

## 研究报告

氮源类型和水平对 3 株球状绿藻生长、油脂和花生四烯酸  
积累的影响

孟鸽 黄罗冬 高保燕 张成武\*

(暨南大学生态学系水生生物研究中心 广东 广州 510632)

**摘要:**【背景】缺刻叶球藻(*Lobosphaera incisa* Reising)是一种单细胞球状绿藻,是已知花生四烯酸(Arachidonic acid, AA)含量最丰富的植物资源之一。然而目前其分类和命名仍然较为混乱。

【目的】明确 3 株球状绿藻(SAG2468、SAG2043、H4301)的分类地位及在不同氮源(硝酸钠、尿素、碳酸氢铵、碳酸铵、硝酸铵、氯化铵和硫酸铵)和氮浓度(18 mmol/L, 3 mmol/L)条件下油脂和 AA 积累的特性。【方法】通过分子系统学和形态观察的方法对 3 株球状绿藻进行分类界定;采用干重法、重量法和气相色谱分析的方法分别对其生物量、油脂含量、脂肪酸组成及 AA 含量进行测定。【结果】3 株球状绿藻均隶属于叶球藻属(*Lobosphaera*), SAG2468 原定名为缺刻缘绿藻(*Parietochloris incisa*),现修订为缺刻叶球藻(*Lobosphaera incisa*),与 H4301 为缺刻叶球藻的不同地理株系。SAG2043 原定名为双隔蚁形藻(*Myrmecia bisecta*),现修订为双隔叶球藻(*Lobosphaera bisecta*)。3 株微藻在高氮(18 mmol/L)和低氮(3 mmol/L)浓度的硝酸钠和尿素培养条件下均可良好生长,铵盐对藻细胞生长普遍有抑制作用,且浓度越高抑制作用越显著。低氮胁迫能显著促进油脂和 AA 的积累( $P<0.05$ ), SAG2043 在 3 mmol/L 硝酸钠条件下油脂和 AA 产率最高,分别为 142.15 mg/(L·d)和 35.51 mg/(L·d),明显高于另外 2 株微藻( $P<0.05$ )。此时 SAG2043 对应获得的生物量为 4.9 g/L,油脂含量为 43.49%,AA 含量高达干重的 10.86%,占总脂肪酸含量的 31.75%。【结论】SAG2043 是一株更具 AA 开发潜力的微藻。

**关键词:** 球状绿藻, 叶球藻属, 氮源类型和水平, 总脂, 花生四烯酸

**Foundation items:** National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (2013AA065805); National Natural Science Foundation of China (31170337); Guangdong Low-carbon Program (2011-051); Major Science and Technology Project of Zhuhai City (PB20041018); Science and Technology Project of Zhuhai City (PC20081008)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-20-85222025; E-mail: tzhgwcw@jnu.edu.cn

**Received:** January 26, 2018; **Accepted:** March 14, 2018; **Published online** (www.cnki.net): March 22, 2018

**基金项目:** 国家高技术研究发展计划(863 计划) (2013AA065805); 国家自然科学基金(31170337); 广东省低碳专项(2011-051); 珠海市科技重大项目(PB20041018); 珠海市科技攻关项目(PC20081008)

**\*通信作者:** Tel: 86-20-85222025; E-mail: tzhgwcw@jnu.edu.cn

**收稿日期:** 2018-01-26; **接受日期:** 2018-03-14; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-03-22

## Effects of nitrogen sources and levels on the growth and accumulation of lipids and arachidonic acid of three coccoid green algae

MENG Ge HUANG Luo-Dong GAO Bao-Yan ZHANG Cheng-Wu\*

(Research Center for Hydrobiology, Department of Ecology, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China)

**Abstract: [Background]** *Lobosphaera incisa* Reisingl is a unicellular coccoid green algae, one of the richest plant source of arachidonic acid (AA). However, its taxonomic position has been unclear so far. **[Objective]** The taxonomy of three coccoid green algae (SAG2468, SAG2043 and H4301) with similar morphology were clarified, and the effects of different nitrogen sources ( $\text{NaNO}_3$ ,  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ ,  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) and levels (18 mmol/L, 3 mmol/L) on their lipids and AA accumulation were analysed. **[Methods]** Molecular and morphology identification were used to analyse the taxonomic position of the three strains; dry weight, gravimeter and gas chromatographic analyses were used to determine the biomass concentration and the content of total lipids (TLs) and AA. **[Results]** The three strains all belonged to the genus of *Lobosphaera*. *Parietochloris incisa* SAG2468 was revised to *Lobosphaera incisa*; SAG2468 and H4301 were the different geographical strains of *L. incisa*. *Myrmecia bisecta* SAG2043 was revised to *Lobosphaera bisecta*. The high (18 mmol/L) and low (3 mmol/L) nitrogen concentration of  $\text{NaNO}_3$  and  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$  were all suitable for the growth of these three strains. Ammonium as nitrogen source inhibited the growth of algae, and the higher the concentration, the more inhibition. Low-nitrogen concentration could promote TLs and AA accumulation in all strains significantly ( $P < 0.05$ ). The remarkable TLs and AA volumetric productivities of 142.15 mg/(L·d) and 35.51 mg/(L·d) were obtained in SAG2043 at 3 mmol/L  $\text{NaNO}_3$ , significantly higher than those of H4301 and SAG2468 ( $P < 0.05$ ). Under these conditions, the corresponding biomass concentration was 4.9 g/L, the TLs reached 43.49% and the AA contents were up to 10.86% of dry weight and 31.75% of the total fatty acids in SAG2043. **[Conclusion]** SAG2043 showed a more prominent advantage to AA production.

**Keywords:** Coccoid green algae, *Lobosphaera*, Nitrogen sources and levels, Total lipids, Arachidonic acid

花生四烯酸(Arachidonic acid, AA, 20:4n3)是人体条件性必需的多不饱和脂肪酸,作为信号转导酶调控中的脂质信使或类花生酸的前体(特别是白三烯、前列腺素和血栓素)在细胞信号传导中起重要作用<sup>[1]</sup>,在克服情绪低落、增加肌肉量和辅助治疗关节炎等方面具有明显的效果<sup>[2]</sup>。AA 主要来源于古柏阿苏果油(*Cupuassu butter*)。

缺刻叶球藻(*Lobosphaera incisa* Reisingl)隶属于绿藻门(Chlorophyta)共球藻纲(Trebouxiophyceae),是一种单细胞球状绿藻,它是目前已知 AA 含量最丰富的植物资源之一。研究证实,缺氮条件下,缺刻叶球藻 AA 含量高达细胞干重的 21%,占总脂肪酸含量的 59%<sup>[3]</sup>。关于该藻的分类地位一直颇受争议,第一个与地衣光合共生的球状绿藻新种比亚托

蚁形藻(*Myrmecia biatorellae*)于 1948 年由 Tschermak-Woess 等<sup>[4]</sup>发现,其主要特征被概括为孤立的球形细胞、具有二分裂的杯状顶叶叶绿体、蛋白核缺失等,该种也成为地衣共生藻或非共生球状土壤绿藻的模式种。1964 年 Reisingl<sup>[5]</sup>根据光学显微镜下的形态特征与上述特征相符,首次将缺刻叶球藻命名为缺刻蚁形藻(*Myrmecia incisa*),1996 年 Watanabe 等<sup>[6]</sup>根据在日本高山分离的一株球状绿藻的细胞学和超微结构特征,重命名为缺刻缘绿藻(*Parietochloris incisa*),主要区别是后者具有蛋白核且游动孢子的鞭毛基粒呈逆时针方向。近年来以 18S rRNA 基因开展的分子系统学将该种最新修订为缺刻叶球藻(*L. incisa*)<sup>[7-8]</sup>。该种在世界范围内均有报道,栖息地广泛,生境差异很大,目前国际上关于该种及其种内

多样性的研究较少,分类和命名较为混乱。

Lang 等<sup>[9]</sup>研究报道双隔蚁形藻(*Myrmecia bisecta* SAG2043)在特定培养条件下 AA 含量高达总脂肪酸的 51.8%; Řezanka 等<sup>[10]</sup>研究发现,该藻株 AA 含量可达到总脂肪酸含量的 52.1%。因此双隔蚁形藻也是一株 AA 含量较高的微藻,目前关于该藻积累 AA 的报道较少。形态上,缺刻叶球藻与双隔蚁形藻营养细胞形态十分相似,鉴于此,1978 年 Andreyeva 等<sup>[11]</sup>将包括这 2 个种在内的 7 株球状土壤绿藻划分到蚁形藻属(*Myrmecia*),1995 年 Friedl<sup>[12]</sup>根据游动孢子形态学和 18S rRNA 基因系统发育分析认为双隔蚁形藻的游动孢子类型与该属其他成员差别很大,在基于 18S rRNA 基因序列进化树的位置也孤立于该属之外,认为该种不属于蚁形藻属,但其分类地位不详。由此可看出,由于形态上的相似性,致使这几株微藻的分类争议多出现在 3 个属,即叶球藻属(*Lobosphaera*)、蚁形藻属(*Myrmecia*)和缘绿藻属(*Parietochloris*)。

氮是微藻生长和代谢必需的元素之一,也是最常用的胁迫因子,对微藻的生长和油脂代谢有显著的影响。硝酸盐是微藻培养最常用的氮源,Li 等<sup>[13]</sup>研究不同氮源和氮浓度对富油新绿藻(*Neochloris oleoabundans*)生长及总脂积累的影响表明,硝酸钠是最佳氮源形式,最大生物量浓度在 10 mmol/L 时获得为 3.15 g/L,而降低氮浓度总脂产率显著提高,在 5 mmol/L 时最大为 0.40 g/L。铵盐是能量上最有优势的氮源形式,Xu 等<sup>[14]</sup>研究发现升高铵盐浓度有利于真眼点藻纲椭圆藻属(*Ellipsoidion* sp.)获得更高的生长速率,同时油脂含量及 EPA 含量也高于硝酸钠和尿素存在的条件下。尿素普遍用于农业生产,成本较低。Hsieh 等<sup>[15]</sup>通过采用半连续添加尿素的培养方式使小球藻属(*Chlorella* sp.)获得更高的生长速率和油脂含量。由此可见 3 种氮源各有优势,而不同藻株有不同的生理特性,对氮源和氮浓度的需求及耐受能力有所差异。

本研究选取 3 株具有分类争议的典型球状绿藻——分离自日本 Tateyama 高山雪地的缺刻缘绿

藻(*P. incisa* SAG2468)、捷克泥炭沼泽的缺刻叶球藻(*L. incisa* H4301)和意大利松树林土壤的双隔蚁形藻(*M. bisecta* SAG2043)作为研究对象。本实验室前期研究发现三者有相似的形态特征和繁殖方式,均可以积累一定含量的油脂和 AA。在此基础上,3 株球状绿藻分类地位、亲缘关系如何? 积累油脂和 AA 的特性是否存在差异值得探讨。因此,本文采用分子系统学方法并结合相关形态学和生理学特征对 3 株微藻进行分类学鉴定;另一方面,通过比较不同氮源和氮浓度条件下生长、总脂及 AA 积累情况,以期筛选出一株生长快、油脂、AA 产率较高的优势藻株,为 AA 种质资源的鉴定与筛选提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

缺刻缘绿藻(*Parietochloris incisa* (Reisigl) Watanabe SAG2468)和双隔蚁形藻(*Myrmecia bisecta* (Reisigl) SAG2043)购自 Culture Collection of Algae (SAG) at Göttingen University (<http://www.uni-goettingen.de/en/45175.html>)。缺刻叶球藻(*Lobosphaera incisa* (Reisigl) Karsten CAUP H4301)购自 Culture Collection of Algae (CAUP) of Charles University Prague (<http://botany.natur.cuni.cz/algo/caup-list.html>)。

### 1.2 主要试剂和仪器

硝酸钠、尿素、碳酸氢铵、碳酸铵、硝酸铵、硫酸铵、氯化铵、二甲基亚砷、甲醇、乙醚、甲苯等,广州化学试剂厂;正己烷(色谱纯),Honeywell 公司;十七烷酸(C<sub>17:0</sub>),Sigma 公司;植物基因组提取试剂盒、PCR 扩增反应试剂, TaKaRa 公司;引物由北京六合华大基因科技有限公司合成。

光学显微镜,奥林巴斯公司;高速冷冻离心机,久保田公司;冷冻干燥机,CHRIST 公司;氮吹仪,Organomation 公司;气相色谱仪和气相色谱柱,安捷伦公司;凝胶成像分析仪和 PCR 仪, Bio-Rad 公司。

### 1.3 实验设计

BG-11 培养基为基础培养基,培养基配制时分

别选用 7 种氮源:  $\text{NaNO}_3$ 、 $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ 、 $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  和  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 氮浓度为 18.0 mmol/L (高氮) 和 3.0 mmol/L (低氮)。以内径为 4.5 cm 的柱状光生物反应器(体积约 1 000 mL) 进行培养, 培养温度为  $24 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ , 光照强度为  $300 \pm 10\text{ }\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  单侧连续光照, 富含 1.0%  $\text{CO}_2$  的压缩空气持续搅拌培养。取对数生长期(约 5 d) 的藻液接种, 初始接种浓度为  $OD_{750} = 0.70 \pm 0.02$ , 培养周期为 15 d, 每个实验组设置 3 个平行。

## 1.4 实验方法

### 1.4.1 藻细胞的形态观察

每天定时取样、制片, 使用光学显微镜观察藻细胞不同繁殖形态和细胞内油体形成过程。

### 1.4.2 藻粉和藻泥的制备

培养结束后, 用于测定总脂及总脂肪酸含量的样品制成藻粉, 3 000 r/min 离心 5 min 收集藻泥, 置于  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  冷冻结冰, 用冷冻干燥机抽干, 置于  $4\text{ }^\circ\text{C}$  保存备用; 用于 DNA 提取的样品制成藻泥, 取无菌培养至对数期的藻细胞,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、5 500 r/min 离心 10 min, 用灭菌的去离子水洗涤 2 次, 再次离心收集藻泥, 立即用液氮冻存于  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 。

### 1.4.3 生物量、总脂含量和总脂肪酸组成与含量的测定

生物量的测定采用干重法, 培养 15 d 结束后取 10 mL 藻液进行测定, 具体步骤及计算方法见文献[16]。总脂含量的测定采用有机溶剂萃取-重量法, 适当改进 Khozin-Goldberg<sup>[17]</sup>方法提取总脂, 改

进后详细的说明见参考文献[18], 计算公式为: 总脂含量(%)=(总脂质量/干藻粉质量) $\times 100$ 。采用原位酯交换法提取总脂肪酸, 参考 Cohen 等<sup>[19]</sup>方法, 加入 2 mL 含有 2%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  的无水甲醇-甲苯(1:1, 体积比) 混合液后  $80\text{ }^\circ\text{C}$  磁力搅拌 1.5 h。采用气相色谱分析的方法检测分析样品, 具体检测条件见参考文献[16]。通过标准品脂肪酸( $\text{C}_{17:0}$ ) 出峰时间标定各脂肪酸的出峰时间和顺序, 根据面积归一法计算得到各脂肪酸相对含量(占总脂肪酸)。按下式计算各脂肪酸绝对含量(占干重): 某脂肪酸绝对含量(%)=某脂肪酸相对含量 $\times 250 \times 10^{-3}/(\text{C}_{17:0}$  相对含量 $\times 25) \times 100$ 。

### 1.4.4 单位体积总脂和 AA 产率

总脂或 AA 产率 $[\text{g}/(\text{L} \cdot \text{d})]$ =总脂或 AA 绝对含量(%) $\times$ 生物量(g/L)/培养时间(d)。

### 1.4.5 DNA 提取、18S rRNA 基因序列扩增及测序

按照试剂盒说明提取基因组 DNA, 用于扩增 18S rRNA 基因(sF 和 sR)、*rbcL* (rF 和 rR) 和 ITS (iF 和 iR) 的引物引自相关文献[20-23] (表 1)。50  $\mu\text{L}$  PCR 反应体系: 模板 DNA (约 50 ng/ $\mu\text{L}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , 正、反向引物(10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 各 2  $\mu\text{L}$ ,  $10\times\text{PCR buffer}$  5  $\mu\text{L}$ , *Taq* 酶(5 U/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , dNTPs (2.5 mmol/L) 4  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 34  $\mu\text{L}$ 。18S rRNA 基因扩增条件:  $95\text{ }^\circ\text{C}$  3 min;  $95\text{ }^\circ\text{C}$  30 s,  $52\text{ }^\circ\text{C}$  45 s;  $72\text{ }^\circ\text{C}$  2 min, 30 个循环;  $72\text{ }^\circ\text{C}$  10 min;  $4\text{ }^\circ\text{C}$  保存。扩增 *rbcL* 和 ITS 条件:  $95\text{ }^\circ\text{C}$  3 min;  $95\text{ }^\circ\text{C}$  30 s,  $52\text{ }^\circ\text{C}$  45 s,  $72\text{ }^\circ\text{C}$  1 min, 30 个循环;  $72\text{ }^\circ\text{C}$  10 min;  $4\text{ }^\circ\text{C}$  保存。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 确认条带清晰无杂带后送华大基因公司测序。

表 1 18S rRNA 基因、*rbcL* 和 ITS 的 PCR 引物

Table 1 Primers of 18S rRNA gene, *rbcL* and ITS genes

引物 Primers	序列 Sequences (5'→3')	长度 Size (bp)
上游引物 Forward primer (sF)	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT	21
下游引物 Reverse primer (sR)	TGATCCTTCTGCAGGTTCACCTAC	24
上游引物 Forward primer (rF)	GGCAGAATCATCAACAGGAA	20
下游引物 Reverse primer (rR)	CATGTGCCAAATGTGAATACC	21
上游引物 Forward primer (iF)	CCGCCCCGCTCGCTCCTACCGATTGGGTGTG	29
下游引物 Reverse primer (iR)	TCCCTTTTCGCTCGCCGTTACTA	23



### 1.4.6 系统发育树的构建

手动删除序列头尾质量不佳的部分, 下载 GenBank 相关序列。利用 MEGA 7.0 进行多序列比对, 去除两端冗余序列, 形成规整矩阵, 基因序列之间遗传距离也通过 MEGA 7.0 计算完成, 采用 N-J (Neighbor-Joining) 法构建系统发育树, 用自展法 (Bootstrap) 检验系统树, 自展数据集为 1 000 次。

### 1.4.7 数据分析

采用 Excel 2010 和 Origin 8.5 分析并作图, 并用 SPSS 17.0 软件对数据进行单因子差异分析, 以  $P < 0.05$  代表差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 形态观察

在不同培养时期光学显微镜下所观察到的 3 株球状绿藻细胞繁殖形态如图 1A、B 和 C 所示。营养细胞形态相似, 呈球形(SAG2043 也常见椭圆形), 单细胞或聚集成不定形群体。细胞直径在  $3\ \mu\text{m}$ – $15\ \mu\text{m}$ , 偶见  $20\ \mu\text{m}$  左右。细胞表面光滑, 具有二分裂的杯状顶叶叶绿体, 以似亲孢子和游动孢子的形式进行繁殖, 游动孢子裸露呈梨形, 前端有一个眼点。形态区别主要表现在繁殖方式的差异等方面,

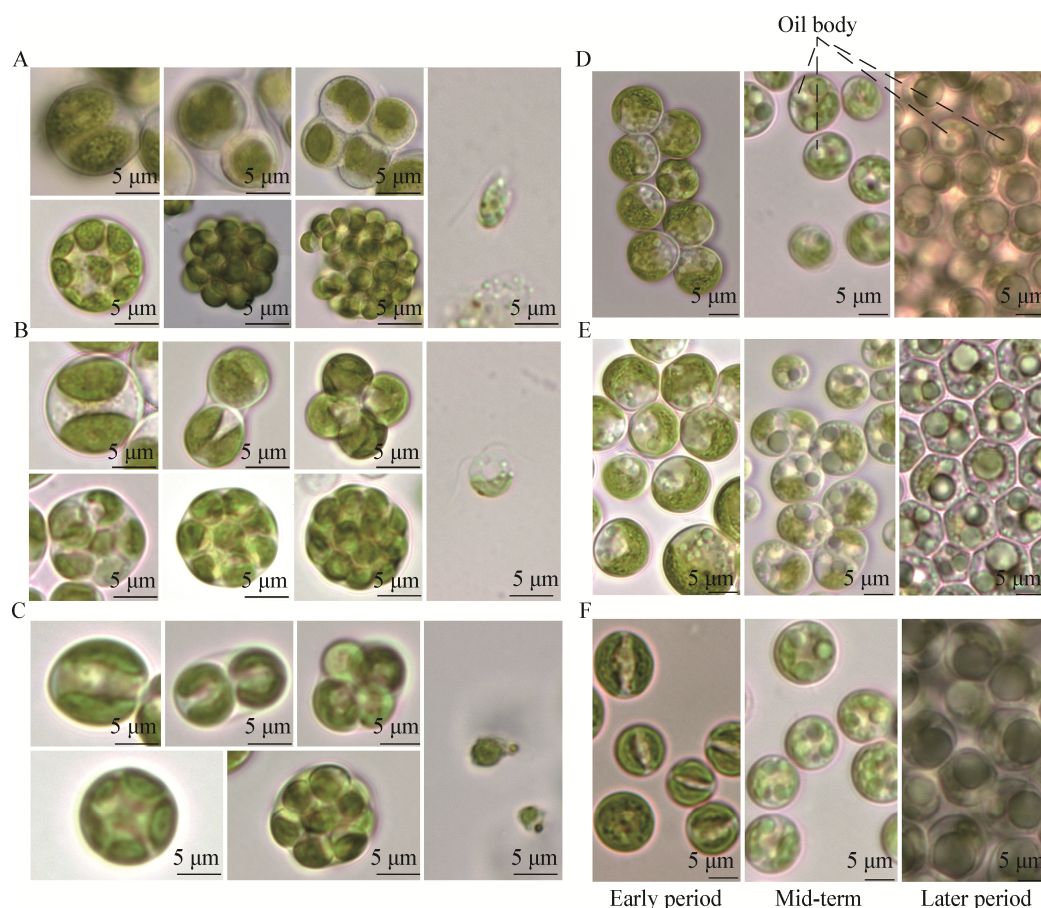


图 1 3 株微藻细胞不同繁殖形态和细胞内油体形成过程

Figure 1 Cells in different reproductive morphology and intracellular oil bodies formation process of the three microalgae

注: A 和 D: SAG2468 细胞形态和油体形成; B 和 E: H4301 细胞形态和油体形成; C 和 F: SAG2043 细胞形态和油体形成。

Note: A and D: Reproduction way and oil bodies formation of *P. incisa* SAG2468; B and E: Reproduction way and oil bodies formation of *L. incisa* CAUP H4301; C and F: Reproduction way and oil bodies formation of *M. bisecta* SAG2043.

SAG2468 细胞分裂时常形成 16 和 32 个似亲孢子; H4301 以 8 个和 16 个为主; SAG2043 以 2 个和 4 个为主。H4301 在 BG11 培养基中培养时, 常伴有大量游动孢子, SAG2468 较少, SAG2043 最少。此外, SAG2043 细胞分裂时常大量聚集在一起呈不定形群体, 因而具有较强的沉降能力, 而 H4301 和 SAG2468 常以单细胞形式存在。H4301 和 SAG2468 的叶绿体颜色相对 SAG2043 更浅一些。图 1D、E 和 F 是一个培养周期内细胞内含物随时相的变化。培养初期细胞内叶绿体清晰可见, 随着氮源的消耗, 叶绿体逐渐解体, 细胞内开始出现数目不等、大小不一的油体, 至培养末期, 油体之间相互融合, 油体变大, 细胞也由最初的鲜绿色转变为暗黄绿色。

## 2.2 系统发育分析

PCR 扩增得到的 H4301 和 SAG2468 的 18S rRNA 基因序列完全相同, 长度为 1 748 bp, SAG 2043 与前二者有 8 个变异位点, 长度为 1 749 bp。下载 GenBank 中包含主要共球藻纲(Trebouxiophyceae)分支的序列, 经 MEGA 软件比对校正后得到 45 条长度为 1 620 bp 的矩阵。扩增得到的 3 株微藻 *rbcL* cpDNA 序列长度均为 900 bp, H4301 和 SAG2468 在 8 bp 处存在一个 C-T 变异, SAG2043 与前二者各有 51、50 个变异位点。下载包含整个共球藻纲的序列共 34 条, 比对校正后的序列长度为 699 bp。对照 GenBank 数据库精确注释后得到 H4301 和 SAG2468 的 ITS 全长为 738 bp, ITS2 长度为 262 bp; SAG2043 的 ITS 全长为 735 bp, ITS2 长度为 266 bp。由于目前提交至 GenBank 中的叶球藻属(*Lobosphaera*) ITS 序列较匮乏, 这使得比较属内亲缘关系较困难, 基于现有 5 条 ITS 序列构建长度为 482 bp 的矩阵。

基于共球藻纲 18S rRNA 基因(图 2)和 *rbcL* (图 3)序列构建的系统发育树基本一致, 整个共球藻纲主要包括以下分支: 小球藻目(*Chlorellales*)、共球藻目(*Trebouxiales*)、渡边藻分支 (*Watanabea* clade)、胶球藻分支(*Coccomyxa* clade)、溪菜分支(*Prasiola* clade)以及一些其他的独立小分支。缺刻缘绿藻(*P. incisa* SAG2468)与缘绿藻属(*Parietochloris*)的其他

物种(*P. alveolaris* 和 *P. pseudoalveolaris*)分为两支, 双隔蚁形藻(*M. bisecta* SAG2043)与蚁形藻属(*Myrmecia*)的其他物种(*M. biatorellae* 和 *M. astigmatic* 等)分为 2 支。3 株微藻均聚于叶球藻属(*Lobosphaera*)这一分支, 但分属到 2 个不同的姐妹支。*rbcL* 进化树显示 SAG2468 与数据库中登录号 KM821265 注释为 *L. incisa* 的物种来源相同, 遗传距离为 0; H4301 与登录号 KM438424 注释为 *L. incisa* 的物种来源相同, 遗传距离为 0; 不同地理来源的 *L. incisa* 以高支持率 100%聚为一支, 遗传距离仅有 0.001。SAG2043 以 100%的高支持率单独居于另一支, 与 H4301 和 SAG2468 的遗传距离分别为 0.058 和 0.059。基于 ITS 序列构建的进化树(图 4)用于比较属内进化关系, 与基于 18S rRNA、*rbcL* 序列构建的进化树一致, H4301 先与登录号 KF898351 注释为 *Lobosphaera* sp. 的物种聚在一起, 遗传距离为 0; 接着与 SAG2468 聚为一支, 遗传距离为 0.011; 然后与 *L. incisa* 的其他株系聚为一支, 种内遗传距离在 0–0.05 之间。SAG2043 则单独居于之外, 与整个 *L. incisa* 群体构成姐妹支, 与 SAG2468、H4301 的遗传距离分别为 0.156 和 0.162。

## 2.3 氮源类型和水平对 3 株微藻生长和总脂含量的影响

3 株微藻在不同氮源和氮水平条件下培养至第 15 天时的生物量和油脂含量如图 5 所示, 3 株微藻在高、低 2 种氮浓度的硝酸钠和尿素培养条件下均可良好生长, 铵盐对藻细胞生长有抑制作用, 且浓度越高抑制越显著。非铵盐组在高氮条件下更有利于生物量的积累, SAG2043 在硝酸钠为氮源时获得最大生物量, 为 5.55 g/L, 略微高于尿素条件下的 5.31 g/L, 两种氮源差异不大。H4301 和 SAG2468 的最大生物量均在尿素培养条件下获得, 分别为 4.72 g/L 和 4.03 g/L, 显著高于硝酸钠组( $P<0.05$ )。低氮条件下, 以硝酸钠、尿素和碳酸氢铵为氮源时的生物量差异不大, 且普遍高于其他几种氮源, SAG2468、H4301 和 SAG2043 在低氮条件下的最大生物量分别为 3.00、3.89 和 4.90 g/L。

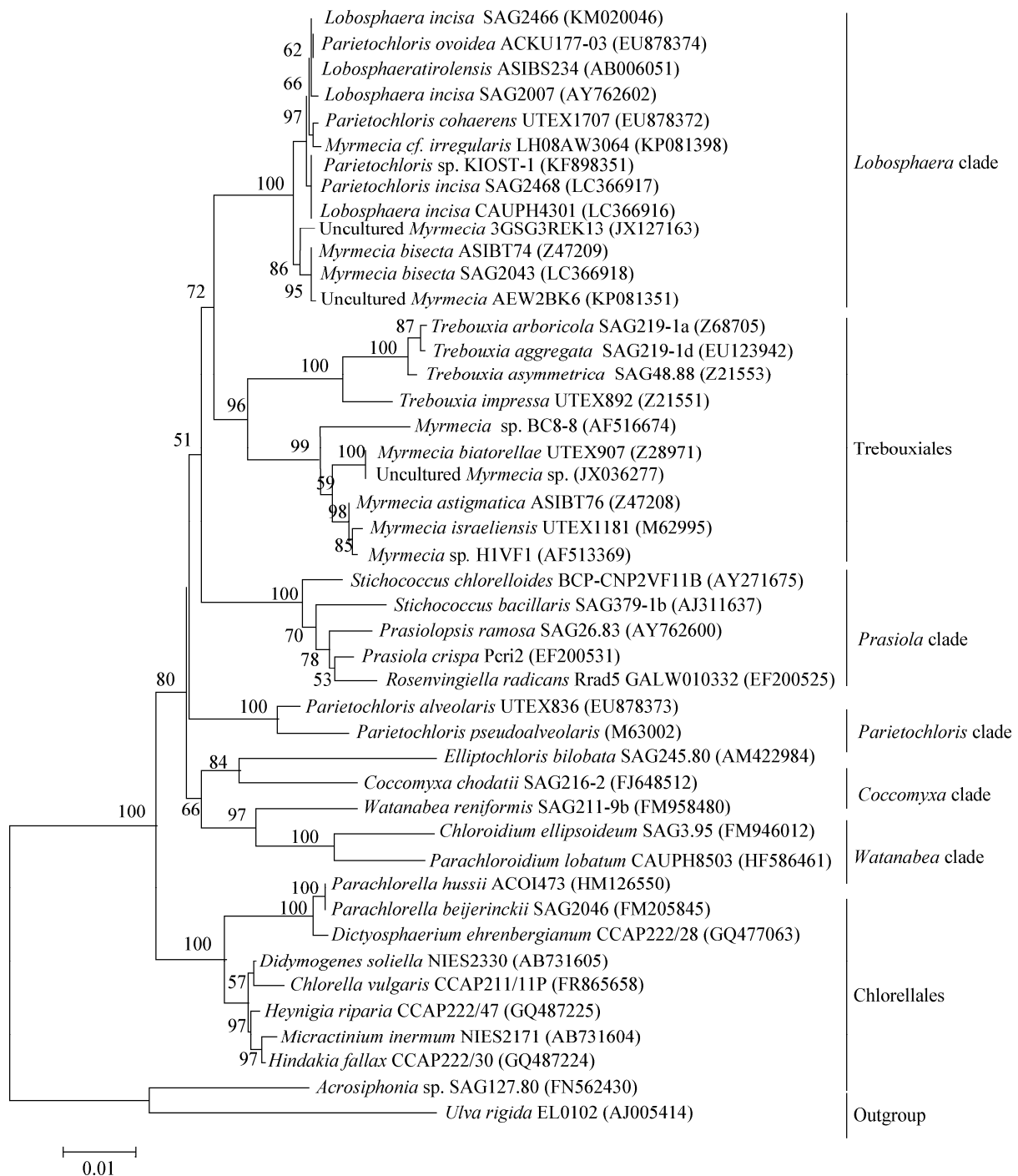


图2 基于共球藻纲 18S rRNA 基因序列构建的 N-J 进化树

Figure 2 The phylogram based on partial sequences of 18S rRNA genes of Trebouxiophyceae using neighbor-joining method

注: 括号里的数字是 GenBank 登录号; 节点上的数字代表 Bootstrap 值(随机抽样 1 000 次重复出现的百分比); 比例尺代表遗传距离。  
Note: Numbers in parentheses are the GenBank accession numbers; Numbers on the nodes represent bootstrap values (expressed as percentages of 1 000 random replications); The scale bar represents the genetic distance of the 18S rRNA genes sequences.

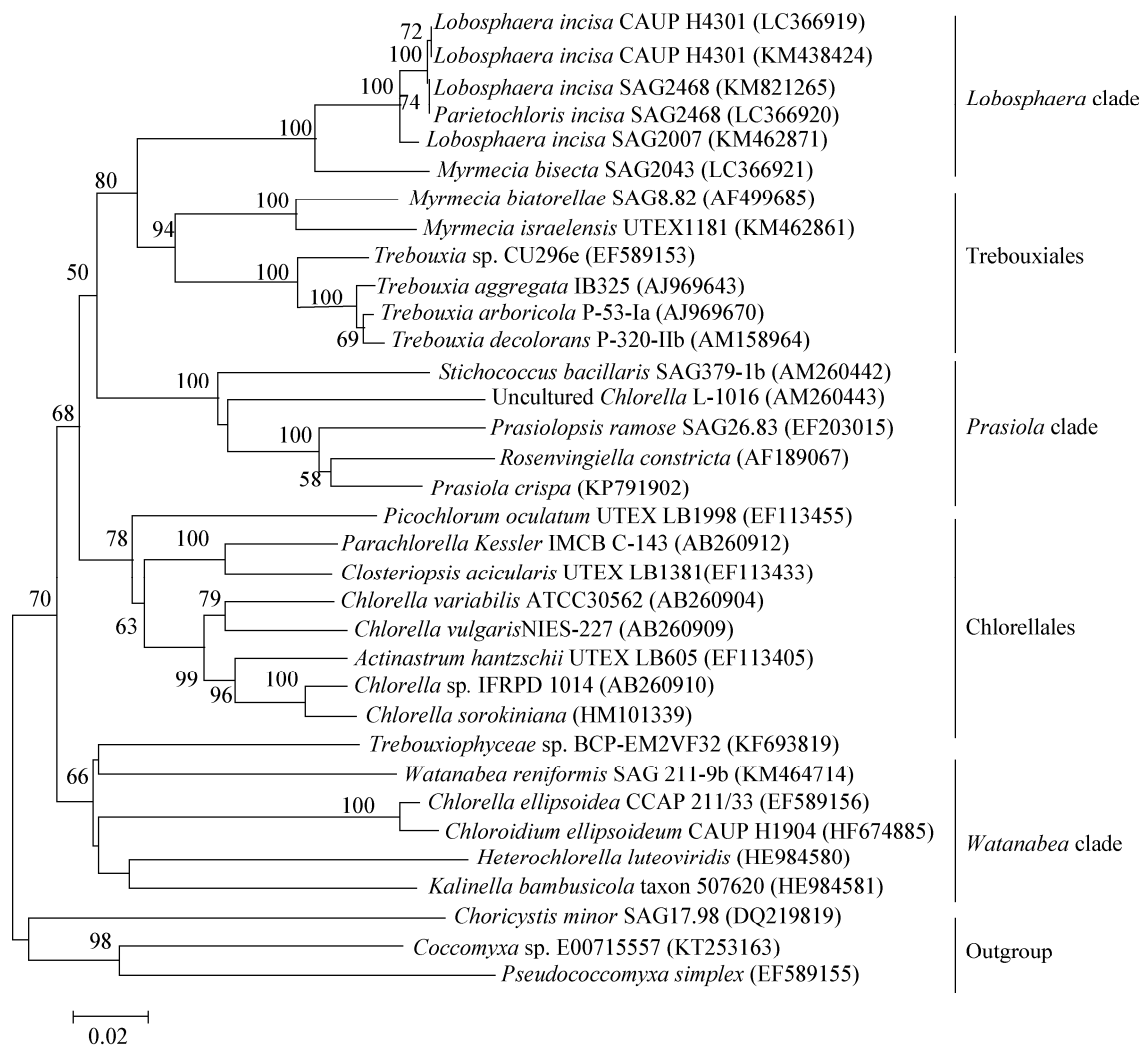


图 3 基于共球藻纲 *rbcL* cpDNA 序列构建的 N-J 进化树

Figure 3 The phylogram based on *rbcL* cpDNA sequences of Trebouxiophyceae using neighbor-joining method

注: 括号里的数字为 GenBank 登录号; 节点上的数字为 Bootstrap 值(随机抽样 1 000 次重复出现的百分比); 比例尺代表遗传距离。

Note: Numbers in parentheses are the GenBank accession numbers; Numbers on the nodes represent bootstrap values (expressed as percentages of 1 000 random replications); The scale bar represents the genetic distance of the *rbcL* cpDNA sequences.

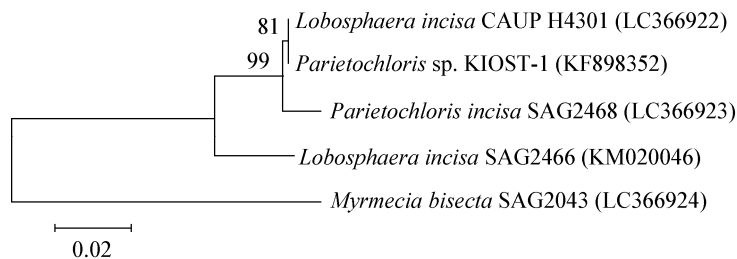


图 4 基于 *Lobosphaera* 分支 ITS 序列构建的 N-J 进化树

Figure 4 The phylogram based on ITS sequences of *Lobosphaera* using neighbor-joining method

注: 括号里的数字为 GenBank 登录号; 节点上的数字为 Bootstrap 值(随机抽样 1 000 次重复出现的百分比); 比例尺代表遗传距离。

Note: Numbers in parentheses are the GenBank accession numbers; Numbers on the nodes represent bootstrap values (expressed as percentages of 1 000 random replications); The scale bar represents the genetic distance of the ITS sequences.

整体上总脂含量与生物量积累规律保持一致,而且与氮浓度呈负相关。硝酸钠、尿素和碳酸氢铵组总脂含量普遍高于其他氮源,对这几组数据进行单因素方差分析发现,低氮下油脂含量显著高于高氮( $P<0.05$ ),且低氮条件下这3种氮源之间油脂含量差异不显著( $P>0.05$ )。SAG2468、H4301和SAG2043的最大油脂含量分别为37.23%、39.75%和44.39%。

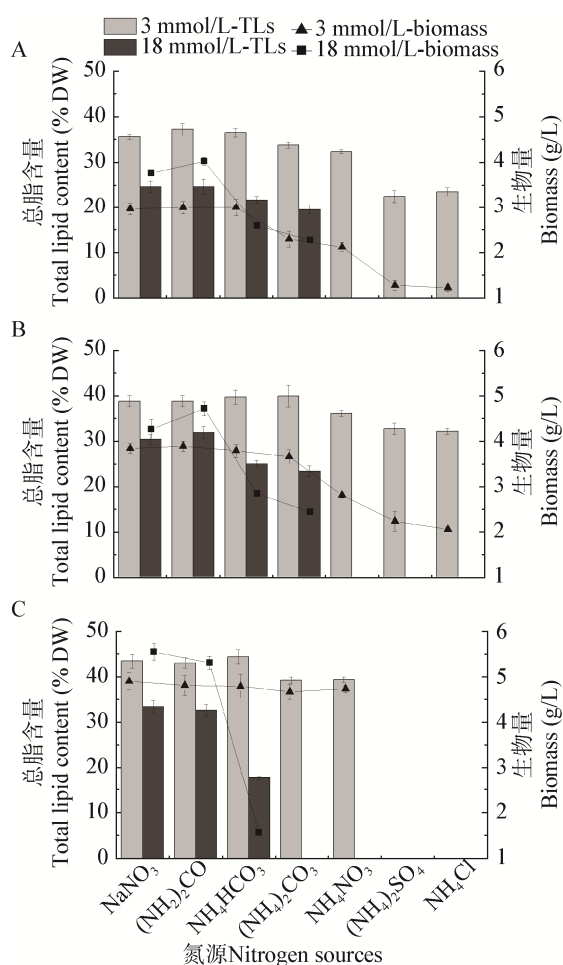


图5 氮源类型和水平对3株微藻第15天生物量和总脂含量的影响

Figure 5 Effects of nitrogen sources and levels on the biomass and total lipids (TLs) of the three microalgae on day 15th

注: A: 缺刻缘绿藻(SAG2468); B: 缺刻叶球藻(H4301); C: 双隔蚊形藻(SAG2043).

Note: A: *P. incisa* SAG2468; B: *L. incisa* CAUP H4301; C: *M. bisecta* SAG2043.

## 2.4 氮源类型和水平对3株微藻主要脂肪酸组成和AA含量的影响

以上研究显示,与其它4种铵态氮相比,硝酸钠、尿素和碳酸氢铵是普遍较为适合这3株微藻的氮源形式,因此选用此3种为代表性氮源进一步分析脂肪酸组成。表2显示3株微藻在不同氮源和氮浓度下培养至第15天时主要脂肪酸组成及相对含量,三者主要脂肪酸组成相同,包括饱和脂肪酸[棕榈酸( $\text{C}_{16:0}$ )]、单不饱和脂肪酸[油酸( $\text{C}_{18:1}$ )]和多不饱和脂肪酸[亚油酸( $\text{C}_{18:2}$ )、AA( $\text{C}_{20:4}$ )]。其中,低氮条件下,H4301和SAG2043油酸相对含量最高,约占35%以上,其次为AA,约占30%左右;SAG2468则AA含量最高,约占40%左右,其次为油酸,约占25%左右。图6所示为3株微藻AA绝对含量(占干重)(图6A、C和E)和AA相对含量(占总脂肪酸)(图6B、D和F)。低氮胁迫能显著促进3株微藻积累AA,但藻株之间AA含量差别较大。AA绝对含量和相对含量最大值是SAG2468在3 mmol/L尿素条件下获得,分别为11.73%和40.74%,其不同氮源差异不显著;SAG2043略低于SAG2468,其最大值在3 mmol/L硝酸钠条件下获得,分别为10.86%和31.75%,硝酸钠显著优于其他2种氮源;H4301的AA含量最低,最高仅为7.84%和26.81%。

## 2.5 氮源种类和水平对3株微藻总脂和AA产率的影响

3株微藻在3种氮源、2种氮浓度培养条件下第15天时总脂和AA产率如图7所示,低氮培养时的产率普遍高于高氮,SAG2468和H4301均在3 mmol/L尿素条件下总脂和AA产率达到最大,分别为74.38、23.42 mg/(L·d)和100.84、20.33 mg/(L·d)。SAG2043在3 mmol/L硝酸钠培养条件下达到最大为142.15 mg/(L·d)和35.51 mg/(L·d),明显高于其他2株微藻( $P<0.05$ )。

表 2 氮源类型和水平对 3 株微藻第 15 天主要脂肪酸组成及相对含量的影响

Table 2 Effects of nitrogen sources and levels on the fatty acid composition and relative contents of the three microalgae on day 15th

Microalgae	Nitrogen sources	Nitrogen levels (mmol/L)	Individual fatty acid contents							
			C <sub>16:0</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>	C <sub>18:3</sub>	C <sub>20:4</sub>	C <sub>20:5</sub>	Others
<i>M. bisecta</i> SAG2043	NaNO <sub>3</sub>	3	8.61	2.34	36.87	10.85	3.52	31.75	1.62	4.43
	(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	3	9.39	1.90	35.92	12.73	4.76	28.60	2.44	4.26
	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	3	8.74	2.13	37.30	12.92	3.99	26.29	1.65	6.99
	NaNO <sub>3</sub>	18	10.46	1.80	31.24	13.78	5.11	26.96	1.81	8.84
	(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	18	10.28	1.45	31.89	14.03	4.60	25.34	1.89	10.50
	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	18	19.47	0.58	18.08	15.66	7.09	24.93	4.73	9.45
<i>L. incisa</i> CAUP H4301	NaNO <sub>3</sub>	3	10.77	1.45	38.51	12.99	4.49	25.89	1.41	4.49
	(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	3	10.75	1.32	36.95	12.68	4.13	26.81	1.60	5.76
	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	3	11.19	1.39	37.05	15.96	5.15	21.01	1.58	6.67
	NaNO <sub>3</sub>	18	11.74	0.89	32.82	18.52	12.55	11.95	1.74	9.79
	(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	18	12.45	1.34	32.99	18.41	10.22	14.61	1.46	8.52
	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	18	13.22	1.40	29.29	22.21	12.73	8.65	1.60	10.90
<i>P. incisa</i> SAG2468	NaNO <sub>3</sub>	3	11.53	2.03	25.85	9.58	3.47	39.96	2.21	5.37
	(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	3	9.99	1.71	25.36	10.33	3.61	40.74	2.41	5.83
	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	3	10.79	1.53	26.99	10.05	2.85	39.70	2.21	5.88
	NaNO <sub>3</sub>	18	12.76	2.05	20.09	15.79	5.97	30.95	2.30	10.09
	(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	18	12.91	2.10	20.77	17.02	4.34	31.38	1.93	9.54
	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	18	11.90	1.77	22.47	17.99	10.85	22.05	2.44	10.54

### 3 讨论与结论

#### 3.1 分类地位的修订

形态学观察和分子系统学是鉴定微藻的常用手段, 本研究结果表明缺刻缘绿藻(*P. incisa* SAG2468)不属于缘绿藻属(*Parietochloris*), 而属于叶球藻属(*Lobosphaera*), 与缺刻叶球藻(*L. incisa* CAUP H4301)亲缘关系很密切, 两者的 18S rRNA 基因、*rbcL* 和 ITS 序列相似性高达 100%、99.9%和 99.89%, 加之光学显微镜下形态差异不甚明显, 这给两者的分类带来困难。而对于在种或属水平上亲缘关系密切的微藻, 脂质和脂肪酸组成类型常作为有效的生物标记<sup>[24]</sup>。因此通过进一步比较不同氮源及氮浓度下生长、油脂及 AA 积累特性, 发现两者生理差异很大。此外从生物地理的尺度考察, H4301 分离自捷克泥炭沼泽, SAG2468 分离自日本高山雪地, 2 株微藻存在明显的地理隔离且生境差异大,

表明这 2 株微藻是缺刻叶球藻(*L. incisa*)的不同地理株系。鉴于此, 我们推测缺刻叶球藻种内高水平的生理差异可能不仅由基因决定, 某种程度上受到生态类型的影响; 另一方面, 也说明目前广泛使用的 18S rRNA 基因、*rbcL*、ITS 等序列进化比较保守, 未能很好地表征缺刻叶球藻种内的微小变异, 随着种内更多分子数据的获得, 有助于我们开发更为有效的分子标记。

本研究结果表明双隔蚁形藻(*M. bisecta* SAG 2043)隶属于叶球藻属(*Lobosphaera*)而非蚁形藻属(*Myrmecia*)。早在 20 世纪 80 年代已发现双隔蚁形藻的游动孢子与蚁形藻属其他物种不一致, 前者游动孢子具有一个眼点且细胞形状更偏紧凑狭长, 与缺刻叶球藻的游动孢子类型一致<sup>[25]</sup>, 而后者游动孢子属于 *Friedmannia* 类型, 无眼点且更偏扁平、非对称<sup>[26]</sup>。1992 年 Friedl<sup>[12]</sup>基于形态学和分子系统学



的研究认为该种不属于蚁形藻属, 具体分类地位有待进一步研究。2013 年 Hallmann 等<sup>[27]</sup>基于共球藻纲所做的进化分析与本研究得出相同的

结果。因此, 结合现有数据, 我们建议将双隔蚁形藻(*M. bisecta* SAG2043)修订为双隔叶球藻(*L. bisecta* SAG2043)。

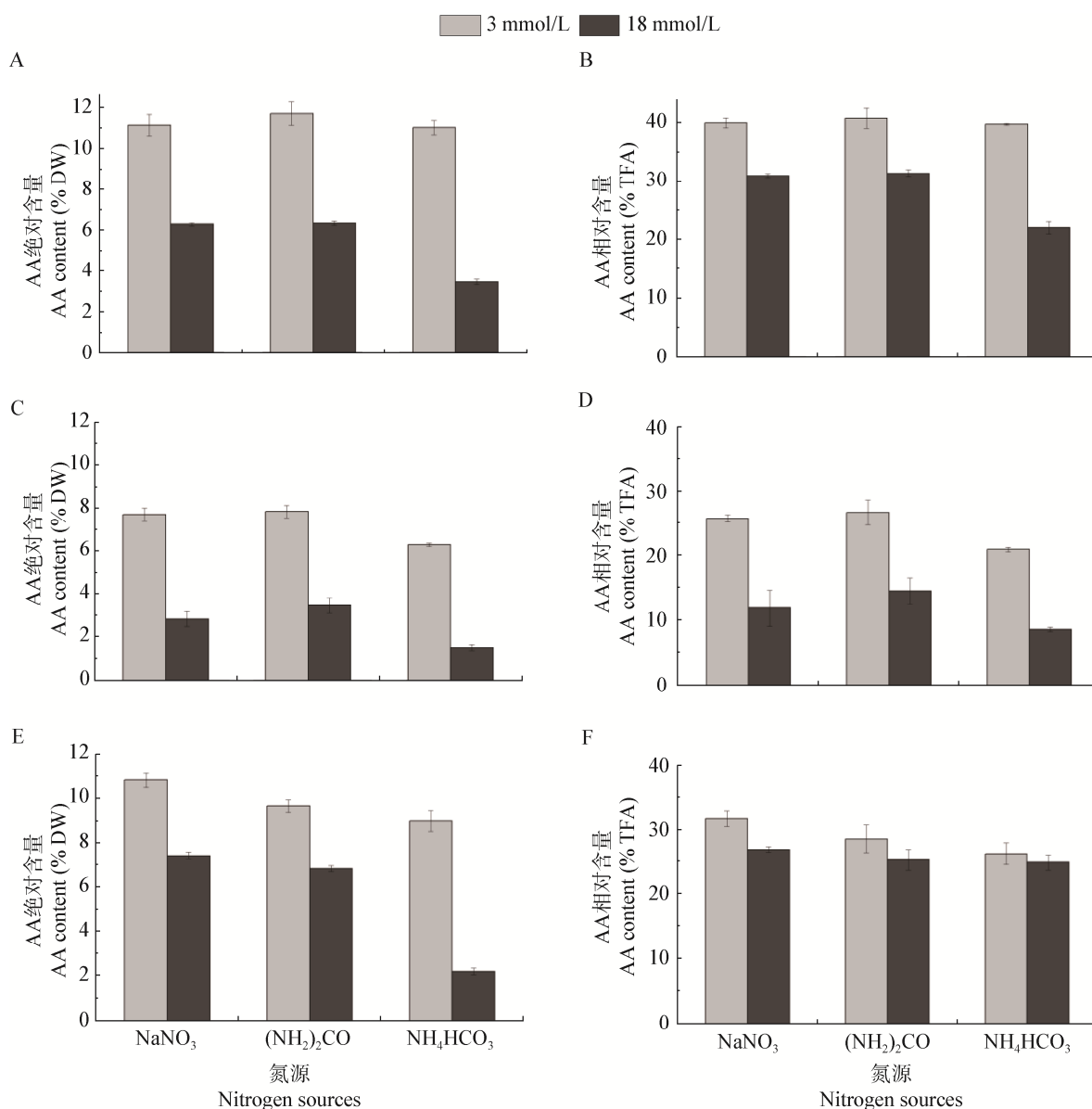


图 6 氮源类型和水平对 3 株微藻第 15 天的 AA 绝对含量(占干重)及 AA 相对含量(占总脂肪酸)的影响

Figure 6 Effects of nitrogen sources and levels on the arachidonic acid contents (% of dry biomass) and arachidonic acid percentage (% of TFA) of the three microalgae on day 15th

注: A: 缺刻缘绿藻(SAG2468)AA 绝对含量; B: 缺刻缘绿藻(SAG2468)AA 相对含量; C: 缺刻叶球藻(H4301)AA 绝对含量; D: 缺刻叶球藻(H4301)AA 相对含量; E: 双隔蚁形藻(SAG2043)AA 绝对含量; F: 双隔蚁形藻(SAG2043)AA 相对含量。

Note: A: AA contents of *P. incisa* SAG2468; B: AA percentage of *P. incisa* SAG2468; C: AA contents of *L. incise* CAUP H4301; D: AA percentage of *L. incise* CAUP H4301; E: AA contents of *M. bisecta* SAG2043; F: AA percentage of *M. bisecta* SAG2043.

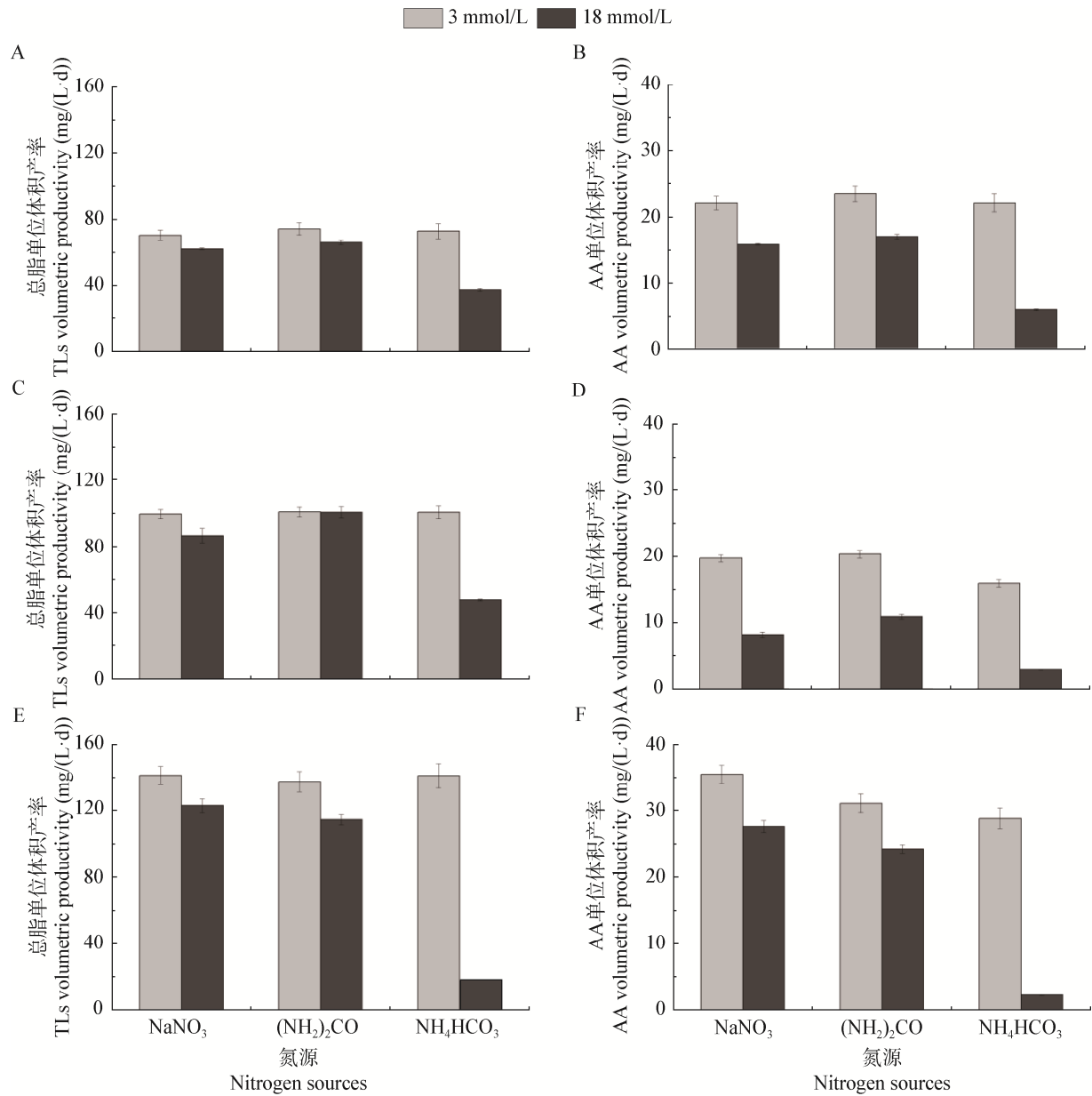


图 7 氮源类型和水平对 3 株微藻第 15 天单位体积总脂产率和 AA 产率的影响

Figure 7 Effects of nitrogen sources and levels on the volumetric productivity of total lipids (TLs) and arachidonic acid of the three microalgae on day 15th

注: A: 缺刻缘绿藻(SAG2468)总脂产率; B: 缺刻缘绿藻(SAG2468) AA 产率; C: 缺刻叶球藻(H4301)总脂产率; D: 缺刻叶球藻(H4301) AA 产率; E: 双隔蚊形藻(SAG2043)总脂产率; F: 双隔蚊形藻(SAG2043) AA 产率.

Note: A: Volumetric productivity of TLs of *P. incisa* SAG2468; B: Volumetric productivity of AA of *P. incisa* SAG2468; C: Volumetric productivity of TLs of *L. incisa* CAUP H4301; D: Volumetric productivity of AA of *L. incisa* CAUP H4301; E: Volumetric productivity of TLs of *M. bisecta* SAG2043; F: Volumetric productivity of AA of *M. bisecta* SAG2043.

### 3.2 氮源类型和水平对 3 株微藻生长、油脂和 AA 含量的影响

微藻可吸收利用的氮源主要有 3 种形式: 硝态氮、铵态氮和有机氮源, 不同营养离子的吸收动力

学不尽相同。从能量的角度看, 铵盐可被藻类直接同化吸收, 相比其他两种形式的氮源更容易被利用, 此外铵盐也能有效抑制和杀死培养液中原生动物<sup>[28]</sup>。本研究选取 5 种不同阴离子形式的铵盐化



合物, 这些化合物由于自身的酸根离子不同影响了藻液的 pH, 从而进一步影响微藻的生长。但过高的铵浓度会在细胞内部产生有毒的氨气进而危害藻细胞生长, 且培养液的 pH 较硝酸钠和尿素培养更不稳定。一些微藻对铵盐很敏感, 例如, 铵氮浓度为 0.5 mg/L 时, 10 种不同类型的底栖硅藻生长均受到抑制<sup>[29]</sup>, 但一些微藻如小球藻(*Chlorella vulgaris*) 在铵氮浓度为 20–250 mg/L 时, 生长良好<sup>[30]</sup>。本研究显示, 不同铵盐对 3 株微藻的影响不同, 整体随氮浓度的升高致死趋势更明显, 碳酸盐相对其他几种铵盐毒性较小。不同微藻对同一种铵盐的耐受性也不同, 藻株对铵盐的耐受程度和广度从大到小依次是: H4301>SAG2468>SAG2043, 这说明这 3 株微藻有各自的生理特性, 对氮源的需求和耐受性也不同, 普遍不适合在铵盐条件下培养。

进一步分析氮水平对 3 株微藻生长和油脂积累的影响, 非铵氮组在高氮条件下有利于生物量的积累, 生物量提高了 1.0 g/L 左右; 低氮胁迫有利于油脂的积累, 总脂含量提高了约 30%–50%。氮限制引起中性脂(主要是三酰甘油)含量上升的现象在很多微藻中都得到证实, 三酰甘油(TAG)作为储存碳源和能量最有效的形式, 能在逆境胁迫下大量积累, 以便能在环境条件好转的情况下提供能量用于细胞的生长和分裂<sup>[31]</sup>。

通常微藻在胁迫条件下将同化产物转化为糖类或脂类物质的同时会降低长链多不饱和脂肪酸(LC-PUFA)的含量。吴桂秀等<sup>[32]</sup>研究发现, 与高氮相比, 低氮条件下真眼点藻 AA 和 EPA 含量下降, 而棕榈油酸和油酸含量上升。本研究中 3 株微藻均在低氮条件下 AA 含量提高一倍不等, 这说明低氮胁迫能显著促进 AA 的积累。这与 Khozin-Goldberg 等<sup>[3]</sup>的研究结果一致, 他们用生境理论去解释缺刻缘绿藻(*P. incisa* SAG2468)独特的 AA 积累特性, 该研究认为 SAG2468 分离自温度、光照条件变化剧烈的高山环境, 膜脂中 LC-PUFA 含量的增加可以提高膜的流动性, 帮助其抵抗强光、低温等不良环

境。极端环境下微藻从头合成 LC-PUFA 比较慢, 此时 TAG 作为 LC-PUFA (主要是 AA) 的储存库迅速提供酰基用于叶绿体膜脂的重建, 这种现象在其他研究中也证实<sup>[33]</sup>。

有意思的是, 缺刻叶球藻(*L. incisa* SAG2007) 分离自奥地利阿尔比斯山脉高海拔地带的土壤, 与 SAG2468 有相似的生境, 但 Lang 等<sup>[9]</sup>研究表明其 AA 含量只占总脂肪酸含量的 14%。此外, 本研究对象缺刻叶球藻(*L. incisa* H4301) 分离自捷克泥炭沼泽, 双隔蚊形藻(*M. biseata* SAG2043) 分离自意大利松树林土壤, 这两株球状绿藻都非高山藻, 也能积累较高含量的 AA。由此推测, AA 积累特性可能不仅与生境有关。总而言之, 该属不同藻株在积累 AA 能力上差异较大, 这也与 Lang 等<sup>[9]</sup>观点一致, 即在亲缘关系较近甚至是同一物种的不同分离株系, 其脂肪酸组成差异很大, 与分类地位并无直接对应关系。因此通过现有信息并不能得出该属与 AA 积累特性之间有必然联系, AA 积累机制有待进一步研究。

产率是衡量微藻生长和生化成分含量的综合指标, 吴曼曼等<sup>[34]</sup>采用低氮换无氮的方式优化缺刻叶球藻的培养后, 其 AA 最高产率达 17.0 mg/(L·d); Ahern 等<sup>[35]</sup>发现紫球藻(*Porphyridium cruentum*) 在优化后的特定培养条件下 AA 最高产率达 11.04 mg/(L·d)。本研究中, 双隔蚊形藻 SAG2043 在 3 mmol/L 硝酸钠条件下总脂和 AA 产率分别高达 142.15 和 35.51 mg/(L·d), 显著高于另外两株微藻, 也高于绝大多数目前报道的高产 AA 的微藻。低氮条件下, SAG2468 和 SAG2043 的 AA 绝对含量(占干重)最高分别为 11.73% 和 10.86%, 相对含量(占总脂肪酸)最高分别为 40.74% 和 31.75%, 虽然前者 AA 含量略微高于后者, 但由于生物量比后者低近 2 g, 从而导致产率较低。然而与前人有关 SAG2468 的研究相比, 两者的 AA 含量都低于文献报道水平<sup>[3]</sup>, 主要原因在于培养条件的不同。氮浓度、光照强度、温度、初始细胞密度及细胞状态都会影响

AA 的合成, 而适当降低氮浓度、减小光照强度、降低温度等都有利于 AA 的积累。此外, SAG2043 相比 SAG2468 有较强的沉降性能(本文未显示), 因此是一株极具 AA 开发潜力的藻株。

## REFERENCES

- [1] Piomelli D. Arachidonic acid in cell signaling[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 1993, 5(2): 274-280
- [2] Harizi H, Corcuff JB, Gualde N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology[J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2008, 14(10): 461-469
- [3] Khozin-Goldberg I, Bigogno C, Shrestha P, et al. Nitrogen starvation induces the accumulation of arachidonic acid in the freshwater green alga *Parietochloris incisa* (Trebouxiophyceae)[J]. *Journal of Phycology*, 2002, 38(5): 991-994
- [4] Tschermak-Woess E, Plessl A. Über zweierlei typen der sukzedanen teilung und ein auffallendes teilungsverhalten des chromatophors bei einer neuen protococcale, *Myrmecia pyriformis*[J]. *Österreichische Botanische Zeitschrift*, 1948, 95(2): 194-207
- [5] Reisigl H. Zur systematik und ökologie alpinen bodenalgen[J]. *Österreichische Botanische Zeitschrift*, 1964, 111(4): 402-499
- [6] Watanabe S, Hirabayashi S, Boussiba S, et al. *Parietochloris incisa* comb. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta)[J]. *Phycological Research*, 1996, 44(2): 107-108
- [7] Karsten U, Friedl T, Schumann R, et al. Mycosporine-like amino acids and phylogenies in green algae: *Prasiola* and its relatives from the Trebouxiophyceae (Chlorophyta)[J]. *Journal of Phycology*, 2005, 41(3): 557-566
- [8] Lemieux C, Otis C, Turmel M. Chloroplast phylogenomic analysis resolves deep-level relationships within the green algal class Trebouxiophyceae[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2014, 14: 211
- [9] Lang I, Hodac L, Friedl T, et al. Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection[J]. *BMC Plant Biology*, 2011, 11: 124
- [10] Řezanka T, Lukavský J, Nedbalová L, et al. Production of structured triacylglycerols from microalgae[J]. *Phytochemistry*, 2014, 104: 95-104
- [11] Andreyeva VM. On the taxonomy of the genus *Myrmecia printz* (Chlorococcales, Chlorococcaceae)[J]. *Botanical Magazine*, 1978, 63: 442-460 (in Russian)
- [12] Friedl T. Inferring taxonomic positions and testing genus level assignments in coccoid green lichen algae: a phylogenetic analysis of 18S ribosomal RNA sequences from *Dictyochloropsis reticulata* and from members of the genus *Myrmecia* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae Cl. Nov.)[J]. *Journal of Phycology*, 1995, 31(4): 632-639
- [13] Li YQ, Horsman M, Wang B, et al. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleabundans*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 81(4): 629-636
- [14] Xu NJ, Zhang XC, Fan X, et al. Effects of nitrogen source and concentration on growth rate and fatty acid composition of *Ellipsoidion* sp. (Eustigmatophyta)[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2001, 13(6): 463-469
- [15] Hsieh CH, Wu WT. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(17): 3921-3926
- [16] Gao BY, Yang J, Lei XQ, et al. Characterization of cell structural change, growth, lipid accumulation, and pigment profile of a novel oleaginous microalga, *Vischeria stellata* (Eustigmatophyceae), cultured with different initial nitrate supplies[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(2): 821-830
- [17] Khozin-Goldberg I, Shrestha P, Cohen Z. Mobilization of arachidonyl moieties from triacylglycerols into chloroplastic lipids following recovery from nitrogen starvation of the microalga *Parietochloris incisa*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2005, 1738(1/3): 63-71
- [18] Xia S, Wan LL, Li AF, et al. Effects of nutrients and light intensity on the growth and biochemical composition of a marine microalga *Odontella aurita*[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2013, 31(6): 1163-1173
- [19] Cohen Z, Norman HA, Heimer YM. Potential use of substituted pyridazinones for selecting polyunsaturated fatty acid overproducing cell lines of algae[J]. *Phytochemistry*, 1993, 32(2): 259-264
- [20] Rindi F, Guiry MD, López-Bautista JM. Distribution, morphology, and phylogeny of *Klebsormidium* (Klebsormidiales, Charophyceae) in urban environments in Europe[J]. *Journal of Phycology*, 2008, 44(6): 1529-1540
- [21] Rindi F, Lam DW, López-Bautista JM. Phylogenetic relationships and species circumscription in *Trentepohlia* and *Printzina* (Trentepohliales, Chlorophyta)[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2009, 52(2): 329-339
- [22] Medlin L, Elwood HJ, Stickel S, et al. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions[J]. *Gene*, 1988, 71(2): 491-499
- [23] Nakayama T, Watanabe S, Mitsui K, et al. The phylogenetic relationship between the Chlamydomonadales and Chlorococcales inferred from 18S rDNA sequence data[J]. *Phycological Research*, 1996, 44(1): 47-55
- [24] Volkman JK, Barrett SM, Blackburn SI, et al. Microalgal biomarkers: a review of recent research developments[J]. *Organic Geochemistry*, 1998, 29(5/7): 1163-1179
- [25] Deason TR. An ultrastructural comparison of two coccoid green algae[J]. *Journal of Phycology*, 1987, 23(S): 14
- [26] Melkonian M, Berns B. Zoospore ultrastructure in the green alga *Friedmannia israelensis*: an absolute configuration analysis[J]. *Protoplasma*, 1983, 114(1/2): 67-84
- [27] Hallmann C, Stanek L, Fritzlar D, et al. Molecular diversity of phototrophic biofilms on building stone[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, 84(2): 355-372
- [28] Lincoln EP, Hall TW, Koopman B. Zooplankton control in mass algal cultures[J]. *Aquaculture*, 1983, 32(3/4): 331-337

- [29] Admiraal W. Tolerance of estuarine benthic diatoms to high concentrations of ammonia, nitrite ion, nitrate ion and orthophosphate[J]. *Marine Biology*, 1977, 43(4): 307-315
- [30] Tam NFY, Wong YS. Effect of ammonia concentrations on growth of *Chlorella vulgaris* and nitrogen removal from media[J]. *Bioresource Technology*, 1996, 57(1): 45-50
- [31] Simionato D, Block MA, La Rocca N, et al. The response of *Nannochloropsis gaditana* to nitrogen starvation includes *De Novo* biosynthesis of triacylglycerols, a decrease of chloroplast galactolipids, and reorganization of the photosynthetic apparatus[J]. *Eukaryotic Cell*, 2013, 12(5): 665-676
- [32] Wu GX, Gao BY, Zhou ZW, et al. Effects of high and low nitrogen concentration on the growth and lipids accumulation pattern of two oleaginous microalgae[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(8): 1442-1452 (in Chinese)  
吴桂秀, 高保燕, 周芷薇, 等. 高、低氮浓度对 2 株真眼点藻的生长和油脂积累的影响[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(8): 1442-1452
- [33] Khozin-Goldberg I, Yu HZ, Adlerstein D, et al. Triacylglycerols of the red microalga *Porphyridium cruentum* can contribute to the biosynthesis of eukaryotic galactolipids[J]. *Lipids*, 2000, 35(8): 881-889
- [34] Wu MM, Lei XQ, Gao BY, et al. Effects of different culture conditions on the growth and accumulations of lipid and arachidonic acid of *Lobosphaera incisa*[J]. *China Oils and Fats*, 2017, 42(5): 54-59 (in Chinese)  
吴曼曼, 雷学青, 高保燕, 等. 不同培养条件对缺刻叶球藻的生长和油脂、花生四烯酸积累的影响[J]. *中国油脂*, 2017, 42(5): 54-59
- [35] Ahern TJ, Katoh S, Sada E. Arachidonic acid production by the red alga *Porphyridium cruentum*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1983, 25(4): 1057-1070

## 征 稿 简 则

### 1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展,以及微生物学教学研究改革等。设置的栏目有:研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、专栏等。

### 2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>, 点击作者投稿区,第一次投稿请先注册,获得用户名和密码,然后依照提示提交稿件,详见主页“投稿须知”。

### 3 写作要求

3.1 来稿要求论点明确,数据可靠,简明通顺,重点突出。

3.2 英文摘要写作注意事项:(1) 建议使用第一人称,以此可区分研究结果是引用文献还是作者所得;(2) 建议用主动语态,被动语态表达拖拉模糊,尽量不用,这样可以避免长句,以求简单清晰;(3) 建议使用过去时态,要求语法正确,句子通顺;(4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致,但可比中文摘要更详尽,写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部;(5) 摘要中不要使用缩写语,除非是人人皆知的,如:DNA,ATP等;(6) 在英文摘要中不要使用中文字体标点符号。

3.3 关键词:应明确、具体,一些模糊、笼统的词语最好不用,如“基因”、“表达”等。

(下转 p.2661)