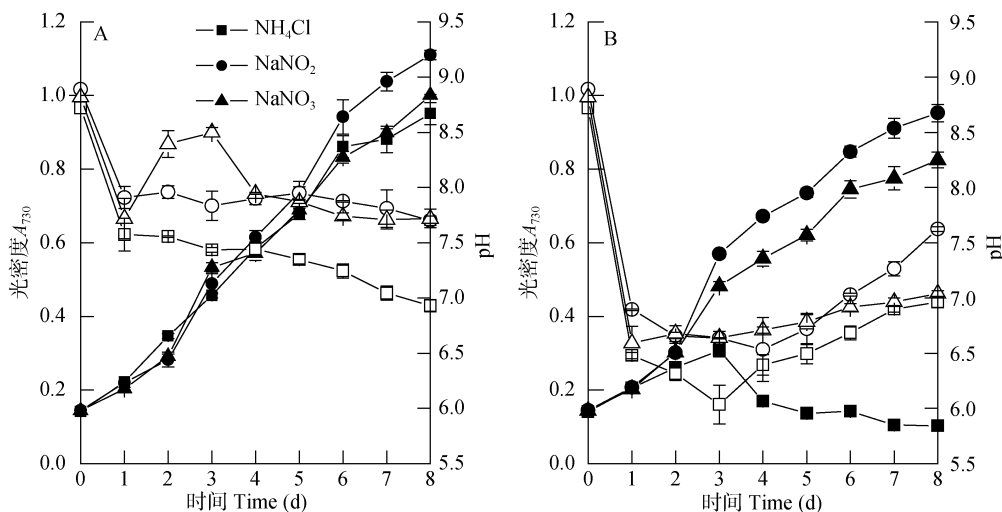


图1 在不同氮源下湖泊微拟球藻在通空气(A)与2%CO₂(B)条件下的生长(A_{730} , 用实心图标表示)及培养液中pH的变化(用空心图标表示)
Fig. 1 Growth (A_{730}) and pH value in medium of *Nannochloropsis limnetica* cultured at different nitrogen sources aerated with air (A) and 2% CO₂ (B)

以 NaNO_2 为氮源条件下湖泊微拟球藻的生长最佳,通空气培养时铵态氮和硝态氮条件下藻细胞的生长相当。通常认为,浮游植物具有选择性利用氮源的特点。硅藻类偏好硝态氮,而鞭毛藻类则更倾向于还原态氮^[20]。 NO_3^- 需在硝酸还原酶作用下形成 NO_2^- ,后者再由亚硝酸还原酶还原成 NH_4^+ 后才可被藻细胞固定。因而, NH_4^+ 似乎应是藻类培养的最佳氮源,许多研究也表明与硝态氮和亚硝态氮比铵态氮更能促进藻类的生长^[21, 22]。尽管许多藻类均能利用亚硝态氮,但过高浓度的亚硝酸盐对藻有毒害作用^[23]。在本实验中,在高达 1 mmol/L NaNO_2 条件下湖泊微拟球藻生长仍优于同样浓度的硝酸钠培养,显示湖泊微拟球藻具有好的亚硝酸盐耐受性。这一特性暗示可以直接通过

培养该藻来处理富含高浓度 NO_x 的烟道气^[24]。

2.2 营养盐吸收

图2显示湖泊微拟球藻对不同氮源的利用情况,结果显示对铵态氮的吸收最快,其次为亚硝态氮,对硝态氮的吸收最慢。这一结果进一步说明在合适的浓度下,还原态的铵可以最快地被细胞固定,而硝态氮由于要经过两步还原后才能被固定,所以被吸收得最慢。培养液中的氮浓度随培养时间在前4天快速下降,随后趋于稳定。通常藻细胞可以快速吸收氮源并储存在细胞中用于细胞分裂^[22]。与生长相关,湖泊微拟球藻对磷的利用在生长前期没有差别,后期培养液剩余的磷与生长呈负相关,生物量越高培养液中磷的浓度越低(图2)。

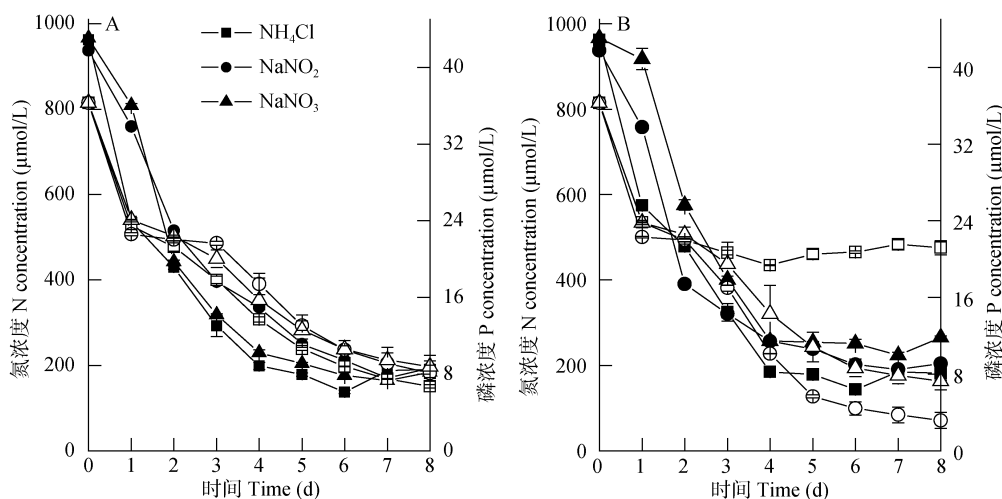


图2 不同氮源下湖泊微拟球藻在通空气(A)与 $2\% \text{CO}_2$ (B)条件下对氮(用实心图标表示)和磷(用空心图标表示)的消耗

Fig. 2 Nitrogen and phosphate concentrations in medium of *Nannochloropsis limnetica* cultured at different nitrogen sources aerated with air (A) and $2\% \text{CO}_2$ (B)

2.3 产油特性

与其他藻类不同,即使在不缺氮条件下微拟球藻也能合成甘油三酯,它们含有13个二脂酰甘油酰基转移酶(DGAT)基因,其数目是目前已知藻类和植物基因组中最多的,这也正是微拟球藻属的种类能大量积累油脂的原因之一^[25, 26]。利用薄层层析分析从第2到第8天湖泊微拟球藻总脂组成发现,第4天即可检测到大量甘油三酯的积累,随后随培养时间变化甘油三酯含量略有升高(图3)。而第4天,藻细胞生长仍然处在对数期,培养液氮浓度则超过 $200 \mu\text{mol/L}$ 。即使在培养的第2天,以硝态氮为氮源条件下也可检测到少量的甘油三酯。研究显示,淡水微拟球藻的甘油三酯含量与海洋的微拟球藻相当^[27]。显然,中性脂含量的高低与培养条件有密切的关系。由于使用的培养基氮浓度高达 17.6 mmol/L ,培养早期收获检测到的湖泊微拟球藻仅含很低的甘油三酯^[28]。不同氮源对湖泊微拟球藻甘油三酯含量有一定影响,以亚硝酸盐为氮源条件下甘油三酯含量高于其他两种氮源。在 2% 的 CO_2 浓度培养条件下,以亚硝酸盐为氮源与通空气培养相当,但

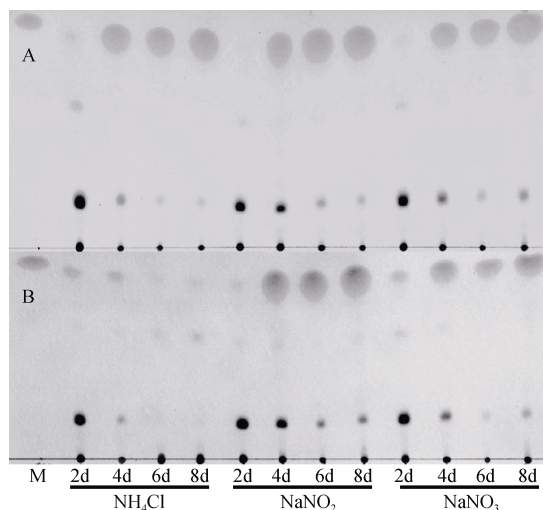


图3 不同氮源下湖泊微拟球藻在通空气(A)与 $2\% \text{CO}_2$ (B)条件下总脂的硅胶板薄层层析图

Fig. 3 Comparison of lipid composition and content in *Nannochloropsis limnetica* cultured at different nitrogen sources aerated with air (A) and $2\% \text{CO}_2$ (B)

M. 三油酸甘油酯 Triolein

表 1 不同氮源下湖泊微拟球藻在通空气(A)与 2%CO₂(B)条件下总脂含量(占藻细胞干重)及其脂肪酸组成(摩尔百分比)

Tab. 1 Total lipid (% dry cell weight) content and fatty acid composition (mol %) in total lipids of *Nannochloropsis limnetica* KR 1998/3 cultured at different nitrogen sources aerated with air or 2% CO₂

总脂及脂肪酸 Total lipids and fatty acids	NO ₂ ⁻		NO ₃ ⁻		NH ₄ ⁺
	Air	2% CO ₂	Air	2% CO ₂	Air
C14:0	6.44±1.72	9.12±0.35	2.78±3.33	8.79±0.33	8.50±4.48
C14:1	0.59±0.40	0.35±0.38	0.49±0.59	0.26±0.22	0.40±0.38
C16:0	29.56±2.32	26.56±1.41	26.62±2.64	31.01±0.90	28.72±2.86
C16:1	32.90±1.40	31.78±3.05	32.80±2.45	31.30±0.59	34.86±3.78
C18:0	1.28±0.41	1.72±1.21	1.87±0.79	1.50±0.03	1.10±0.76
C18:1	14.44±0.48	12.88±1.22	16.18±1.73	12.21±1.58	13.48±2.89
C18:2	2.46±0.49	2.84±0.95	2.99±1.39	2.55±0.34	2.67±0.37
γ-C18:3	0.11±0.12	0.25±0.28	0.97±1.32	0.07±0.02	1.06±0.89
α-C18:3	0.71±0.17	1.28±0.95	1.25±1.27	0.69±0.02	0.69±0.66
C18:4	0.44±0.52	0.33±0.46	0.96±1.06	0.20±0.28	0.36±0.51
C20:0	1.05±1.03	0.71±0.66	0.86±0.87	0.65±0.07	0.57±0.64
C20:4	2.73±0.88	3.46±0.14	3.51±1.16	2.95±0.03	2.21±1.64
C20:5	6.79±2.29	7.70±0.12	7.25±0.09	7.52±0.98	4.84±3.41
C22:0	0.09±0.13	0.32±0.46	0.28±0.38	0.00±0.00	0.23±0.33
C22:4	0.10±0.14	0.26±0.37	0.37±0.23	0.00±0.00	0.05±0.08
C22:5	0.24±0.34	0.37±0.20	0.55±0.63	0.28±0.08	0.19±0.27
C22:6	0.08±0.10	0.07±0.07	0.28±0.38	0.03±0.01	0.05±0.06
占干重百分比 (% dry cell weight)	40.3	39.1	44.8	34.1	41.9

在另外两种氮源培养下则显著降低。因此从微藻产油角度而言，亚硝态氮也是湖泊微拟球藻最为合适的氮源。

将培养8d的湖泊微拟球藻收获用于分析藻细胞的总脂含量及其脂肪酸组成。表1显示湖泊微拟球藻的总脂含量为34%—45%，与海洋微拟球藻的总脂含量相当^[27]。在高CO₂浓度下藻细胞的总脂含量减少。湖泊微拟球藻脂肪酸组成以C16:0、C16:1和C18:1为主，三者之和占总脂肪酸的71%—77%。另外两种含量较高的脂肪酸为C14:0和C20:5。微拟球藻属的种类均含有高的二十碳五烯酸(EPA)，因而被认为是工业化生产EPA的最佳原料^[29]。尽管EPA在该藻中仅为5%—8%，这与细胞所处的培养期相关，培养期延长导致的缺氮显著减少EPA含量^[30]。不同氮源培养对几种短链脂肪酸的含量影响不大，而其多不饱和脂肪酸含量均未超过12%，丰富而稳定的短链脂肪酸组成特点符合作为生物柴油原料的标准。

为将微藻生物质生产与污水处理和废气氮去除相结合，本研究以富含甘油三酯的湖泊微拟球藻为原料，研究发现该藻最合适的氮源为亚硝态氮。该藻可直接高效利用废水、废气中的氮，同时积累大量油脂，是一个在工业上有应用前景的优良藻株。

参考文献：

[1] Koornneef J, Ramirez A, van Harmelen T, *et al.* The impact

of CO₂ capture in the power and heat sector on the emission of SO₂, NO_x, particulate matter, volatile organic compounds and NH₃ in the European Union [J]. *Atmospheric Environment*, 2010, **44**(11): 1369—1385

[2] Jiang R, Huang S B, Fan L R. Removal of NO_x from flue gas by a biofilter under aerobic conditions [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2007, **27**(9): 1469—1475 [蒋然, 黄少斌, 范利荣. 在有氧条件下用生物过滤系统去除 NO_x. 环境科学学报, 2007, **27**(9): 1469—1475]

[3] Chisti Y. Biodiesel from microalgae [J]. *Biotechnology Advances*, 2007, **25**: 294—306

[4] Jinkerson R E, Radakovits R, Posewitz M C. Genomic insights from the oleaginous model alga *Nannochloropsis gaditana* [J]. *Bioengineered*, 2013, **4**: 37—43

[5] Radakovits R, Jinkerson R E, Fuerstenberg S I, *et al.* Draft genome sequence and genetic transformation of the oleaginous alga *Nannochloropsis gaditana* [J]. *Nature Communications*, 2012, **3**: 686

[6] Vieler A, Wu G, Tsai C H, *et al.* Genome, functional gene annotation, and nuclear transformation of the Heterokont oleaginous alga *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779 [J]. *PLoS Genetics*, 2012, **8**: e1003064

[7] Li F, Gao D, Hu H. High-efficiency nuclear transformation of the oleaginous marine *Nannochloropsis* species using PCR product [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2014, **78**(5): 812—817

- [8] Rodolfi L, Chini Zittelli G, Bassi N, *et al.* Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, **102**: 100—112
- [9] Andersen R A, Brett R W, Potter D, *et al.* Phylogeny of the Eustigmatophyceae based upon 18S rDNA, with emphasis on *Nannochloropsis* [J]. *Protist*, 1998, **149**: 61—74
- [10] Fawley K P, Fawley M W. Observations on the diversity and ecology of freshwater *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae), with descriptions of new taxa [J]. *Protist*, 2007, **158**: 325—336
- [11] Collos Y, Mornet F, Sciandra A, *et al.* An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures [J]. *Journal of Applied Phycology*, 1999, **11**: 179—184
- [12] State Environmental Protection Administration. Monitoring and Analysis Method of Water and Waste Water [M]. (Fourth Edition). Beijing: China Environment Science Press. 2002 [国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法. (第四版). 北京: 中国环境科学出版社, 2002]
- [13] Harrison P J. Determining Phosphate Uptake Rates of Phytoplankton [A]. In: Lobban C S, Chapman D J, Kremer B P (Eds.), *Experimental Phycology: A Laboratory Manual* [C]. New York: Cambridge University Press. 1988, 186—195
- [14] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of lipid extraction and purification [J]. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 1959, **37**: 911—917
- [15] Reiser S, Somerville C. Isolation of mutants of *Acinetobacter calcoaceticus* deficient in wax ester synthesis and complementation of one mutation with a gene encoding a fatty acyl-coenzyme A reductase [J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, **179**: 2969—2975
- [16] Yu E T, Zendejas F J, Lane D P, *et al.* Triacylglycerol accumulation and profiling in the model diatoms *Thalassiosira pseudonana* and *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) during starvation [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2009, **21**: 669—681
- [17] Li F J. Screening of high-CO₂ tolerance *Nannochloropsis* species and its genetic engineering [D]. Doctoral Dissertation of Harbin Institute of Technology, Harbin. 2014 [李凤娟. 耐高 CO₂ 微拟球藻筛选及遗传改良. 博士学位论文, 哈尔滨工业大学, 哈尔滨. 2014]
- [18] Baba M, Shiraiwa Y. High-CO₂ Response Mechanisms in Microalgae [M]. In: Mohammad N (Eds.), *Advances in Photosynthesis Fundamental Aspects*. Rijeka: In Tech. 2012, 299—320
- [19] Satoh A, Kurano N, Harayama S, *et al.* Effects of chloramphenicol on photosynthesis, protein profiles and transketolase activity under extremely high CO₂ concentration in an extremely-high-CO₂-tolerant green microalga, *Chlorococcum littorale* [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2004, **45**(12): 1857—1862
- [20] Carlsson P, Edling H, Bechemin C. Interactions between a marine dinoflagellate (*Alexandrium catenella*) and a bacterial community utilizing riverine humic substances [J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 1998, **16**: 65—80
- [21] Berges J A, Mulholland M R. Enzymes and Nitrogen Cycling [M]. In: Capone D G, Bronk D A, Mulholland M R, *et al.* (Eds.), *Nitrogen in the Marine Environment* [C]. Elsevier Press. 2008, 1385—1444
- [22] Lomas M W, Glibert P M. Comparisons of nitrate uptake, storage, and reduction in marine diatoms and flagellates [J]. *Journal of Phycology*, 2000, **36**(5): 903—913
- [23] Chen W M. Effects of nitrite on the growth and physiology of *Microcystis aeruginosa* [D]. Doctoral Dissertation of Nankai University, Tianjin. 2009 [陈卫民. 亚硝酸盐对铜绿微囊藻生理特性的影响. 博士学位论文, 南开大学, 天津, 2009]
- [24] Matsumoto H, Shioji N, Hamasaki A, *et al.* Carbon dioxide fixation by microalgae photosynthesis using actual flue gas discharged from a boiler [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1995, **51**(1): 681—692
- [25] Wang D, Ning K, Li J, *et al.* *Nannochloropsis* genomes reveal evolution of microalgal oleaginous traits [J]. *PLoS Genetics*, 2014, **10**(1): e1004094
- [26] Li J, Han D, Wang D, *et al.* Choreography of transcriptomes and lipidomes of *Nannochloropsis* reveals the mechanisms of oil synthesis in microalgae [J]. *The Plant Cell*, 2014, doi:10.1105/tpc.113.121418
- [27] Huang W C, Hu H H. Study on the salinity tolerance and oil accumulation in *Nannochloropsis* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, **37**(2): 383—387 [黄伟超, 胡晗华. 微拟球藻属对盐度的耐受及其产油特性分析. 水生生物学报, 2013, **37**(2): 383—387]
- [28] Li X B, Xu X D, Kong R Q. Studies on the production of oil and polyunsaturated fatty acids in five species of *Nannochloropsis* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(5): 893—897 [李秀波, 徐旭东, 孔任秋. 五种微绿球藻产油和产多不饱和脂肪酸的研究. 水生生物学报, 2010, **34**(5): 893—897]
- [29] Sukenik A. Production of eicosapentaenoic acid by the marine eustigmatophyte *Nannochloropsis* [A]. In: Cohen Z (Ed.), *Chemicals from Microalgae* [C]. London: Taylor & Francis Press. 1999, 41—56
- [30] Hu H H, Gao K S. Response of growth and fatty acid compositions of *Nannochloropsis* sp. to environmental factors under elevated CO₂ concentration [J]. *Biotechnology Letters*, 2006, **28**(13): 987—992