

四种营养盐对舟形藻(*Navicula*)BT001 生长速率的影响*

郑维发¹ 王雪梅¹ 王义琴² 储成才²

(1. 徐州师范大学 江苏省药用植物生物技术重点实验室 徐州 221116;

2. 中国科学院遗传与发育研究所 北京 100101)

提要 以 I.A.M. 收集的培养基为基本培养基, 采用单因子和 $L_{16}(4^5)$ 正交设计法, 进行了舟形藻 BT001 对 N、P、Fe、Si 四种营养盐最适需求的研究, 并在此基础上, 研究了尿素对正交优化组合的影响以及以尿素作为氮源对正交优化组合的影响。结果表明, N、P、Fe、Si 四种营养盐最佳单因子水平为: KNO_3 , 300mg/L; $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 40mg/L; $FeCl_3$, 4mg/L; $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$, 200mg/L。四种营养盐正交组合水平为: KNO_3 , 150mg/L; $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 40mg/L; $FeCl_3$, 4mg/L; $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$, 200mg/L。在正交组合水平基础上, 添加 16mg/L $CO(NH_2)_2$, 可更好的促进该藻的生长和繁殖。在 8 天的培养中, 最大细胞相对生长率可达 0.1577。在等摩尔氮源条件下, 以 $CO(NH_2)_2$ 代替正交优化水平组合中的 KNO_3 对舟形藻 BT001 进行 11 天的培养。结果表明, 以 $CO(NH_2)_2$ 为氮源的藻细胞最大生长密度可达 2.69×10^5 cell/ml, 明显地高于硝酸钾作为氮源培养的藻细胞密度。

关键词 舟形藻 BT001, 营养盐, 正交实验, 优化组合水平
中图分类号 Q949.270.5

底栖硅藻常被用作鲍、刺参等经济海产动物幼体的主要开口饵料, 其中舟形藻是贝类养殖中作为开口饵料的常见单胞藻类(Daume *et al*, 1999, 2004; Najmudeen *et al*, 2004; Ricardo *et al*, 2003; Brown *et al*, 1997)。该藻株在生长过程中向培养基分泌大量的硫酸化多糖。现代药理学认为, 硫酸化多糖具有多种生物活性, 不仅可以作为广谱免疫促进剂, 具有免疫调节功能, 还可以抗感染、抗放射、抗凝血、降血糖、预防和治疗肿瘤、艾滋病等多种疾病(Schaeffer *et al*, 2000; Siddanta *et al*, 1999; Noda *et al*, 1999; Leung *et al*, 1997)。GC-MS 分析结果表明, 该舟形藻富含多不饱和脂肪酸(PUFA), 其中含 γ -亚麻酸(GLA)7.55%、二十碳五烯酸(EPA)21.52%、二十二碳六烯酸(DHA)3.64%。GLA、EPA、DHA 对

心血管疾病、高血脂症、肿瘤、炎症、抑郁症等均有显著的预防作用(Gill *et al*, 1997)。EPA 还是鲍生长发育的必不可少的营养物质之一(Kangsen *et al*, 1996)。因此, 该舟形藻不仅是贝类等水产动物理想的开口饵料, 也是一种具有潜在药学价值的海洋生物制药原料。研究表明, N、P、Fe、Si 四种营养成分是影响硅藻生长的重要因子, 不同的硅藻对 N、P、Fe、Si 等营养元素的需求有很大差异(李雅娟等, 1998; Wang *et al*, 1999; 梁英等, 1999; 马志珍等, 1996)。为了探索适合舟形藻 BT001 生长的培养基, 作者在 I.A.M. 收集的培养基基础上, 开展了 N、P、Fe、Si 四种营养元素对舟形藻 BT001 生长影响, 并对这四种营养元素进行多因子组合实验, 探索适合舟形藻 BT001 高密度生长的培养基。

* 国家 863 高新技术项目, 2004AA62808 号; 江苏省高新技术产业项目, 02KJA360002 号。郑维发, 教授, 通讯作者, E-mail: yyzw@xznu.edu.cn

收稿日期: 2005-10-25; 收修改稿日期: 2006-05-30

1 材料与方法

1.1 藻株来源

作者于 2003 年在烟台海域分离得到一株舟形藻, 命名为舟形藻 BT001(*Navicula* BT001)。

1.2 主要试剂及仪器

硝酸钾(KNO_3), 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), 三氯化铁($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 硅酸钠($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) (分析纯, 上海试剂一厂), 光照培养箱 GC-300(上海一恒科技有限公司)。

1.3 舟形藻 BT001 培养环境条件

参考马志珍等(1996)和 Leandro 等(2003), 以 I.A.M. 收集的培养基 将舟形藻 BT001 在光强 5800 lx、光暗周期 12h: 12h、温度(24 ± 1) 的环境下静止培养, 每天振摇 3 次。

1.4 生长速率的测定

舟形藻 BT001 的相对生长速率按公式 $K = (\lg N - \lg N_0)/T$ 计算, 式中 N 为经过 T 时间培养后单位体积的藻细胞数, N_0 为 T 培养时间开始时单位体积藻细胞数, T 为培养时间(天)。以血球记数板统计单位体积藻细胞的数量。

1.5 N、P、Fe、Si 四因素单因子实验

舟形藻 BT001 在接种前一天换上不加 N、P、Fe、Si 营养盐的 I.A.M. 收集的培养基。培养 24h 后分为 KNO_3 组、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 组、 FeCl_3 组和 $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 组。其中 KNO_3 组按 0、75、150、300 和 600mg/L 的浓度梯度加入 KNO_3 ; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 组按 0、20、40 和 80mg/L 梯度加入 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; FeCl_3 组按 0、1、2、4 和 8mg/L 加入 FeCl_3 ; $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 组按 50、100、200 和 400mg/L 加入 $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 。每组重复 3 次。每天检测单位体积藻细胞的数量, 分别观察 N、P、Fe、Si 水平对该藻生长的影响。

1.6 N、P、Fe、Si 四因素正交实验

舟形藻 BT001 在接种前一天换上不加 N、P、Fe、Si 营养盐的 I.A.M. 收集的培养基。培养 24h

后分别加入: (A) 75、150、300 和 600mg/L 四个水平的 KNO_3 ; (B) 20、40、80 和 160mg/L 四个水平的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; (C) 1、2、4 和 8mg/L 四个水平的 FeCl_3 ; (D) 50、100、200 和 400mg/L 四个水平的 $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 。参照 Wang 等(1999)和梁英等(1999)选用 $L_{16}(4^5)$ 设计, 进行上述四种营养盐因子对该舟形藻生长影响的正交实验。

1.7 尿素对正交实验结果的优化

在四种营养盐正交优化组合的培养液中, 分别添加浓度为 0、4、8、12、16 和 20mg/L 的尿素, 在方法 1.3 所述的条件下对该舟形藻作 8 天培养。每天测定生长速率, 第 9 天收集藻细胞, 冷冻干燥后测定生物量。同时, 以尿素代替四种营养盐正交优化组合培养基中的 KNO_3 , 在方法 1.3 所述的条件下对该舟形藻作 12 天的培养, 每天测定细胞密度并于第 13 天收集藻细胞, 冷冻干燥后测定生物量。

2 结果

2.1 N、P、Fe、Si 四因素单因子实验

氮在细胞代谢中是形成氨基酸、嘌呤、氨基糖和胺类化合物的基本元素(Seppala *et al*, 1999)。微藻可以利用的氮源范围较广, 可以有效利用的氮源有硝酸盐、铵盐或尿素等, 其中无机氮源以硝酸钾和硝酸钠最常用。作者以 KNO_3 为氮源, 考察了不同浓度的 KNO_3 对舟形藻生长的影响。 KNO_3 浓度在 0—300mg/L 范围内对舟形藻的生长具有明显的促进作用; 当 KNO_3 浓度大于 300mg/L 时, 舟形藻 BT001 的生长呈现明显的下降趋势(表 1)。

磷在生物体内是合成 ATP、GTP、核酸、磷脂、辅酶等化合物的基本元素(Seppala *et al*, 1999)。海水单细胞藻类培养液最常用无机磷为磷酸氢二钾和磷酸氢二钠。作者以 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 为磷源, 考察了不同浓度的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 对

表 1 四种单因子的不同水平对舟形藻 BT001 相对生长率的影响
Tab. 1 Individual effect of 4 factors on growth of *Navicula* BT001

营养盐	水平 1	水平 2	水平 3	水平 4	水平 5
KNO_3	0.039	0.056	0.063	0.074	0.056
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0.031	0.039	0.043	0.039	—
FeCl_3	0.036	0.097	0.116	0.153	0.111
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0.039	0.078	0.080	0.057	—

注: KNO_3 的 5 水平分别为 0、75、150、300 和 600mg/L; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 的 4 个水平分别为 0、20、40 和 80mg/L; FeCl_3 的 5 个水平分别为 0、1、2、4 和 8mg/L; $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 的 4 个水平分别为 50、100、200 和 400mg/L

该舟形藻的生长情况。结果表明, 浓度在 0—40mg/L 范围内可以较好的促进舟形藻 BT001 的生长; 当其浓度大于 40mg/L 时, 舟形藻 BT001 的生长受到明显的抑制(表 1)。

铁是藻类生长和氮固定的最重要的痕量元素。近年来在东太平洋和南大西洋先后进行了“铁肥试验”, 从船上将二价铁倾入海中, 果然诱发出藻类勃发, 生产力增加高达数十倍, 证明了铁的确是海洋生产力的限制因素(Coale *et al.*, 1996)。在 Fe 单因子实验中, 当 FeCl_3 浓度在 0—4mg/L 范围时对舟形藻 BT001 的生长具有明显的促进作用; 当其浓度大于 4mg/L 时, 舟形藻 BT001 的生长速率呈现明显的下降趋势(表 1)。

硅是硅藻合成细胞壁的必需元素(Wu *et al.*,

2003)。在本实验中, $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 浓度在 50—200mg/L 范围内对舟形藻 BT001 的生长具有明显的促进作用; 当其浓度大于 200mg/L 时, 舟形藻 BT001 的生长速率呈现明显的下降趋势(表 1)。

2.2 N、P、Fe、Si 四因子对舟形藻 BT001 生长速率的影响顺序和优化水平组合

根据表 2 中的极差 R 值, 可以看出四因素的影响主次顺序为: $B > D > A > C$ 。图 2 也显示出 B 因素对相对生长率的影响最大。因此该因素为影响藻细胞生长的主要因素。取主要因素 B 的最好水平, 即第二水平。由于因素 D 的第三、第四水平对相对生长率的影响相差不大, 从节约试剂考虑, 取其第三水平, 其余因素取最好水平(表 3)。因此, 四因素最优水平组合为: KNO_3 浓度为

表 2 四种营养盐对舟形藻 BT001 生长的影响正交试验结果
Tab. 2 Results of orthogonal test on 4 mineral nutrients for the growth of *Navicula* BT001

实验号	因素				相对生长率 K
	A(KNO_3)	B(Na_2HPO_4)	C(FeCl_3)	D(Na_2SiO_3)	
1	1	1	1	1	0.051224
2	1	2	2	2	0.079713
3	1	3	3	3	0.056235
4	1	4	4	4	0.041217
5	2	1	2	3	0.065276
6	2	2	1	4	0.076831
7	2	3	4	1	0.050507
8	2	4	3	2	0.042913
9	3	1	3	4	0.082628
10	3	2	4	3	0.065509
11	3	3	1	2	0.041356
12	3	4	2	1	0.038337
13	4	1	4	2	0.063621
14	4	2	3	1	0.045295
15	4	3	2	4	0.037848
16	4	4	1	3	0.051073
K1	0.228389	0.262749	0.220485	0.185364	
K2	0.235527	0.267348	0.221174	0.227603	
K3	0.227830	0.185946	0.227071	0.238092	
K4	0.197837	0.17354	0.220854	0.238524	
k1	0.057097	0.065687	0.055121	0.046341	
k2	0.058882	0.066837	0.055294	0.056901	
k3	0.056958	0.046487	0.056768	0.059523	
k4	0.049459	0.043385	0.055214	0.059631	
R	0.009423	0.023452	0.001647	0.01329	

表 3 正交实验中四因素的四个不同水平对舟形藻 BT001 生长速率影响

Tab. 3 Combinational effects of 4 factors on the growth rate of *Navicula* BT001 in orthogonal test

营养盐	水平 1	水平 2	水平 3	水平 4
KNO_3	0.057	0.059	0.056	0.049
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0.065	0.067	0.046	0.043
FeCl_3	0.055	0.055	0.057	0.055
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0.046	0.056	0.059	0.059

注: KNO_3 的 4 水平分别为 75、150、300 和 600mg/L; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 的 4 个水平分别为 20、40、80 和 160mg/L; FeCl_3 的 4 个水平分别为 1、2、4 和 8mg/L; $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 的 4 个水平分别为 50、100、200 和 400mg/L

150mg/L、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 浓度为 40mg/L、 FeCl_3 浓度为 4mg/L、 $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 浓度为 200mg/L。

2.3 舟形藻 BT001 在优化水平组合培养基中生长情况

在正交实验优化水平组合的培养基中, 舟形藻 BT001 在接种的第 2 天藻细胞开始分裂, 第 4 天进入对数期。生长速率一直递增到接种后的第 10 天, 最大藻细胞密度达到 $2.31 \times 10^5/\text{ml}$ 。与此相比, I.A.M.收集的培养基 II, 第 6 天才进入对数期, 第 9 天达最大细胞密度时仅有 $1.38 \times 10^5/\text{ml}$ (图 1)。由此可见, 舟形藻 BT001 在优化水平组合培养基中生长情况良好。

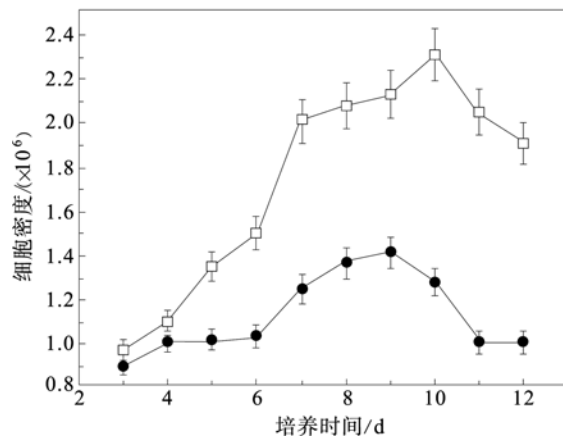


图 1 舟形藻 BT001 在四种营养盐优化水平组合培养基中的生长情况

Fig. 1 *Navicula* BT001 growth in the medium containing 4 minerals in the optimal combination

—□—: 四种营养盐优化水平组合培养基;
—●—: I.A.M.收集的培养基 II

2.4 尿素对正交实验培养基中舟形藻 BT001 生长的影响

在正交优化组合培养基中添加尿素对舟形藻 BT001 的生长速率和生物量的积累有显著促进作用。结果表明, 尿素浓度在 4—16mg/L 范围内可以明显的促进舟形藻 BT001 在正交组合培养基中的生长速率, 其中添加 16mg/L 的尿素可使该藻的相对生长速率提高到 0.15774(图 2)。尿素浓度在 4—16mg/L 范围内还明显增加舟形藻 BT001 生物量的积累, 其中, 尿素浓度在 8mg/L 时, 对生物量积累的促进作用最为显著, 尿素浓度进一步提高时生物量积累呈下降的趋势(图 3)。显微镜检显示, 藻细胞在尿素浓度为 8mg/L 以下时体积较大, 而在 8mg/L 以上时, 藻细胞体积随尿素浓度的增加而减小。在正交实验培养基中, 以 44.554mg/L 尿素代替正交培养基中 150mg/L

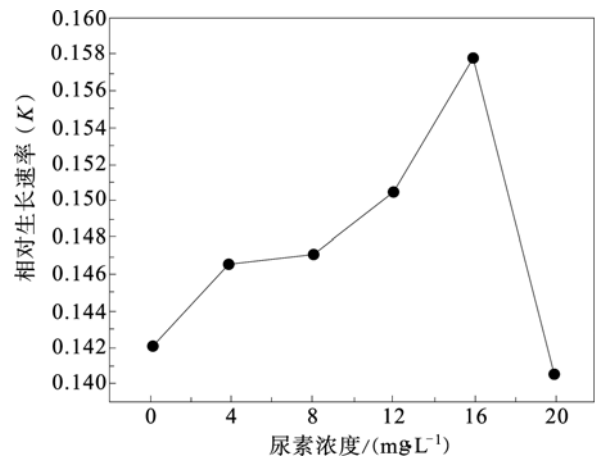


图 2 不同浓度的尿素对正交组合培养基中舟形藻 BT001 生长的影响

Fig. 2 Effects on growth rate of *Navicula* BT001 under different concentrations of urea

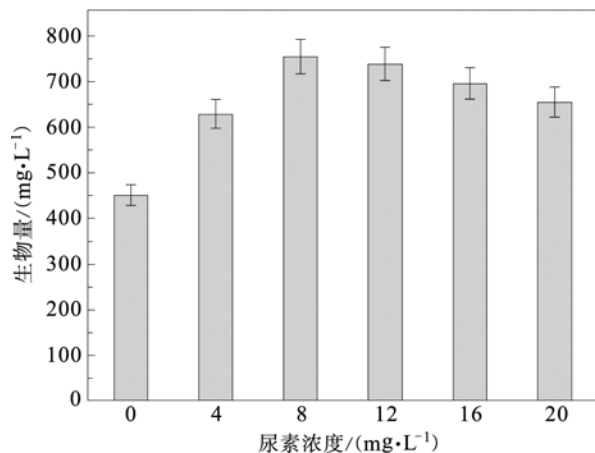


图 3 添加尿素对正交组合培养基中的舟形藻 BT001 生长的影响($n=5$, \pm SD)

Fig. 3 Effect on biomass accumulation of *Navicula* BT001 in urea-added medium in orthogonal test ($n=5$, \pm SD)

的硝酸钾(等摩尔 N)对舟形藻 BT001 进行培养, 结果表明, 舟形藻 BT001 在以尿素为氮源的正交组合培养基中的细胞密度第 9 天就超过了该藻在以硝酸钾为氮源的正交组合培养基中的细胞密度并持续增加到第 11 天, 最高藻细胞密度达 $2.69 \times 10^5/\text{ml}$, 生物量积累达 722.21mg/L 干物质。而以硝酸钾为氮源的正交组合培养基细胞密度增长趋势只持续到第 10 天(图 4), 最高藻细胞密度为 $2.31 \times 10^5/\text{ml}$, 生物量仅有 450.73mg/L 干物质。

3 讨论

底栖硅藻在贝类等水产动物养殖中占有非常重要的地位, 而舟形藻又是贝类养殖常用的饵料生物。该舟形藻含有丰富的 γ -亚麻酸 (GLA)、二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸 (DHA), 不仅对水产动物的生长发育有促进作用,

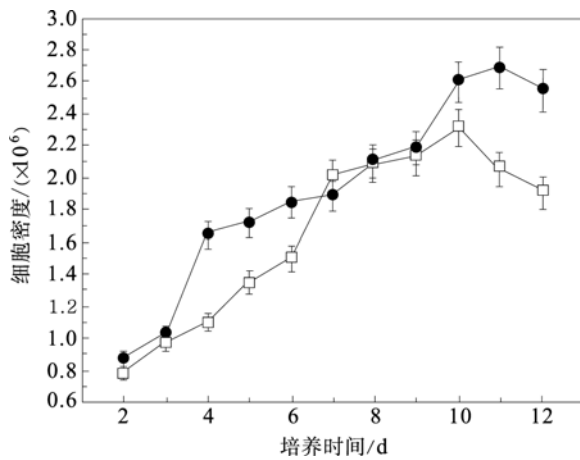


图4 尿素作为氮源对正交组合培养基中的舟形藻 BT001 细胞密度的影响($n = 5, \pm SD$)

Fig. 4 Effect on cell density of *Navicula* BT001 in urea-added medium with different forms of nitrogen in orthogonal test ($n = 5, \pm SD$)

—□—: 硝酸钾为氮源的优化培养基;
—●—: 尿素为氮源的优化组合培养基

而且为人体必需的不饱和脂肪酸, 在生命活动中起着重要作用。因此该藻无论是作为水产养殖的生物饵料还是作为海洋药物资源, 都有很大的开发潜力。

硅藻的规模培养中, 各营养盐常用的配比为 N P Fe Si = 10 1 0.1 1 ($\times 10^{-6}$)。然而天然水体中的不同营养盐对硅藻的种类及其丰度有显著影响(Kelly *et al.*, 2004)。为了综合的探讨各营养因子对舟形藻 BT001 生长的影响以便找到适合该藻生长的优化培养基, 作者首先从单因子实验入手, 探讨了 N、P、Fe、Si 单因子对舟形藻 BT001 生长的影响, 继而采用正交设计对 N、P、Fe、Si 四种营养因子进行了综合探讨。在单因子实验中 N、P、Fe、Si 营养盐的最适浓度分别为 300mg/L、40mg/L、4mg/L、200mg/L。在正交实验中, 铁、磷和硅营养盐的优化浓度与单因子实验的结果较吻合, 分别为 4mg/L、40mg/L、200mg/L, 而氮营养盐的最适浓度较单因子实验低为 150mg/L。正交实验考虑了各因子的交互作用, 所以正交实验的结果具有更大的可靠性。因此正交实验优化的培养基十分有利于舟形藻 BT001 的生长。另有研究表明(Simental *et al.*, 2003), 在培养基中用适当的农业肥料代替无机盐对某些藻类进行培养, 不仅其效果与无机盐作用相似, 而且大大节约了生产成本。据此, 作者在正交实验优化培养基中辅以尿素对该舟形藻进

行培养。结果表明, 添加尿素的藻细胞生长速率明显高于对照组, 其中当尿素浓度达到 16mg/L 时最为显著。在 8 天的培养中, 藻细胞密度可达到 5.483×10^5 cell/ml。在此基础上, 以尿素完全代替硝酸钾对该舟形藻进行培养。结果显示以尿素为氮源的最高藻细胞密度明显高于以硝酸钾为氮源的培养液。提示用尿素作为氮源对该藻进行培养不仅完全可能, 而且降低了培养成本。由于影响藻类生长的因素还有很多, 本文中仅以四种营养盐对舟形藻的生长影响做了探讨。有关其他因素对该舟形藻生长的影响, 将作进一步的研究。

参 考 文 献

- 马志珍, 张继红, 1996. 海产底栖硅藻的固定化培养研究. 中国水产科学, 3(2): 13—19
- 李雅娟, 王起华, 1998. 氮、磷、铁、硅营养盐对底栖硅藻生长速率的影响. 大连水产学院学报, 13(4): 7—14
- 梁 英, 麦康森, 孙世春等, 1999. 不同的营养盐浓度对三角褐指藻生长的影响. 海洋湖沼通报, 4: 43—47
- Brown M R, Jeffrey S W, Volkman J K *et al.*, 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151: 315—316
- Coale K H, Johnson K S, Fitzwater S E *et al.*, 1996. A mesoscale phytoplankton bloom in the polar Southern Ocean stimulated by iron fertilization. *Nature*, 383: 495—501
- Daume S, Brand-Gardner S, Woelkerling W J, 1999. Preferential settlement of abalone larvae: diatom films vs. non-geniculate coralline red algae. *Aquaculture*, 174: 243—254
- Daume S, Huchette S, Ryan S *et al.*, 2004. Nursery culture of *Haliotis rubra*: the effect of cultured algae and larval density on settlement and juvenile production. *Aquaculture*, 236: 221—239
- Gill I, Valivety R, 1997. Polyunsaturated fatty acids, part 1: Occurrence, biological activities and applications. *Trends Biotech*, 15: 401—409
- Kangsen M, Mercer J P, Donlon J, 1996. Comparative studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* L. and *Haliotis discus hannai* Ino. V. The role of polyunsaturated fatty acids of macroalgae in abalone nutrition. *Aquaculture*, 139: 77—89
- Kelly M G, Wilson S, 2004. Effect of phosphorus stripping on water chemistry and diatom ecology in an eastern lowland river. *Water Res*, 38: 1559—1567
- Leandro S M, Gil M C, Delgadillo I, 2003. Partial characterisation of exopolysaccharides exuded by planktonic diatoms maintained in batch cultures. *Acta Oecologica*, 24(Supplement 1): S49—S55
- Leung M Y K, Fung K P, Choy Y M, 1997. The isolation and characterization of an immunomodulatory and anti-tumor polysaccharide preparation from *Flammulina velutipes*. *Immunopharm*, 35(3): 255—263

- Najmudeen T M, Victor A C C, 2004. Seed production and juvenile rearing of the tropical abalone *Haliotis varia* Linnaeus 1758. *Aquaculture*, 234: 277—292
- Noda H, Amano H, Arashima K, Nisizawa K, 1999. Antitumor activity of marine algae. *Hydrobiologia*, 204: 577—584
- Ricardo S B, Casandra A B, Arturo E H, 2003. The effect of irradiance on the survival and growth of abalone postlarvae *Haliotis fulgens* fed *Navicula incerta*. *Aquaculture*, 228: 237—248
- Schaeffer D J, Krylov V S, 2000. Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and Cyanobacteria. *Ecotoxic Environ Safety*, 45(3): 208—227
- Seppala J, Tamminen T, Kaitala S, 1999. Experimental evaluation of nutrient limitation of phytoplankton communities in the Gulf of Riga. *J Marine Sys*, 23: 107—126
- Siddanta A K, Shanmugan M, Mody K H *et al.*, 1999. Sulphated polysaccharides of *Codium dwarkense* Boergs from the west coast of India: chemical composition and blood anticoagulant activity. *Inter J Biol Macrom*, 26: 151—154
- Simental J A, S á nchez-Saavedra M P, 2003. The effect of agricultural fertilizer on growth rate of benthic diatoms. *Aqua Eng*, 27: 265—272
- Wang Q H, Li Y J, Li M, 1999. Studies on culture conditions of benthic diatoms for feeding abalone . Effects of iron and silicon nutrients and of orthogonal combinations of nitrogen, phosphorus, iron and silicon on growth rate. *Chin J Oceanol Limnol*, 17(2): 105—111
- Wu J T, Chou T L, 2003. Silicate as the limiting nutrient for phytoplankton in a subtropical eutrophic estuary of Taiwan Estuarine, *Coastal Shelf Sci*, 58: 155—162

EFFECTS OF DIFFERENT NUTRITIONAL MINERALS ON THE GROWTH OF *NAVICULA* BT001

ZHENG Wei-Fa¹, WANG Xue-Mei¹, WANG Yi-Qin², CHU Cheng-Cai²

(1. Key Laboratory of Biotechnology for Medicinal Plants of Jiangsu Province, Xuzhou Normal University, Xuzhou, 221116;

2. Institute of Genetics & Development, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100101)

Abstract Marine diatom is one of the primary production contributors in marine ecosystem, and essential feeding stuff in aquiculture. The benthic species *Navicula* that usually contain rich polyunsaturated fatty acids are often used in the first choice to feed young seashells such as abalone. One of *Navicula* species, named *Navicula* BT001 was sampled in Yantai seashore (Shandong, China) and later isolated. This species can excrete large amount of exopolysaccharides and produce rich gamma-linoleic acid (GLA, 7.55%), ecosapentanoic acid (EPA, 21.52%) and docosahexanoic acid (DHA, 3.64%).

This study aimed to determine the optimal formula of four essential inorganic minerals KNO_3 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, FeCl_3 and $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ for growth of *Navicula* BT001 in our culture. The optimal composition and concentration of the minerals were determined by single-factor test and combinational orthogonal test $L_{16}(4^5)$. *Navicula* BT001 was cultured at the optimal concentration set by orthogonal test. To reduce nitrogen cost, urea was used as the substitute of KNO_3 . The effect on diatom growth by urea was evaluated at the optimal combinations. The results of four single-factor tests showed that the optimal concentration for KNO_3 was 300mg/L, for $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ at 40mg/L, FeCl_3 at 4mg/L and $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ at 200mg/L. In orthogonal test, the optimal concentration of the four mineral nutrients was determined at 150mg/L for KNO_3 , 40mg/L for $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 4mg/L for FeCl_3 , and 200mg/L for $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. It can be seen that these results were nearly the same to those of by single-factor test, except for KNO_3 , whose optimal concentration was 150mg/L in orthogonal test. According to the orthogonal test result, the order of impact by the four mineral nutrients on diatom growth was $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} > \text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O} > \text{KNO}_3 > \text{FeCl}_3$. Complete substitution of KNO_3 by $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ in same mole concentration showed clear increase in growth rate and biomass accumulation, suggesting that urea is an ideal nitrogen source for mass mariculture production of *Navicula* BT001.

Key words *Navicula* BT001, Nutrients, Orthogonal test, Optimal combination