

不同营养条件对微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 生长和油脂积累的影响

潘孝妍, 陈长鸿, 王秀海, 曹 猛, 刘平怀

(海南大学 化学工程与技术学院, 海口 570228)

摘要:为优化微藻培养条件,以 BG11 为基础培养基,采用单因素实验考察了不同质量浓度的 NaNO_3 、 K_2HPO_4 、 Na_2CO_3 和 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 对微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 生长和油脂积累的影响。结果表明: NaNO_3 、 K_2HPO_4 、 Na_2CO_3 和 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 对微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 生长、油脂含量和油脂产量影响显著($p < 0.05$),且 NaNO_3 、 K_2HPO_4 、 Na_2CO_3 和 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的质量浓度分别为 0.75、0.02、0.08、0.018 g/L 时,最利于微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 的生长和油脂积累。

关键词:硝酸钠;磷酸氢二钾;碳酸钠;二水氯化钙;微藻;细胞生长;油脂积累

中图分类号:TK6;Q949.9

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2020)03-0135-05

Effects of nutritional condition on the growth and lipid accumulation of microalgae *Ankistrodesmus* sp. CJ09

PAN Xiaoyan, CHEN Changhong, WANG Xiuhai, CAO Meng, LIU Pinghuai

(School of Chemical Engineering and Technology, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract:To optimize the culture conditions of microalgae, single factor experiment was performed to reveal the effects of different mass concentrations of NaNO_3 , K_2HPO_4 , Na_2CO_3 and $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ based on BG11 medium on the growth and lipid accumulation of microalgae *Ankistrodesmus* sp. CJ09. The results showed that all these factors exerted significant effects on the growth, lipid content and yield of microalgae *Ankistrodesmus* sp. CJ09 ($p < 0.05$). The highest growth and lipid accumulation of microalgae *Ankistrodesmus* sp. CJ09 were achieved when the mass concentrations of NaNO_3 , K_2HPO_4 , Na_2CO_3 and $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ were 0.75, 0.02, 0.08 g/L and 0.018 g/L respectively.

Key words: NaNO_3 ; K_2HPO_4 ; Na_2CO_3 ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; microalgae; cell growth; lipid accumulation

化石能源的枯竭及其所带来的环境问题迫使人们研究、开发新的可再生能源。生物柴油以其可再生性而得到世界的广泛关注^[1]。与传统的陆生油

料植物相比,微藻具有光合作用效率高、环境适应能力强、培养周期短、油脂产量高、产生高附加值产物、不占用耕地、可用废水进行培养等优点^[2]。因此,利用微藻生产生物柴油具有潜在的应用价值。然而,自然环境中的微藻生长速度缓慢,油脂产量较低,因此研究微藻生长的环境条件对提高微藻生长速率、实现高密度培养至关重要。

氮和磷是生物体合成蛋白质和核酸的基本成分,是调控植物生长发育的重要因子之一^[3]。何思思等^[4]研究发现,在高氮浓度下,魏氏真眼点藻的生物量最高,而在低氮浓度下,油脂含量最高。江怀真等^[5]研究发现,低氮浓度和低磷浓度条件可以促进小球藻油脂的积累。碳是微藻细胞骨架的主要构

收稿日期:2019-05-31;修回日期:2019-11-20

基金项目:国家科技支撑计划项目(2011BAD14B01);国家科技型中小企业技术创新基金(13C26244604892);海南省产学研一体化项目(CXY20150034);海南省中药现代化科技专项(ZY201327);海口市海藻生物资源研究与利用技术创新平台(2017044)

作者简介:潘孝妍(1995),女,在读硕士,研究方向为药食同源植物/微藻及其代谢产物研究(E-mail)963582496@qq.com。

通信作者:刘平怀,教授,博士生导师,硕士(E-mail)twlph@163.com。

成元素,可占微藻细胞干重的50%^[6]。Shakya等^[7]研究表明,在较高温度下,碳酸钠可以提高含高碳水化合物藻类的油脂含量。钙被公认为是植物的第二营养要素,是构成细胞膜的主要成分,对碳水化合物的形成与转化有重要的影响^[8]。张森等^[9]研究发现,降低钙浓度可以促进微藻 *Desmodesmus* sp. WC08 生长和油脂的积累。此外,铁^[10]、温度、光照和盐^[11]等也对微藻生长和油脂积累产生一定的影响。

本研究选择微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 为研究对象,基于BG11培养基,通过单因素实验初步考察不同质量浓度的硝酸钠、磷酸氢二钾、碳酸钠和二水氯化钙对微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 生长和油脂积累的影响,为微藻的高密度培养和工程微藻的构建提供理论参考依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09,由海南大学生物工程综合实验室提供。氯仿、甲醇、硝酸钠、碳酸钠、磷酸氢二钾和二水氯化钙,均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

赛福智能人工气候箱,柱状玻璃管(高60 cm,直径6 cm),TU-1810紫外可见分光光度计,LDJ-25C真空冷冻干燥机,3H12RI高速冷冻离心机,SY-1000E多用途恒温超声提取机。

1.2 实验方法

1.2.1 BG11培养基配方

1.5 g/L NaNO₃,0.04 g/L K₂HPO₄,0.075 g/L MgSO₄·7H₂O,0.036 g/L CaCl₂·2H₂O,0.006 g/L 柠檬酸,0.006 g/L 柠檬酸铁铵,0.001 g/L EDTA·Na₂,0.02 g/L Na₂CO₃,2.86 g/L H₃BO₃,1.18 g/L MnCl₂·4H₂O,0.222 g/L ZnSO₄·7H₂O,0.39 g/L NaMoO₄·2H₂O,0.079 g/L CuSO₄·H₂O,0.049 4 g/L CO(NO₃)₂·6H₂O。

1.2.2 培养方法

实验采用柱状玻璃管进行培养,装液量为0.7 L,接种比例1:10(体积比),光照周期D:L=12:12,光照强度8 000 lx。pH 7.0±0.2,培养温度(27±2)℃,通入无菌空气,通气量为40 L/h。以BG11为基础培养基,设定质量浓度分别为0、0.75、1.50、2.25、3.00、3.75 g/L的NaNO₃为氮源,其他成分均不变。质量浓度分别为0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 g/L的K₂HPO₄为磷源,其他成分均不变。质量浓度分别为0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 g/L

的Na₂CO₃为碳源,其他成分均不变。质量浓度分别为0、0.009、0.018、0.036、0.054、0.072 g/L的CaCl₂·2H₂O为钙源,其他成分均不变。每组质量浓度各做3组平行。培养过程中,每隔24 h取样,通过紫外分光光度计测定其OD₆₈₀,培养时间15 d。

1.2.3 生物量的测定

培养15 d结束后,收集藻液,在8 000 r/min离心3 min,所得藻泥用去离子水洗涤3次以去除无机盐。然后将收获的藻泥冷冻干燥,保存在-20℃冰箱中备用。生物量按下式计算。

$$P = M/V$$

式中:P为生物量,g/L;M为干燥微藻的质量,g;V为培养液的体积,L。

1.2.4 油脂含量和油脂产量的测定

参照Luyen等^[12]的方法(略有修改)对总脂进行提取和测定。称取一定量的藻粉,加入氯仿-甲醇-水(体积比1:2:0.8),超声提取,离心后取上清,重复提取至藻粉灰白。合并上清液,加入氯仿和水至氯仿与甲醇、水三者体积比为1:1:0.9,离心,取下层置于干净玻璃瓶中,氮吹仪吹干至恒重。微藻的油脂含量和油脂产量按下式计算。

$$\text{油脂含量} = \text{油脂质量} / \text{微藻干重} \times 100\%$$

$$\text{油脂产量} = \text{油脂含量} \times \text{微藻生物量}$$

1.2.5 数据处理与分析

结果以“平均值±标准差”表示,数据统计分析采用SPSS Statistics 20.0和ANOVA($p < 0.05$)进行分析,制图采用Origin Pro 9.0软件。

2 结果与分析

2.1 NaNO₃对微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 生长和油脂积累的影响

微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 在不同质量浓度NaNO₃中的生长曲线见图1。

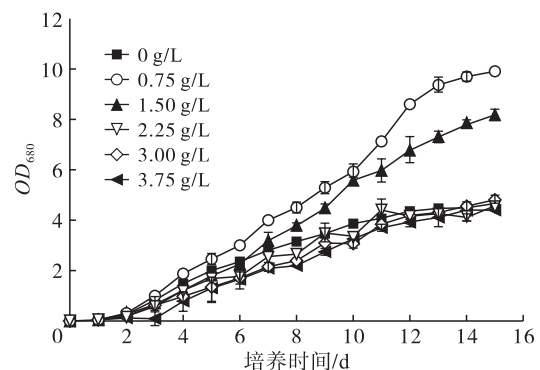


图1 微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 在不同质量浓度NaNO₃中的生长曲线

由图1可以看出,整体上NaNO₃质量浓度为0.75 g/L时,微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 生长最快,

其次是 1.50 g/L(原培养基质量浓度), NaNO_3 质量浓度超过 1.50 g/L 时, 微藻生长较未添加 NaNO_3 的对照组的慢。

培养 15 d 后, 测定不同 NaNO_3 质量浓度下微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 生长及油脂积累情况, 结果见表 1。

表 1 培养 15 d 后不同 NaNO_3 质量浓度下微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 生长及油脂积累情况

NaNO_3 质量浓度/(g/L)	生物量/(g/L)	油脂含量/%	油脂产量/(g/L)
0.00	1.15 ± 0.16^c	16.99 ± 1.12^e	0.19 ± 0.005^b
0.75	1.67 ± 0.12^a	31.49 ± 0.55^a	0.53 ± 0.009^a
1.50	1.50 ± 0.24^b	29.61 ± 1.18^b	0.44 ± 0.018^b
2.25	1.07 ± 0.17^c	27.01 ± 0.72^c	0.29 ± 0.008^c
3.00	1.21 ± 0.27^{bc}	22.47 ± 0.43^d	0.27 ± 0.005^c
3.75	0.98 ± 0.10^c	26.14 ± 1.05^e	0.25 ± 0.01^c

注: 表中每列不同字母表示差异显著($p < 0.05$)。下同。

由表 1 可以看出, 培养 15 d 后, 微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 的生物量在 NaNO_3 质量浓度为 0.75 g/L 达到最高, 为 (1.67 ± 0.12) g/L, 是空白对照组的 1.45 倍。 NaNO_3 质量浓度为 3.75 g/L 时, 生物量最低, 为 (0.98 ± 0.10) g/L。当 NaNO_3 质量浓度为 0.75 g/L 时, 油脂含量和油脂产量达到最高, 分别为 $(31.49 \pm 0.55)\%$ 和 (0.53 ± 0.009) g/L, 高于原培养基质量浓度(1.50 g/L)的。之后随 NaNO_3 质量浓度升高, 油脂含量和油脂产量整体降低, 说明微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 在低氮浓度培养条件下有利于油脂的积累, 原因可能是由于氮是构成蛋白质和核酸的主要成分, 而在氮限制的条件下, 合成蛋白质和核酸减少, 而大量合成油脂, 从而导致油脂含量升高^[13]。有研究表明, 氮限制有利于油脂的积累^[14], 本研究的结果与其一致。由此可见, NaNO_3 质量浓度为 0.75 g/L 最有利于微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 生长和油脂积累。

2.2 K_2HPO_4 对微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 生长和油脂积累的影响

微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 在不同质量浓度 K_2HPO_4 中的生长曲线见图 2。

由图 2 可以看出, 在最初 7 d 的培养过程中, 各组生长差异较小, 培养 7 d 后, K_2HPO_4 质量浓度分别为 0.04 g/L(原培养基质量浓度)和 0.02 g/L 的微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 生长较快, K_2HPO_4 质量浓度分别为 0.06、0.08、0.10 g/L 时, 微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 生长较为缓慢, 可能是由于磷浓度过高, 使得氮磷比例失调, 导致藻细胞生长繁殖受

到磷的限制^[15]。空白对照组在 7 d 后开始生长缓慢, 可能是由于磷源不足, 限制了微藻的繁殖生长。

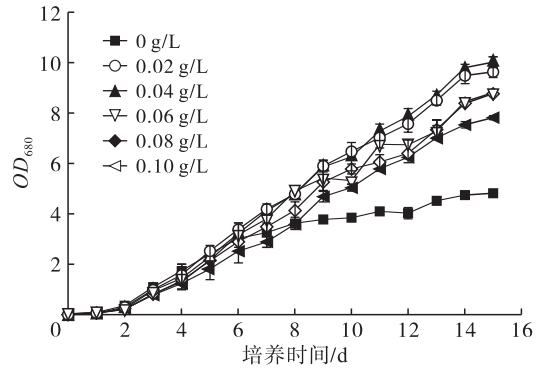


图 2 微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 在不同质量浓度 K_2HPO_4 中的生长曲线

培养 15 d 后, 测定不同 K_2HPO_4 质量浓度下微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 生长及油脂积累情况, 结果见表 2。

表 2 培养 15 d 后不同 K_2HPO_4 质量浓度下微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 生长及油脂积累情况

K_2HPO_4 质量浓度/(g/L)	生物量/(g/L)	油脂含量/%	油脂产量/(g/L)
0.00	1.42 ± 0.09^c	17.66 ± 0.48^e	0.25 ± 0.007^e
0.02	2.12 ± 0.20^a	28.91 ± 0.42^a	0.61 ± 0.009^a
0.04	2.14 ± 0.11^a	22.64 ± 0.29^e	0.48 ± 0.006^c
0.06	2.04 ± 0.13^{ab}	25.68 ± 0.98^b	0.51 ± 0.011^b
0.08	2.04 ± 0.25^{ab}	22.92 ± 0.37^c	0.47 ± 0.008^c
0.10	1.91 ± 0.16^b	20.88 ± 0.03^d	0.40 ± 0.001^d

由表 2 可以看出, 培养 15 d 后, 微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 的生物量在 K_2HPO_4 质量浓度为 0.04 g/L 时最高, 为 (2.14 ± 0.11) g/L, 与 0.02、0.06、0.08 g/L 组无显著差异($p > 0.05$), 但显著高于 0.10 g/L 组($p < 0.05$)。不同质量浓度的 K_2HPO_4 对微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 油脂含量和油脂产量影响显著($p < 0.05$)。当 K_2HPO_4 质量浓度为 0.02 g/L 时, 藻细胞内油脂含量最高, 为 $(28.91 \pm 0.42)\%$, 与各组之间具有显著性差异($p < 0.05$)。而空白对照组油脂含量最低, 为 $(17.66 \pm 0.48)\%$ 。说明一定量的磷有利于油脂的积累。 K_2HPO_4 质量浓度为 0.02 g/L 时, 藻细胞油脂产量最高, 为 (0.61 ± 0.009) g/L, 可以得出, K_2HPO_4 质量浓度为 0.02 g/L 时, 生物量与 0.04 g/L 组无显著差异, 但可以获得最高的油脂含量和油脂产量。

磷对微藻油脂积累的影响因藻种而异, 许多微藻在磷限制条件下可以大量积累油脂, 如鲁兹巴夫藻、角毛藻和三角褐指藻。但有部分微藻在磷限制条件下油脂含量减少, 如微绿球藻和融合微藻^[16]。

本研究结果表明,降低 K_2HPO_4 质量浓度可以促进微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 油脂的积累。微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 生长和油脂积累最适的 K_2HPO_4 质量浓度为 0.02 g/L。

2.3 Na_2CO_3 对微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 生长和油脂积累的影响

微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 在不同质量浓度的 Na_2CO_3 中的生长曲线见图 3。

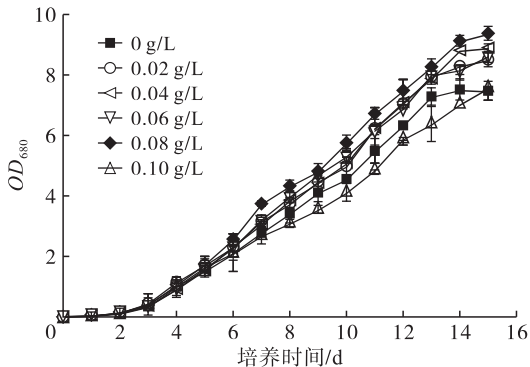


图3 微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 在不同质量浓度的 Na_2CO_3 中的生长曲线

由图3可知,在最初6 d的培养过程中,各组生长差异不明显,培养6 d后, Na_2CO_3 质量浓度为 0.08 g/L时,微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 生长最快。超过此质量浓度,微藻细胞的生长繁殖受到抑制,原因可能是 Na_2CO_3 质量浓度过高,导致 pH 升高,使微藻生长缓慢^[17]。

培养15 d后,测定不同 Na_2CO_3 质量浓度下的微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 生长及油脂积累情况,结果见表3。

表3 培养15 d后不同 Na_2CO_3 质量浓度下微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 生长及油脂积累情况

Na_2CO_3 质量浓度/(g/L)	生物量/(g/L)	油脂含量/%	油脂产量/(g/L)
0.00	1.87 ± 0.15^b	21.03 ± 0.60^d	0.39 ± 0.011^f
0.02	2.04 ± 0.20^{ab}	21.66 ± 0.33^d	0.44 ± 0.008^c
0.04	2.07 ± 0.11^{ab}	29.35 ± 0.62^b	0.61 ± 0.008^b
0.06	2.05 ± 0.09^{ab}	25.87 ± 0.86^c	0.53 ± 0.007^d
0.08	2.29 ± 0.16^a	29.68 ± 0.45^{ab}	0.68 ± 0.007^a
0.10	1.90 ± 0.14^b	30.31 ± 0.76^a	0.57 ± 0.006^c

由表3可以看出,培养15 d后,微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 的生物量在 Na_2CO_3 质量浓度为 0.08 g/L后,达到最高,为 (2.29 ± 0.16) g/L。不同质量浓度的 Na_2CO_3 对微藻油脂含量和油脂产量的影响显著 ($p < 0.05$),当 Na_2CO_3 质量浓度为 0.10 g/L时,微藻油脂含量最高,为 $(30.31 \pm 0.76)\%$, Na_2CO_3 质量浓度为 0.08 g/L时,藻细胞油脂产量最高,为

(0.68 ± 0.007) g/L。综上,适量地添加碳源,能够明显促进微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 的生长和油脂积累,与李爱芬等^[18]报道的添加适量无机碳能促进藻类的生长和油脂积累结果一致。当 Na_2CO_3 质量浓度为 0.08 g/L时,微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 既能获得较高的生物量,又可以获得最高的油脂产量。由此可见, Na_2CO_3 质量浓度为 0.08 g/L 是微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 生长和油脂积累的最佳质量浓度。

2.4 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 对微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 生长和油脂积累的影响

微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 在不同质量浓度 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 中的生长曲线见图4。

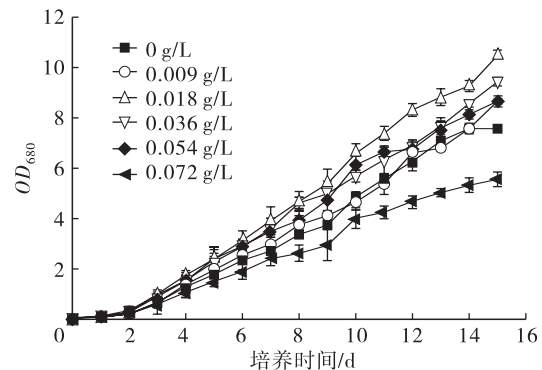


图4 微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 在不同质量浓度 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 中的生长曲线

由图4可知,在培养过程中,随着 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 质量浓度的增加,微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 的生物量呈现出先升高后降低的趋势。

培养15 d后,不同 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 质量浓度下微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 生长及油脂积累情况见表4。

表4 培养15 d后不同 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 质量浓度下微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 生长及油脂积累情况

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 质量浓度/(g/L)	生物量/(g/L)	油脂含量/%	油脂产量/(g/L)
0.000	1.88 ± 0.16^{cd}	27.40 ± 0.18^b	0.52 ± 0.004^{cd}
0.009	2.09 ± 0.09^{bc}	28.00 ± 0.26^b	0.59 ± 0.006^b
0.018	2.53 ± 0.18^a	30.89 ± 1.54^a	0.78 ± 0.039^a
0.036	2.26 ± 0.14^b	23.40 ± 0.71^c	0.53 ± 0.016^c
0.054	2.10 ± 0.20^b	22.95 ± 0.30^c	0.48 ± 0.006^d
0.072	1.67 ± 0.07^d	20.55 ± 0.29^d	0.34 ± 0.005^e

由表4可知,培养15 d后,当 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 质量浓度为 0.018 g/L时,微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 的生物量最高,为 (2.53 ± 0.18) g/L,是空白对照组的1.35倍,0.036 g/L组次之,两者之间具有显著性差异 ($p < 0.05$), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 质量浓度为 0.072 g/L

时,生物量最低,为 (1.67 ± 0.07) g/L,说明过高或过低的钙浓度都不利于微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 生长。不同质量浓度的 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 对油脂含量和油脂产量的影响显著($p < 0.05$),当 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度为 0.018 g/L 时,微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 油脂含量和油脂产量最高,分别为 $(30.89 \pm 1.54)\%$ 和 (0.78 ± 0.039) g/L,显著高于其他组($p < 0.05$)。 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度为 0.072 g/L,油脂含量和油脂产量最低,分别为 $(20.55 \pm 0.29)\%$ 和 (0.34 ± 0.005) g/L。因此,微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 细胞生长和油脂积累的最佳 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度为 0.018 g/L。在钙限制条件下,微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 油脂含量增加,与文献[19]报道的钙限制有利于油脂积累的结果一致。有研究表明,钙限制导致油脂升高的原因可能是在钙限制的条件下,藻细胞生长缓慢,合成其他物质减少,光合作用产物基本都用于合成油脂^[20]。

3 结论

本实验以 BG11 为基础培养基,通过单因素实验,研究了培养基中不同质量浓度的 NaNO_3 、 K_2HPO_4 、 Na_2CO_3 和 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 对微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 生长和油脂积累的影响,确定了培养基中氮盐(NaNO_3)、磷酸盐(K_2HPO_4)、碳酸盐(Na_2CO_3)和钙盐($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)的最佳质量浓度分别为 0.75 、 0.02 、 0.08 g/L 和 0.018 g/L。

参考文献:

[1] DALAY M C, GUNES S S. Biodiesel from microalgae: a renewable energy source [J]. Middle East J Sci Res, 2014, 21(12):2308-2314.

[2] AHMAD A L, YASIN N H M, DEREK C J C, et al. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: a review[J]. Ren Sustain Energ Rev, 2011, 15(1):584-593.

[3] 曾玲,文菁,徐春曼. 氮、磷对微藻生长和产毒的影响[J]. 湛江师范学院学报, 2011, 32(6):103-108.

[4] 何思思,高保燕,雷学青,等. 初始硝酸钠浓度对魏氏真眼点藻的生长、形态和油脂积累的影响[J]. 水生生物学报, 2015, 39(3):574-582.

[5] 江怀真,张维,刘天中,等. 氮、磷浓度对小球藻生长及油脂积累的影响[J]. 食品工业科技, 2011, 32(6):204-207.

[6] PANCHA I, CHOKSHI K, GEORGE B, et al. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in

the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077 [J]. Biore-sour Technol, 2014, 156(2):146-154.

[7] SHAKYA R, WHELEN J, ADHIKARI S, et al. Effect of temperature and Na_2CO_3 catalyst on hydrothermal liquefaction of algae[J]. Algal Res, 2015, 12: 80-90.

[8] 李林,朱伟,罗永刚. 钙、镁离子在水流作用下对铜绿微囊藻生长的影响[J]. 环境科学与技术, 2012, 35(5):9-13.

[9] 张森,刘平怀,王影,等. 铁、镁及钙对微藻 *Desmodesmus* sp. WC08 生长和油脂积累的影响[J]. 广东农业科学, 2014, 41(4):126-130.

[10] LIU Z Y. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris* [J]. Bioresour Technol, 2008, 99: 4717-4722.

[11] 叶丽,蒋霞敏,毛欣欣,等. 温度、光、盐对三角褐指藻紫外诱变株生长、总脂及脂肪酸的影响[J]. 生态学杂志, 2015, 34(2):454-462.

[12] LUYEN H Q, CHO J Y, SHIN H W, et al. Microalgal growth enhancement by levoglucosan isolated from the green seaweed *Monostroma nitidum* [J]. J Appl Phycol, 2007, 19(2):175-180.

[13] 林学政,李光友. 环境因子对微藻脂类的影响[J]. 黄渤海海洋, 1999(4):54-59.

[14] 刘敏,黄惠琴,孙漫,等. 不同营养条件对热带海洋富油微藻生长和油脂产量的影响[J]. 中国油脂, 2014, 39(8):64-68.

[15] 朱明,张学成,茅云翔. 海链藻对氮磷需求量的研究[J]. 水产养殖, 2004, 25(1):33-36.

[16] REITAN K I, RAINUZZO J R, OLSEN Y. Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae[J]. J Phycol, 2010, 30(6):972-979.

[17] 张森,华美云,杨渝杰,等. 影响富油微藻高密度培养及产油因素研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2014(3):169-175.

[18] 李爱芬,刘然,刘晓娟,等. 碳源对粉核油球藻生长和脂肪酸组成特性的影响[J]. 水生生物学报, 2009, 33(3):461-467.

[19] GORAIN P C, BAGCHI S K, MALLICK N. Effects of calcium, magnesium and sodium chloride in enhancing lipid accumulation in two green microalgae[J]. Environ Technol, 2013, 34(13/14):1887-1894.

[20] HU Q, SOMMERFELD M, JARVIS E, et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances[J]. Plant J, 2010, 54(4):621-639.