

氮磷硅对咖啡双眉藻和缢缩菱形藻繁殖速度和油脂积累的影响

王瑶华¹, 吴洪喜^{2,3}, 黄振华^{2,3}, 陈肖肖^{2,3}, 胡 园^{2,3}, 王召根^{1,3}

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 浙江省海洋水产养殖研究所, 浙江 温州 325005; 3. 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室, 浙江 温州 325005)

摘要: 采用光密度法和尼罗红染色法, 探索了氮、磷、硅对从温州海区分离出的底栖硅藻咖啡双眉藻 (*Amphora coffeaeformis*) 和缢缩菱形藻 (*Nitzschia constricta*) 的繁殖速度和油脂积累的影响。结果显示, 2 种底栖藻在 $\text{NO}_3\text{-N}$ 质量浓度为 1.746 mg/L 时, 细胞均不繁殖, 且在实验第 7 天开始死亡, 当 $\text{NO}_3\text{-N}$ 质量浓度再升高后, 细胞繁殖速度开始加快, 质量浓度达 8.820 mg/L 后, 藻细胞的繁殖速度不再明显加快; 2 种藻类的繁殖速度均随 $\text{H}_2\text{PO}_4\text{-P}$ 质量浓度升高而加快, 但当质量浓度达到 0.884 mg/L 后, 藻细胞的繁殖速度不再明显加快; 2 种底栖藻类均随 $\text{SiO}_3\text{-Si}$ 质量浓度增加而加快, 但质量浓度对 2 种底栖硅藻细胞繁殖速度影响并不显著。3 种元素对 2 种底栖硅藻繁殖速度的影响力: $\text{N} > \text{P} > \text{Si}$ 。实验期间, 2 种底栖硅藻的油脂含量均呈先降后升的变化规律, 油脂的积累主要集中在实验后期, 氮磷硅限制均能促进 2 种底栖硅藻细胞油脂的积累, 对 2 种硅藻细胞油脂积累的影响程度, 氮限制比磷和硅限制都要大。

关键词: 氮磷硅; 尼罗红染色; 繁殖; 油脂

中图分类号: S931

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2015)04-0048-08

doi: 10.11759/hyxx20140224002

能源短缺已成为当今世界面临的三大问题(人口膨胀, 环境污染, 能源短缺)之一。随着石化能源的日益枯竭, 绿色、清洁生物能的开发与利用已成为当今各国政府和科学家关注的热点。微藻因具有繁殖速度快、含油量高、单位面积产量高等特点被认为是极具替代石化能潜力的新能源之一^[1]。目前, 国内外许多研究结果表明, 氮、磷、硅对微藻的繁殖速度和油脂积累有较大的影响^[2-5], 但研究的对象主要是绿藻类和浮游硅藻类, 对底栖硅藻的研究还鲜见报道。本文以温州洞头海区分离出的 2 种富油底栖硅藻咖啡双眉藻 (*Amphora coffeaeformis*) 和缢缩菱形藻 (*Nitzschia constricta*) 为研究对象, 探讨了氮、磷、硅对其繁殖速度和油脂积累的影响, 为底栖硅藻的能源开发和利用积累基础资料。

1 材料与方 法

1.1 主要材料、仪器及试剂

藻种: 咖啡双眉藻 (*Amphora coffeaeformis*)、缢缩菱形藻 (*Nitzschia constricta*), 均从洞头自然海区中分离所得。

培养容器: 1000 mL 锥形瓶。

主要仪器: 荧光分光光度计(型号: 960CRT, 上海精密科学仪器有限公司生产); 可见分光光度计(型号: 722 型, 上海欣茂仪器有限公司生产); 智能光照培养箱(型号: ZDX-150, 宁波海曙赛福实验仪器厂生产); 超声清洗机(型号: SB-5200DT, 宁波新芝生物科技股份有限公司生产); 立式压力蒸汽灭菌器(型号: LDZX 型, 上海申安医疗器械厂生产)。

主要试剂: NaNO_3 (分析纯); NaH_2PO_4 (分析纯); NaSiO_3 (分析纯); 尼罗红(Nile red)(纯度 $\geq 95\%$, 生工生物工程(上海)股份有限公司生产)。

1.2 方 法

1.2.1 藻种的来源

采用水滴法和平板法从温州洞头海区挂板上的藻泥中分离出若干种底栖硅藻, 扩大培养后测定其总脂含量, 选定含脂肪较高的咖啡双眉藻和缢缩菱

收稿日期: 2014-07-11; 修回日期: 2014-09-22

基金项目: 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室人才培养基金项目(J2012010)

作者简介: 王瑶华(1990-), 女, 汉族, 浙江温州人, 硕士研究生, 研究方向: 水产增殖及其生态, E-mail: moyashimon@foxmail.com;

吴洪喜(1963-), 通信作者, 男, 汉族, 研究员, 浙江乐清人, 硕士生导师, 研究方向: 水产增殖及其生态, E-mail: whxchina@126.com

形藻为研究对象。

1.2.2 试验设计和培养基的制备

N、P、Si 分别以 f/2 培养基为基础, 各设置 5 个质量浓度水平, 分别为 f/2 培养基中相应质量浓度的 1/7、1/5、1/3 和 9/7, 其他成分不变(表 1), 各水平均设置 2 个重复。配置培养基用的海水取自当地海区, 盐度 30、pH 8.2, 并经 0.45 μm 醋酸纤维膜过滤和 120 $^{\circ}\text{C}$ 、0.1 MPa 条件下灭菌 20 min。

表 1 不同 N、P、Si 质量浓度的试验设计

Tab.1 The experiment design with different concentrations of N, P and Si

N (mg/L)	P(mg/L)	Si (mg/L)
1.764	0.167	0.307
5.292	0.500	0.919
8.820	0.884	1.532
12.348	1.167	2.146
15.876	1.500	2.758

1.2.3 尼罗红染色液的配制

称 9 mg 尼罗红粉末溶于 30 mL 丙酮, 摇匀, 取 1 mL 混合液加到 2 mL 丙酮中, 即得到 100 $\mu\text{g/mL}$ 尼罗红染色液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

1.2.4 接种与培养管理

取对数生长期的咖啡双眉藻和缢缩菱形藻藻液离心浓缩, 用少量灭菌海水重悬, 取等量藻液分别接入按试验设计配置的不同质量浓度的 N、P 和 Si 的培养基中。

控制试验温度(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 盐度 30, 藻液不通气, 所有试验均在光照培养箱中进行, 光暗比 12 h : 12 h。

1.2.5 工作曲线的制定

1.2.5.1 细胞密度测定工作曲线的制定

取一定量的咖啡双眉藻和缢缩菱形藻置于超声清洗仪中均匀分散, 用可见分光光度计测定其在 680 nm 下的 A_{680} (光密度), 并用血球计数板计数出相应的藻细胞密度, 得到 A_{680} 与藻细胞密度的关系(图 1)和线性回归方程:

咖啡双眉藻: $Y=1.5910x+0.041(R^2=0.9979)$

缢缩菱形藻: $Y=1.9494x-0.0534(R^2=0.9988)$

式中, Y 为硅藻细胞密度(10^6 个/mL); x 为 A_{680} 值。

两者具有良好的线性关系, 本实验 2 种底栖硅藻细胞密度由测得的 A_{680} 代入上述相应的公式(方程)求得。

1.2.5.2 油脂相对含量测定条件的确定

用荧光分光光度计, 以 485 nm 为激发光波长,

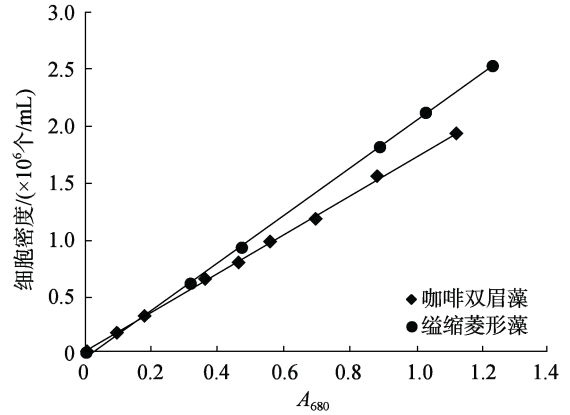


图 1 咖啡双眉藻和缢缩菱形藻细胞密度与 A_{680} 的关系
Fig.1 The quantitative relationship between A_{680} and cell density of *Amphora coffeaeformis* and *Nitzschia constricta*

在 500~750 nm 范围内分别对海水、海水+尼罗红、藻液、藻液+尼罗红进行扫描, 由于海水自身在这个范围内没有自发荧光, 所以海水的发射光谱几乎为一条直线; 海水+NR 溶液在 650 nm 处有 1 个峰值, 为尼罗红在水中的自发荧光, 尼罗红在水中溶解度很低, 故峰值较小; 藻液和藻液+NR 的发射光谱在 680 nm 左右都有 1 个峰值, 为叶绿素的发射峰; 藻液+NR 在 520~650 nm 处出现 1 个很高的峰, 对比藻液的发射光谱, 可以推测出 575 nm 处为底栖硅藻的脂发射峰(图 2)。

向等体积、同密度的藻液中加入不同质量浓度(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 $\mu\text{g/mL}$)的尼罗红, 进行荧光检测。结果显示尼罗红在 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度时获到最大的荧光强度, 高于这一质量浓度, 荧光强度反而下降。取一定量藻液, 稀释成一定的密度梯度, 染色后检测其荧光强度。结果显示: 当 $A_{680} < 0.686$ 时, 藻细胞密度与相对脂荧光强度的相关

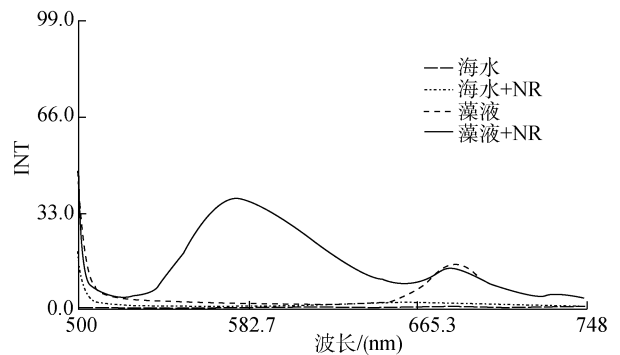


图 2 海水和藻液及其被尼罗红染色后的发射光谱扫描图
Fig.2 Fluorescence emission spectra of seawater and microalgal before and after dyeing

系数最大。底栖硅藻具有易沉底的特性, 选用偏低的细胞密度进行荧光检测以减小误差。

1.2.6 测定方法

1.2.6.1 硅藻细胞密度的测定

隔天将培养容器和藻液在超声清洗机中充分震荡, 均匀分散后, 取 3 mL 藻液用分光光度计测定 680 nm 处的 A_{680} 。根据 A_{680} 和已经求出的工作曲线, 计算出相应的硅藻细胞密度。

1.2.6.2 油脂相对含量的测定

隔天将培养容器和藻液在超声清洗机中充分震荡, 均匀分散后取 3 mL 藻液测定其在染色前后 485 nm 激发波长下 575 nm 处的荧光强度(尼罗红质量浓度 $1 \mu\text{g/mL}$)。相对荧光强度=荧光强度/细胞密度; 荧光强度=藻液染色后荧光强度 - 藻液染色前荧光强度 - 尼罗红的自发荧光强度(均为 575 nm 处的荧光强度)。

1.2.7 数据处理

用 SPSS 15.0 统计软件对实验数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 数据统计结果表示为平均值 $\pm$ 标准差。

2 结果

2.1 氮对 2 种底栖硅藻的繁殖和油脂含量的影响

试验结果显示: $\text{NO}_3\text{-N}$ 质量浓度为 1.746 mg/L 时,

咖啡双眉藻和缢缩菱形藻都几乎不繁殖, 且藻细胞从实验的第 7 天开始发白、衰亡。随着 $\text{NO}_3\text{-N}$ 质量浓度的升高, 2 种底栖硅藻的繁殖速度加快, 但当质量浓度达到 8.820 mg/L 后, 再继续升高, 2 种底栖硅藻的繁殖速度并不明显加快(图 3 和图 4)。从曲线可以看出 2 种藻对氮质量浓度的适应范围很相似, 只是咖啡双眉藻对低氮的适应力稍强于缢缩菱形藻。方差分析表明: 15d 时, 培养液中 $\text{NO}_3\text{-N}$ 质量浓度对 2 种底栖硅藻繁殖有显著的影响($P<0.05$)。

实验表明, 不同 $\text{NO}_3\text{-N}$ 质量浓度下, 2 种底栖硅藻的油脂含量均呈先降后升, 到指数生长末期后开始大量积累。实验结束时(15d), 藻细胞油脂含量除质量浓度最低组(1.746 mg/L)没有升高, 甚至降低外, 其他组都有所升高, 但质量浓度越高, 油脂含量越低(脂荧光强度越低)。15.876 mg/L 质量浓度组只有 5.920 mg/L 质量浓度组的一半(图 3 和图 4)。第 7 天时显微观察显示, 大部分底栖硅藻细胞已经死亡, 但并未解体, 仍有部分油滴被包裹在硅质的细胞壁内, 所以虽然细胞密度下降, 其相对荧光强度并未快速下降。方差分析表明: 实验结束时, 培养液中 $\text{NO}_3\text{-N}$ 质量浓度对 2 种底栖硅藻油脂含量有显著影响($P<0.05$)。

2.2 磷对 2 种底栖硅藻的繁殖和油脂含量的影响

结果显示, 在实验设计的 $\text{H}_2\text{PO}_4\text{-P}$ 质量浓度范

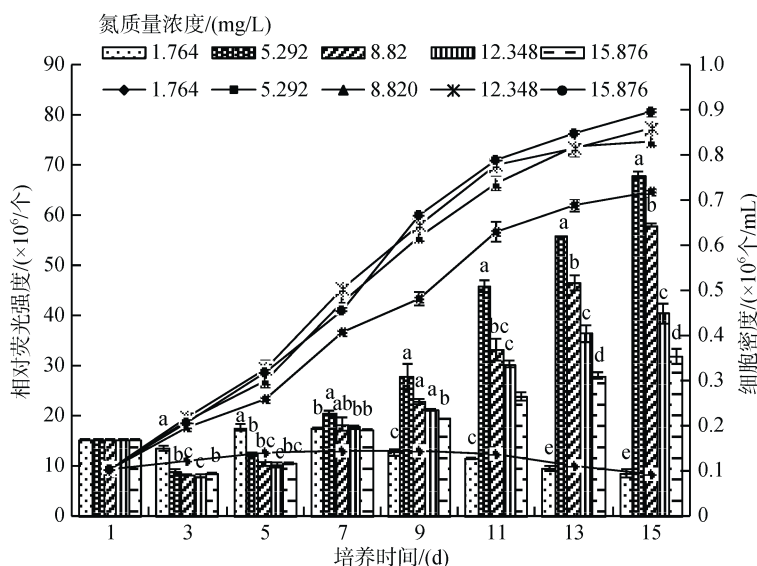


图 3 不同 $\text{NO}_3\text{-N}$ 质量浓度下咖啡双眉藻的繁殖曲线和油脂积累比较

Fig.3 The growth curves and lipid accumulation of *Amphora coffeaeformis* under different $\text{NO}_3\text{-N}$ concentrations

不同字母标注表示在同一时间不同处理组之间差异显著($P<0.05$), 下同

Values denoted with different letters are significantly different at the same time in different groups($P<0.05$), The same below

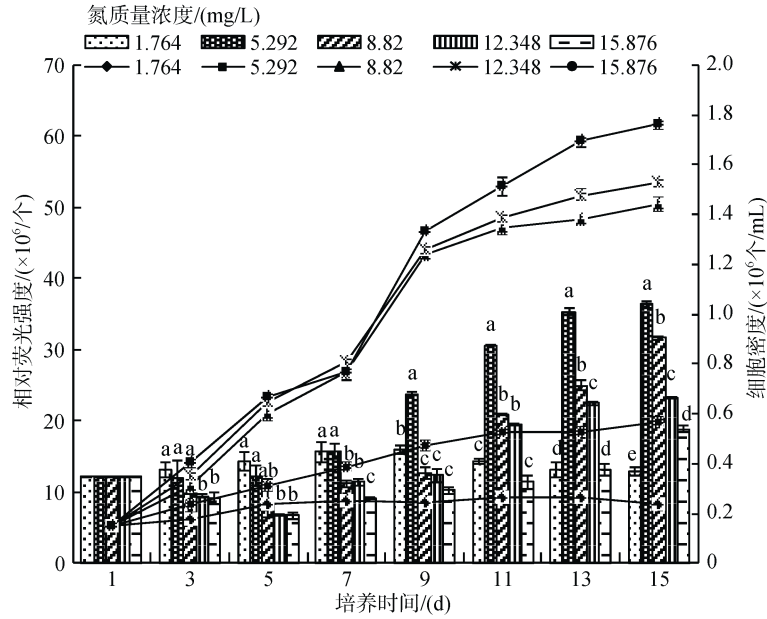


图 4 不同 $\text{NO}_3\text{-N}$ 质量浓度下缢缩菱形藻的繁殖曲线和油脂积累比较

Fig.4 The growth curves and lipid accumulation of *Nitzschia constricta* under different $\text{NO}_3\text{-N}$ concentrations

围内, 2 种底栖硅藻均能正常生长, 藻细胞繁殖速度均随 $\text{H}_2\text{PO}_4\text{-P}$ 质量浓度的增高而加快, 但到了较高质量浓度(0.884 mg/L)后, 藻细胞的繁殖速度不再明显加快, 从生长曲线可以看出, 咖啡双眉藻较缢缩菱形藻更能适应低磷环境(图 5 和图 6), 培养液 $\text{H}_2\text{PO}_4\text{-P}$ 质量浓度对 2 种底栖硅藻繁殖有显著影响($P<0.05$)。

随着 $\text{H}_2\text{PO}_4\text{-P}$ 质量浓度的增高, 2 种底栖硅藻细胞的油脂含量均呈现先降后升的变化规律, 且低质

量浓度的磷更有利于 2 种底栖硅藻细胞脂肪的积累。实验结束(15 d)时, 咖啡双眉藻和缢缩菱形藻细胞的油脂含量, 低磷质量浓度(0.164 mg/L)组分别是最高磷质量浓度(1.500 mg/L)组的 1.3 倍和 1.6 倍(图 5 和图 6), 低质量浓度磷对缢缩菱形藻油脂的影响大于咖啡双眉藻。培养液中 $\text{H}_2\text{PO}_4\text{-P}$ 质量浓度对 2 种底栖硅藻油脂含量的影响, 除高于 0.884 mg/L 质量浓度组外, 其余均呈显著影响($P<0.05$)。

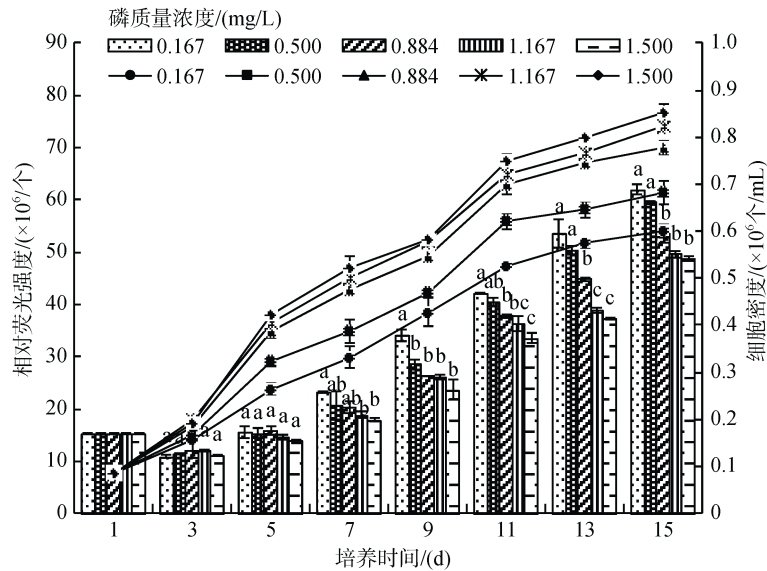
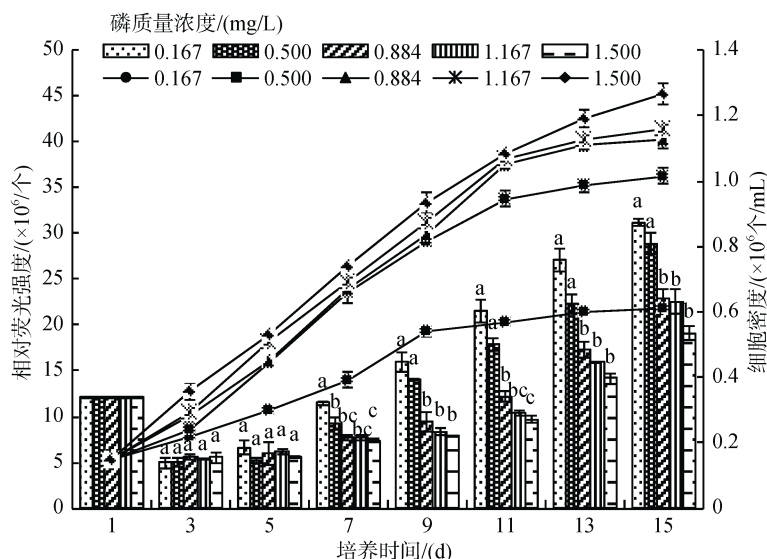


图 5 不同 $\text{H}_2\text{PO}_4\text{-P}$ 质量浓度下咖啡双眉藻的繁殖曲线和油脂积累

Fig.5 The growth curves and lipid accumulation of *Amphora coffeaeformis* under different $\text{H}_2\text{PO}_4\text{-P}$ concentrations

图6 不同 $\text{H}_2\text{PO}_4\text{-P}$ 质量浓度下缢缩菱形藻的繁殖曲线和油脂积累Fig.6 The growth curves and lipid accumulation of *Nitzschia constricta* under different $\text{H}_2\text{PO}_4\text{-P}$ concentrations

2.3 硅对2种底栖硅藻的繁殖和油脂积累的影响

硅对2种硅藻的生长情况影响相似,在实验设计的质量浓度范围内, $\text{SiO}_3\text{-Si}$ 质量浓度对2种底栖硅藻繁殖速度的影响均随质量浓度的增加而升高(图7和图8),且呈显著性($P < 0.05$),但当质量浓度达 1.532 mg/L 后,继续升高对2种底栖硅藻细胞繁殖速度的影响变为不显著($P > 0.05$)。实验后期发现,低质量浓度组硅藻细胞较高质量浓度组硅藻细胞先老化,可见,硅有利于硅藻繁殖周期的延长。

硅对2种底栖硅藻油脂积累影响与氮、磷相似,随着 $\text{SiO}_3\text{-Si}$ 质量浓度的增高,藻细胞脂肪含量也呈升高→降低→升高的规律变化,较低质量浓度的硅(低于 0.919 mg/L)更有利于硅藻细胞油脂的积累。在实验设计的质量浓度范围内,实验结束(15 d)时,咖啡双眉藻和缢缩菱形藻的油脂含量,最低硅质量浓度组(0.307 mg/L)分别是最高硅质量浓度组(2.758 mg/L)的1.3倍和1.5倍(图7和图8),低质量浓度的 $\text{SiO}_3\text{-Si}$ 更有利于2种底栖硅藻的油脂积累。方差分析表明:实验结束(15d)时, $\text{SiO}_3\text{-Si}$ 对2种底栖硅藻油脂含量的影响,质量浓度低于 1.532 mg/L 影响显著($P < 0.05$),质量浓度高于 1.532 mg/L 影响不显著($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 环境胁迫可能是促进硅藻细胞积累油脂的直接原因

添加不同质量浓度的 N、P、Si 营养培养实验表

明,缢缩菱形藻和咖啡双眉藻的相对油脂含量总体呈现先降低后升高的趋势。前期油脂含量的降低可能是由硅藻细胞进入新的环境,需要一个适应的过程,到指数生长期或更迟,培养基中的主要营养元素,即将被消耗尽,于是硅藻细胞开始积累油脂。N、P 和 Si 越早被消耗完,硅藻细胞越早开始积累油脂,其油脂积累也越多。可见,不利的环境条件,尤其是营养盐的缺乏,更有利于硅藻细胞油脂的积累。

3.2 氮质量浓度对缢缩菱形藻和咖啡双眉藻的繁殖和油脂含量的影响

N 对底栖硅藻繁殖速度的影响已见不少报道^[6-7]。本实验结果表明,咖啡双眉藻繁殖适宜的氮质量浓度为 $5.920 \sim 8.82 \text{ mg/L}$,较李雅娟等^[6](咖啡双眉藻最适氮质量浓度为 $2.5 \sim 5 \text{ mg/L}$)和王起华等^[8](咖啡双眉藻最适氮质量浓度为 $1.54 \sim 6.16 \text{ mg/L}$)的研究结果高,这可能是由于本实验的藻种分离于营养盐较高的海区,该藻株产生了耐高营养盐特性;缢缩菱形藻适宜的氮质量浓度为 $8.82 \sim 15.876 \text{ mg/L}$,较董金利报道^[9]的缢缩菱形藻在 $>12.35 \text{ mg/L}$ 才能繁殖要低,这可能是由于董金利在 $1.23 \sim 12.35 \text{ mg/L}$ 区间内没有设置实验组,影响了实验精度。氮是构成蛋白质的必要成分,在缺氮情况下藻细胞形成的蛋白质量减少,硅藻光合作用形成的能量物质有可能更多地转向合成油脂^[10]。Chelf^[11]认为不同的氮源质量浓度对油脂积累有很大影响,且目前普遍认为氮缺乏会导致微藻细胞内大量积累油脂^[12-13],本实验也印证了这一规律,培养液中不同氮质量浓度对2种底栖硅

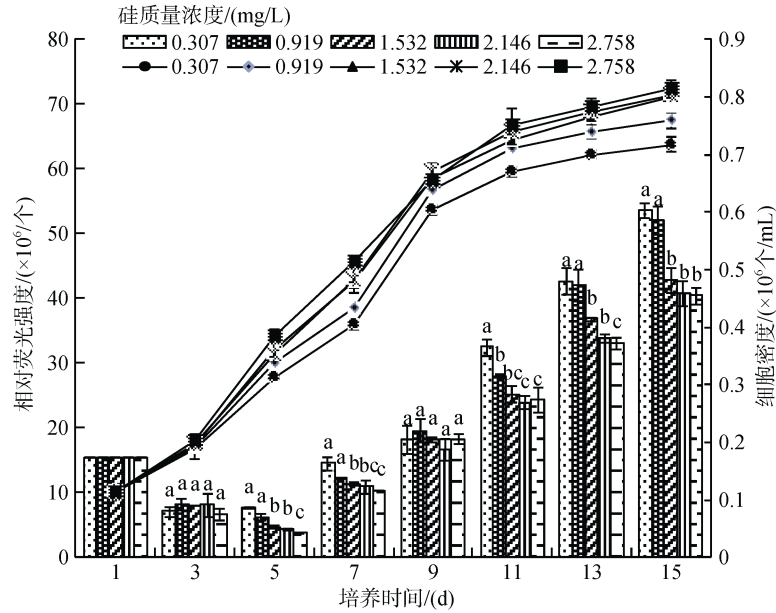


图 7 不同 $\text{SiO}_3\text{-Si}$ 质量浓度下咖啡双眉藻的繁殖曲线和油脂积累

Fig.7 The growth curves and lipid accumulation of *Amphora coffeaeformis* under different $\text{SiO}_3\text{-Si}$ concentrations

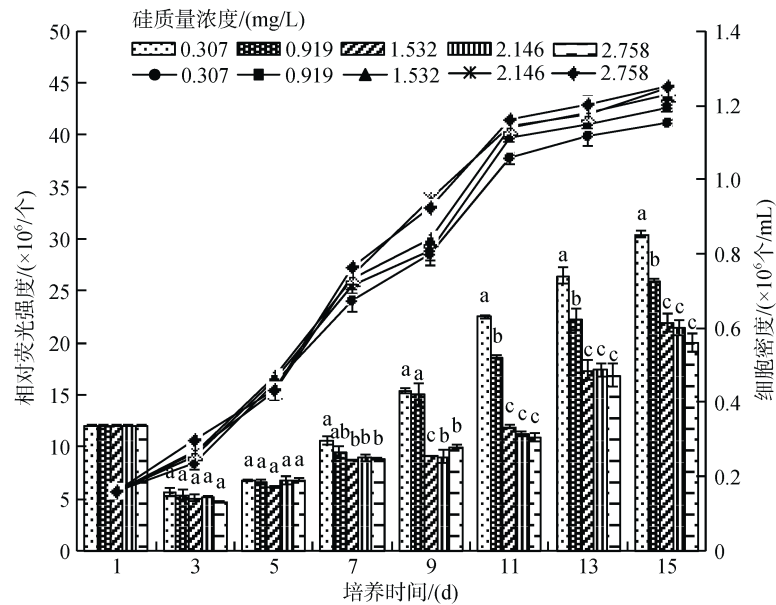


图 8 不同 $\text{SiO}_3\text{-Si}$ 质量浓度下缢缩菱形藻的繁殖曲线和油脂积累

Fig.8 The growth curves and lipid accumulation of *Nitzschia constricta* under different $\text{SiO}_3\text{-Si}$ concentrations

藻繁殖和油脂含量的影响均较大,适当降低培养基中氮质量浓度有利于油脂的积累。

3.3 磷质量浓度对 2 种底栖硅藻的繁殖和油脂含量的影响

2 种底栖硅藻繁殖速度随培养基中磷质量浓度的增高而加快,在 0.884~1.500 mg/L 范围内均能正常繁殖,这一现象符合藻类利用磷的特点,大多数微藻能够主动吸收磷,当环境磷充足时,细胞将吸

收的多于生理需要的磷储存于细胞内,环境缺磷时又可利用这些储存的磷进行代谢^[14]。一些藻类磷缺乏也能提高其油脂含量,如三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum* Bohlin)、角毛藻(*Chaetoceros*)、巴夫藻(*Pavlova viridis*)等;而另一些藻类磷缺乏反而导致油脂含量的降低,如屠夫绿球藻(*Nannochloris atomus*)和融合微藻(*Tetraselmis* sp.)^[15]。本实验的咖啡双眉藻和缢缩菱形藻属于前者,但磷缺乏较氮缺乏对藻细胞油脂积累的影响要小。随着磷质量浓度的降

低,藻细胞中油脂的含量回升越早,这可能是由于低初始质量浓度的磷可以较早地激活油脂合成途径。

3.4 硅质量浓度对 2 种底栖硅藻的繁殖和油脂积累的影响

本实验中,硅质量浓度在所设范围内,2 种底栖硅藻均能正常繁殖,但差异较小,硅质量浓度的增加没有明显地促进 2 种底栖硅藻的繁殖,且低初始硅质量浓度对 2 个藻株繁殖的影响没有低初始氮、磷质量浓度的显著。董金利^[9]、马志珍等^[16]、王渊源等^[17]报道在实验室内用自然海水培养底栖硅藻,即使不加硅盐仍能良好繁殖。大贝政治等采用营养去除法的实验发现,用不含硅的人工海水培养基培养一种卵形藻时,对其生长的抑制作用很小。本实验中低硅质量浓度组获得较高的油脂相对含量,这是因为硅缺乏会引起油脂合成过程中起作用的乙酰-CoA 羧化酶活力的增强^[10],低初始硅质量浓度对 2 个藻株繁殖的影响没有低初始氮、磷质量浓度影响的显著($P_N < P_P < P_{Si}$),硅缺乏还会导致新吸收的碳更多的用于脂类合成^[18]从而有利于提高油脂合成的能力。

本实验仅研究了氮、磷、硅单因子对硅藻细胞油脂积累的影响,事实上营养盐的配比(主要是氮磷比)对藻类的代谢产物和繁殖速率也有显著的影响^[7, 19-20],因此多因子组合对 2 种底栖硅藻繁殖速度和油脂积累影响还需要进一步深入实验和探讨。

参考文献:

- [1] Yusuf C. Biodiesel from microalgae[J]. Biotechnology Advances, 2007, 25(3): 294-306 .
- [2] 王晓青, 王稼, 江雪, 等.三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)油脂富集培养的研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2011, 48(3): 691-696 .
- [3] 魏东, 张学成. 氮源和 N/P 对眼点拟微绿球藻的生长、总脂含量和脂肪酸组成的影响[J]. 海洋科学, 2000, 24(7): 46-50 .
- [4] Evans C T, Ratledge C . Influence of Nitrogen Metabolism on Lipid Accumulation by *Rhodospiridium rubroide* CBS14[J] . Gen Microbiol, 1984, 130(7): 1704-1705 .
- [5] Yoon S H, Rhee J A . Quantitative Physiology of *Rhodotorula glutinis* for Microbial lipid Production [J] . Process Biochem, 1983, 18(5): 2-4 .
- [6] 李雅娟, 王起华. 氮、磷、铁、硅营养盐对底栖硅藻生长速率的影响[J]. 大连水产学院学报, 1998, 13(4):

- 7-14 .
- [7] 郭峰, 朱凌俊, 柯才焕, 等. 两种海洋底栖硅藻的培养条件研究[J]. 厦门大学报(自然科学版), 2005, 44(6): 831-835 .
- [8] Wang Qa, Li M , Wang S, et al . Studies on culture conditions of bent hic diatoms for feeding abalone: Effects of salinity, pH, nitrogenous and phosphate nutrients on growth rate[J] . Chin J Oceanol Limnol , 1998, 16 (1) : 78-83 .
- [9] 董金利. 海洋底栖硅藻 *Nitzschia constrict* 的分离、培养及固定化研究[D] . 福州: 福建师范大学, 2010 .
- [10] 程军, 葛婷婷, 冯佳, 等. 硅藻生长优化富集油脂的促进机理[J]. 新能源及工艺, 2010, 4: 27-32 .
- [11] Chelf P . Environmental control of lipid and biomass production in two diatom species[J] . Journal of Applied Phycology, 1990, 2: 121-130 .
- [12] Li Y, Han D, Sommerfeld M, et al . Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* sp. (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions[J]. Bioresource Technology, 2011, 102 (1): 123-129 .
- [13] Coverti A, Casazza A A, Ortiz E Y, et al . Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production[J]. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 2009, 48(6): 1146-1151 .
- [14] 王军, 杨素玲, 丛威, 等. 营养条件对产烃葡萄藻生长的影响[J]. 过程工程学报, 2003, 32: 141-145 .
- [15] Reitan K I, Rainuzzo J R, Olsen Y . Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae[J] . Phycol, 1994, 30(6): 972-979 .
- [16] 马志珍, 季梅芳, 陈汇远. 一种可作为鲍和海参饲料的底栖舟形藻的培养条件的研究[J]. 海洋通报, 1985, 4(4): 36-39.
- [17] 王渊源, 姜庆国, 江航宇. 培养小形舟形藻的氮、磷肥料量[J]. 1986, 10(5): 35-37 .
- [18] Mortensen S H, Borsheim K Y, Rainuzzo J, et al . Fatty acid and elemental composition of the marine diatom *Chaetoceros gracilis* Schütt. Effects of silicate

- deprivation, temperature and light intensity.[J] . Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1988, 122(2): 173-185 .
- [19] 李文权, 蔡阿根, 王宪, 等 . 光和营养盐对三角褐指藻生化组成的影响[J] . 中国环境科学, 1994, 14(3): 185-189 .
- [20] 张立言, 向保卿, 马志珍 . 两种硅藻生长繁殖条件的研究[J] . 海洋水产研究, 1982, 4: 79-87 .

Influence of Nitrogen, Phosphorus and Silicon on reproducing rate and lipid accumulation of *Amphora coffeaeformis* and *Nitzschia constricta*

WANG Yao-hua¹, WU Hong-xi^{2, 3}, HUANG Zhen-hua^{2, 3}, CHEN Xiao-xiao^{2, 3}, HU Yuan^{2, 3}, WANG Zhao-gen^{1, 3}

(1. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Zhejiang Mariculture Research Institute, Wenzhou 325005, China; 3. Zhejiang Province Coastal Waters of Biological Resources Development and Protection of Key Laboratory, Wenzhou 325005, China)

Received: Jul., 11, 2014

Key words: Nitrogen, Phosphorus and Silicon; Nile red fluorescence; reproduction; lipid

Abstract: The effects of Nitrogen, Phosphorus and Silicon on reproduction rate and lipid accumulation of *Amphora coffeaeformis* and *Nitzschia constricta* isolated from Wenzhou ocean using optical density method and Nile red fluorescence method were investigated. The results showed that the growth of these two kinds of benthic diatoms were inhibited at nitrogen concentration of 1.746 mg/L, and even died on the seventh day. However, the reproduction rate of these two kinds of benthic diatoms increased when the nitrogen concentration increased, however, the reproduction rate wasn't significantly accelerated after the nitrogen concentration reached 8.820 mg/L. The reproduction rate of these two kinds of benthic diatoms was accelerated with increasing phosphorus concentrations, however, the reproducing rate was restricted when the nitrogen concentration reached 0.884 mg/L. The reproduction rate of two benthic diatoms was not influenced as increasing the silicon concentration. The order of the effect of three kinds of nutritional elements was N>P>Si. Results also showed that the lipid contents of two kinds of benthic diatoms decreased first, and then increased, and the lipid accumulation is mainly concentrated at the late growth stage. The lipid accumulation capacity of these two kinds of benthic diatoms could be enhanced by nitrogen, phosphorus and silicon concentration limitation. The nitrogen limitation has a more significant effect than phosphorus and silicon limitation.

(本文编辑: 梁德海)