

航天搭载与非搭载 舟形藻(*Navicula tenera*)培养基的优化

吴素珍^{1,2}, 张小平^{1,2,①}, 郑维发³, 李加林¹

(1. 安徽师范大学生命科学学院, 安徽 芜湖 241000; 2. 安徽省高校生物环境与生态安全省级重点实验室, 安徽 芜湖 241000;
3. 江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏 徐州 221116)

摘要: 通过单因子和正交实验探讨了培养液中不同浓度 KNO_3 、 Na_2HPO_4 、 FeCl_3 和 Na_2SiO_3 对通过“神舟 5 号”飞船搭载与非搭载舟形藻(*Navicula tenera*)生长的影响, 确立了适合搭载与非搭载舟形藻生长的最佳培养基组合。结果表明, 经搭载后舟形藻生长所需的营养盐组合发生了变化。通过正交实验筛选出适合搭载舟形藻生长的最佳培养基为含 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KNO_3 、 $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ FeCl_3 和 $700 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 的 F/2 培养基; 适合非搭载舟形藻生长的最佳培养基为含 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KNO_3 、 $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ FeCl_3 和 $700 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 的 F/2 培养基。

关键词: 舟形藻; 营养盐; 航天搭载; 生长; 正交实验

中图分类号: Q949.202 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004–0978(2006)02–0033–05

Optimization of culture media for spaceflight and nonspaceflight *Navicula tenera* WU Su-zhen^{1,2}, ZHANG Xiao-ping^{1,2,①}, ZHENG Wei-fa³, LI Jia-lin¹ (1. School of Bioscience, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China; 2. Key Laboratory of Biotic Environment and Ecological Safety in Anhui Province, Wuhu 241000, China; 3. Key Laboratory for Biotechnology on Medicinal Plants of Jiangsu Province, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2006, 15(2): 33–37

Abstract: The optimal combinations of different concentrations of KNO_3 , Na_2HPO_4 , FeCl_3 and Na_2SiO_3 in culture media for spaceflight and nonspaceflight *Navicula tenera* were studied by single factor experiment and orthogonal experiment [$L_{16}(4^5)$]. The results indicated that the combinations and concentrations of nutrients in culture medium for *N. tenera* growth were changed after spaceflight. The best medium for growth of spaceflight *N. tenera* was F/2 containing $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KNO_3 , $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ FeCl_3 and $700 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, while the best medium for nonspaceflight *N. tenera* was F/2 containing $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KNO_3 , $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ FeCl_3 and $700 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$.

Key words: *Navicula tenera*; nutrient; spaceflight; growth; orthogonal experiment

舟形藻(*Navicula tenera*)属硅藻门舟形藻属(*Navicula* Bory)。舟形藻属是硅藻中种类最多的属, 包括近千种, 绝大多数营底栖生活^[1]。这些底栖硅藻常被用作鲍鱼、刺参等经济海产动物幼体的主要开口饵料。舟形藻在生长过程中向基质分泌的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、抗凝血、降血糖、预防和治疗肿瘤及爱滋病等^[2]。气质联用分析结果表明, 舟形藻含有多种多不饱和脂肪酸, 其中 γ -亚麻酸、二十碳五烯酸、二十二碳六

烯酸等成分对心血管疾病、高血脂、肿瘤及炎症等疾病均有显著的预防作用^[3], 是具有潜在药学价值的海洋生物之一, 具有广阔的开发前景。为了培育更多的舟形藻优良品种, 作者开展了空间诱变育种研

收稿日期: 2005–11–11

基金项目: 安徽省高校生物环境与生态安全省级重点实验室基金资助项目和江苏省高新技术产业化项目(02KJ360008)

作者简介: 吴素珍(1980–), 女, 安徽宿松人, 硕士研究生, 主要从事天然产物的研究。

① 通讯作者 E-mail: pinghengxu@sina.com.cn

究,利用“神舟 5 号”飞船搭载舟形藻的藻种,期望能通过高空各种环境因素的综合作用,使舟形藻的某些生物学特性发生变化(如生物量以及胞外多糖产量增加、多不饱和脂肪酸含量提高等)。为此,笔者首先对适合搭载与非搭载舟形藻生长的最佳培养基进行筛选,以期为舟形藻的培养和开发提供一些基础实验数据。

1 材料和方法

1.1 藻种来源

搭载与非搭载舟形藻藻种由江苏省药用植物与生物技术重点实验室分离并提供。

1.2 方法

1.2.1 单因子实验 以 F/2 培养基为基础培养基,调整 KNO_3 浓度为 0、75、150、300、600 和 1 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 浓度为 0、15、30、60、120 和 240 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, FeCl_3 浓度为 0、6、12、24、48 和 96 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 浓度为 400、500、600、700、800 和 900 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,每组设 3 个平行,接种体积比为 1:5。在接种前离心以排除原藻种培养液的影响。

1.2.2 正交实验 正交表的设计参照文献[4]所述方法,选用 $L_{16}(4^5)$ 表,在单因子实验确定的最佳浓度基础上设置 KNO_3 浓度(A)为 75、150、300 和 600 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 浓度(B)为 15、30、60 和 120 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, FeCl_3 浓度(C)为 6、12、24 和 48 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 浓度(D)为 500、600、700 和 800。每组设 3 个平行。

1.2.3 舟形藻培养 实验在江苏省药用植物与生物技术重点实验室海洋微藻培养室培养,以 F/2 培养基为基础培养基,根据实验设计的要求,调整培养液中各化合物的浓度。在 1 L 的培养瓶中通气培养,光源为日光灯,光强 6 000 lx,每天光照 12 h,培养温度 24 ℃。

1.2.4 细胞密度及生长速率的测定 每天定时取 1 mL 藻液,以血球计数板记录藻细胞的数量,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 培养时间开始时的单位体积藻细胞数, T 为培养时间(d)。取培养开始时的单位体积藻液中的细胞数

和培养至第 8 天时单位体积藻液中的细胞数进行计算。

2 结果和分析

2.1 4 种营养盐对舟形藻生长影响的单因子实验结果

氮在细胞代谢中是形成氨基酸、嘌呤、卟啉氨基糖等成分的基本元素^[5]。微藻可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^[6,7]。单因子实验结果表明(图 1),当 KNO_3 浓度达 0~300 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,搭载舟形藻的生长速率随 KNO_3 浓度增加而提高;当浓度大于 300 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,随 KNO_3 浓度的增加生长速率下降。在 0~600 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内,随 KNO_3 浓度的提高,非搭载舟形藻生长速率随浓度的增加而提高;当 KNO_3 浓度大于 600 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,非搭载舟形藻的生长速率随浓度提高而降低。

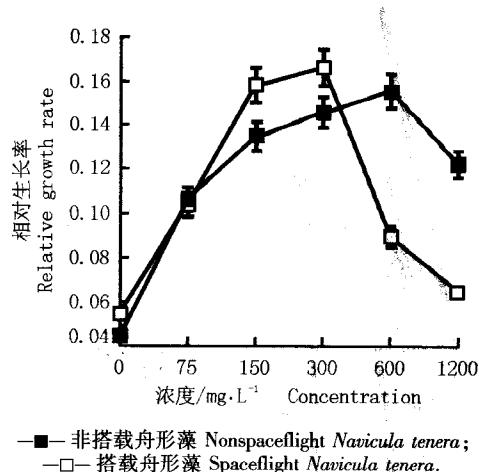


图 1 培养基中不同 KNO_3 浓度对舟形藻生长速率的影响
Fig. 1 Effect of different concentrations of KNO_3 in culture media on growth rate of *Navicula tenera*

磷在生物体内是合成 ATP、GTP、核酸和磷脂等成分的基本元素,是植物体内能量转换的重要介质元素,并参与植物体内碳水化合物的转化和运输^[8]。不同浓度 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 对舟形藻生长的影响见图 2,当 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 浓度为 30 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,非搭载舟形藻生长速率最高;当浓度大于 30 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,生长速率随浓度的增加而降低。 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 浓度在 0~60 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内,搭载舟形藻生长速率随着 Na_2HPO_4 浓度增加而提高,

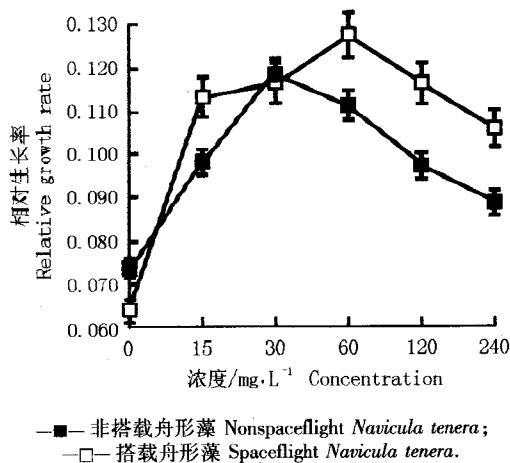


图2 培养基中不同 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 浓度对舟形藻生长速率的影响

Fig. 2 Effect of different concentrations of $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ in culture media on growth rate of *Navicula tenera*

超出这个浓度范围则抑制生长。

铁是藻类生长和氮固定最重要的痕量元素,在叶绿素的合成中也有很重要的作用^[9]。实验结果表明(图3),当 FeCl_3 浓度达 $0 \sim 24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,非搭载舟形藻的生长速率随 FeCl_3 浓度增加而提高;超出这个浓度范围生长速率随浓度的增加而下降。当 FeCl_3 浓度为 $0 \sim 12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,搭载舟形藻生长速率随浓度增加而提高,超出这个浓度范围时,搭载舟形藻的生长速率显著下降。

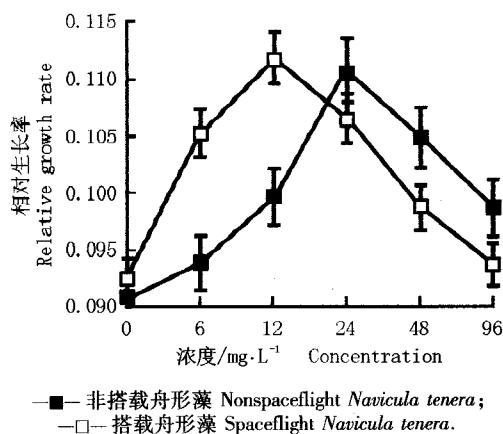


图3 培养基中不同 FeCl_3 浓度对舟形藻生长速率的影响
Fig. 3 Effect of different concentrations of FeCl_3 in culture media on growth rate of *Navicula tenera*

硅是硅藻细胞壁结构的主要成分,是硅藻生长的必需元素^[10]。前人的研究结果表明,硅藻对硅盐的需求量一般为 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,本实验中舟形藻对硅盐的需求量相对较多。由图4可以看出,当

$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 浓度小于 $800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,非搭载舟形藻生长速率随浓度增加而提高;但浓度高于 $800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对舟形藻的生长速率影响不显著。从培养成本角度考虑,对于非搭载舟形藻,培养基中 $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 浓度选用 $800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为宜。由图4还可以看出,当 $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 浓度为 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,搭载舟形藻生长速率最高,因而,对于搭载舟形藻,培养基中 $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 浓度达 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为宜。

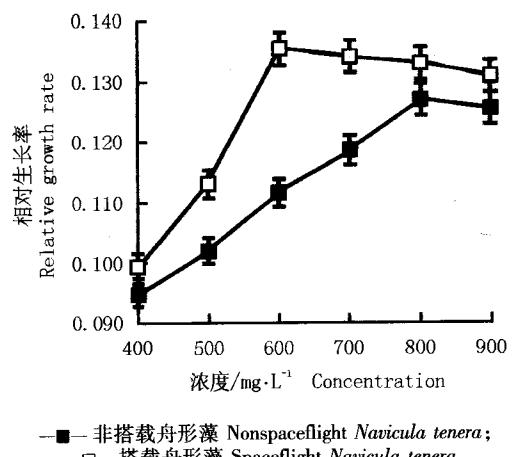


图4 培养基中不同 $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 浓度对舟形藻生长速率的影响

Fig. 4 Effect of different concentrations of $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ in culture media on growth rate of *Navicula tenera*

综合上述实验结果可看出,对于搭载舟形藻,相对生长率最高的营养盐最佳单因子组合为 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{KNO}_3$ 、 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{FeCl}_3$ 和 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$;对于非搭载舟形藻,相对生长率最高的营养盐最佳单因子组合为 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{KNO}_3$ 、 $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{FeCl}_3$ 和 $800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 。

2.2 4种营养盐对舟形藻生长速率影响的正交实验结果

不同的营养盐浓度组合对舟形藻生长的正交实验结果见表1。根据表1中的极差 R 值可以看出,4个因素对搭载舟形藻生长影响的主次顺序依次为 A、D、B、C,即:对于搭载舟形藻来说, KNO_3 浓度是主要影响因素,其余均为次要影响因素。取主要因素 KNO_3 的最好水平即第3水平,其余因素均取最好水平,得到搭载舟形藻培养基中最佳营养盐

组合为: $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{KNO}_3$ 、 $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{FeCl}_3$ 和 $700 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 。由表1还可以看出, 4个因素对非搭载舟形藻影响的主次顺序为A、B、D、C, 即: 对于非搭载舟形藻来说, 主要的影响因素也是 KNO_3 浓度。据此取各因素的最好水平, 得到非搭载舟形藻培养基中最佳营养盐组合为: $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{KNO}_3$ 、 $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{FeCl}_3$ 和 $700 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 。

表1 营养盐对搭载与非搭载舟形藻生长影响的正交实验设计与结果分析¹⁾

Table 1 Design and result of orthogonal experiment on effect of nutrients on growth of spaceflight and nonspaceflight *Navicula tenera*¹⁾

实验号 No.	因子与水平 Factor and level					相对生长速率 Relative growth rate	
	A	B	C	D	E	us	s
1	75	15	6	500	1	0.038	0.029
2	75	30	12	600	2	0.028	0.093
3	75	60	24	700	3	0.035	0.122
4	75	120	48	800	4	0.031	0.062
5	150	15	12	700	4	0.111	0.098
6	150	30	6	800	3	0.106	0.090
7	150	60	48	500	2	0.088	0.062
8	150	120	24	600	1	0.108	0.082
9	300	15	24	800	2	0.106	0.175
10	300	30	48	700	1	0.118	0.148
11	300	60	6	600	4	0.099	0.126
12	300	120	12	500	3	0.092	0.110
13	600	15	48	600	3	0.090	0.114
14	600	30	24	500	4	0.095	0.099
15	600	60	12	800	1	0.168	0.148
16	600	120	6	700	2	0.106	0.136
kus1	0.033	0.086	0.086	0.078			
kus2	0.103	0.087	0.100	0.081			
kus3	0.104	0.098	0.086	0.091			
kus4	0.115	0.060	0.082	0.103			
Rus	0.082	0.038	0.018	0.025			
ks1	0.082	0.104	0.100	0.080			
ks2	0.083	0.108	0.104	0.104			
ks3	0.140	0.115	0.120	0.126			
Ks4	0.124	0.083	0.097	0.119			
Rs	0.058	0.032	0.023	0.046			

¹⁾ A: KNO_3 浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) Concentration of KNO_3 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$);
 B: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) Concentration of $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); C: FeCl_3 浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) Concentration of FeCl_3 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); D: $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) Concentration of $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); E: 误差列 Error column; us: 非搭载舟形藻 Nonspaceflight *Navicula tenera*; s: 搭载舟形藻 Spaceflight *Navicula tenera*.

2.3 在优化培养基中舟形藻的生长状况

无论搭载还是非搭载舟形藻在优化的培养基中生长情况都非常良好, 没有延缓期, 接种后的第2天直接进入指数生长期(见图5和图6)。搭载与非搭载舟形藻在优化培养基中最大藻细胞密度分别达 5.215×10^9 和 $4.136 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 与此相比, 用F/2培养基对搭载与非搭载舟形藻进行培养, 藻细胞最大密度分别为 2.195×10^8 和 $1.884 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 说明对培养基进行优化后, 舟形藻生长密度有很大提高, 同时也表明正交实验的结果是可靠的。

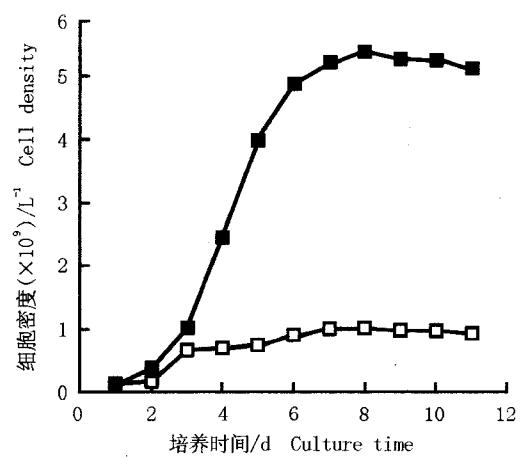


图5 搭载舟形藻在优化培养基与F/2基础培养基中的生长曲线
Fig. 5 Growth curves of spaceflight *Navicula tenera* in optimal medium and F/2 medium

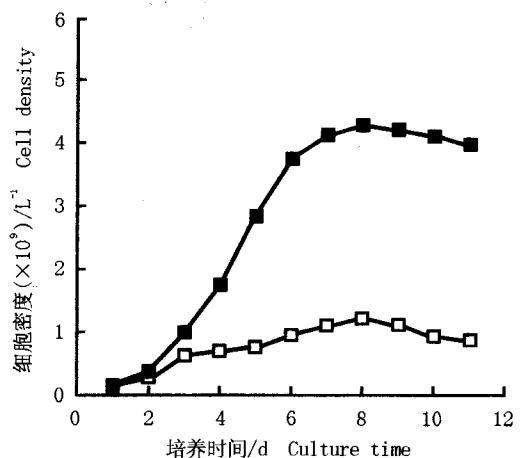


图6 非搭载舟形藻在优化培养基与F/2基础培养基中的生长曲线
Fig. 6 Growth curves of nonspaceflight *Navicula tenera* in optimal medium and F/2 medium

3 讨论和结论

微藻作为水产动物的活饵料, 广泛应用于水产养殖中。许多微藻中不但含有丰富的不饱和脂肪酸, 而且还含有许多其他生物活性物质, 如抗生素、微藻多糖、色素等, 已用于食品、化工和医药等行业, 为此需要通过改变培养条件来提高其生长密度以满足微藻的开发和利用。但目前实验室的培养多采用F/2培养基配方, 培养密度很低。作者通过改变F/2培养液中各种营养盐的浓度来优化舟形藻的培养条件, 使舟形藻的生长速率有较大幅度的提高。

采用优化的培养基对搭载与非搭载舟形藻进行培养, 能够明显提高生长密度、加快生长速率。单因子实验结果表明, 适合搭载舟形藻生长的最佳营养盐单因子浓度组合是 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KNO_3 、 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ FeCl_3 和 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$; 适合非搭载舟形藻生长的最佳营养盐单因子浓度组合为 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KNO_3 、 $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ FeCl_3 和 $800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 。而通过正交实验得出的适合搭载舟形藻生长的最佳营养盐组合为 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KNO_3 、 $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ FeCl_3 和 $700 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$; 适合非搭载舟形藻生长的最佳营养盐组合为 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KNO_3 、 $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ FeCl_3 和 $700 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 。由此可见, 正交实验得出的各因素的最佳水平与单因子实验得出的最佳水平相比略有差异。由于正交实

验结果考虑了各因子间的交互作用, 而单因子实验几乎忽略了因子间的交互作用, 因此, 正交实验结果是相对合理的。

参考文献:

- [1] 张义浩, 赵盛龙, 吴常文. 海洋生物——藻类[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2002.
- [2] Joseph A. Searching for medicine's sweet spot [J]. Science, 2001, 291: 2338–2343.
- [3] Lemaitre R N, King I B, Mozaffarian D, et al. n-3 polyunsaturated fatty acids, fatal ischemic heart disease, and nonfatal myocardial infarction in older adults: the cardiovascular health study [J]. Am J Clin Nutr, 2003, 77: 319–325.
- [4] 赵选民, 徐伟, 师义民, 等. 数理统计(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 354.
- [5] 王克明, 杨静, 庄树宏. 采用流加培养技术提高盐藻生物量的研究[J]. 海洋通报, 1999, 1(4): 64–69.
- [6] Fan C L, Glibert P M, Burkholder J M. Characterization of the affinity for nitrogen, uptake kinetics, and environmental relationships for *Prorocentrum minimum* in natural blooms and laboratory cultures [J]. Harmful Algae, 2003, 2(4): 283–299.
- [7] Lomas M W, Glibert P M. Comparisons of nitrate uptake storage and reduction of marine diatom and flagellates [J]. J Phycol, 2000, 36: 903–913.
- [8] 李合生. 现代植物生理学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002. 184–190.
- [9] Gerringsa L J A, de Baar H J W, Timmermans K R. A comparison of iron limitation of phytoplankton in natural oceanic waters and laboratory media conditioned with EDTA [J]. Marine Chemistry, 2000, 68: 335–346.
- [10] Werner D. Silicate metabolism[A]. Werner D. The Biology of Diatoms [M]. London: Black Well Scientific Publications, 1977. 110–149.