

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (10):1336–1342; 4 October 2015
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20150139

附着材料和盐度对静置培养条件下双眉藻生长和附着强度的影响

陈周, 刘志媛*, 彭宇飞, 王帅

海南大学海洋学院, 海南 海口 570228

摘要:【目的】对1株热带底栖硅藻——双眉藻(*Amphora* sp. HN08)的盐度和附着材料等培养条件进行优化。【方法】分析测定双眉藻在琼脂板、玻璃、PVC塑料板、塑料保鲜膜和尼龙网5种附着材料和6个盐度梯度(10‰–60‰)下处理9 d后的生物质产量、光合色素含量和细胞附着状态。【结果】双眉藻在玻璃板和PVC塑料板上的生物质产量最高, 细胞干重达到 3.64 g/m^2 ; 细胞在玻璃上的附着强度为III级, 容易刮取和采用离心法脱水。盐度对双眉藻生物质产量无显著影响, 但对其附着性和光合色素含量有显著影响。盐度为30‰和40‰的培养液中, 细胞的附着强度为IV级, 易于离心采收; 在50‰和60‰高盐度条件下的藻细胞多悬浮于培养基中, 离心法较难采收。盐度大于30‰培养条件下的双眉藻类胡萝卜素含量极显著高于低盐条件下(10‰和20‰), 50‰盐度条件下的Chl a和类胡萝卜素含量可达干细胞重的26.27%和11.11%。【结论】从采收性和生物质量两方面考虑, 双眉藻的最佳生长和采收培养条件为: 附着材料选用玻璃板, 盐度为30‰–40‰; 然而综合安全性和成本考虑, 建议将来生产上采用PVC塑料板作为附着材料。

关键词: 双眉藻, 附着强度, 盐度, 附着材料, 光合色素

中图分类号: X172 **文章编号:** 0001-6209(2015)10-1336-07

海洋底栖硅藻含有丰富的营养物质, 不但是鲍、海参和海胆等名贵水产动物苗种生产中的重要饵料, 还是海洋药物、功能性食品和精细化工产品的重要原料^[1]。此外, 油脂含量丰富的海洋底栖硅藻还是制备生物质燃料的理想原料^[2]。

底栖硅藻虽然具有较高的应用价值, 但由于它们不能像浮游藻类一样高效率地利用水体光照悬浮在水中培养, 因此较少进行大规模培养。目前, 在生产实践中, 底栖硅藻的培养仍普遍采用自然海区挂板附着或刮砂淘洗等传统的培养方法^[3], 在这种培养

条件下, 各种理化因子不稳定, 生物质产量较低, 质量也得不到保证, 无法满足生产上的需求^[4]。为了提高底栖硅藻的生物质产量, 满足生产需求, 底栖硅藻的室内培养研究也日渐受到重视^[1-2,5]。周银环、马美荣、钱振明等研究了室内条件下营养盐、盐度、温度、光照等环境因子对底栖硅藻双眉藻生长的影响^[6-9]。底栖硅藻贴壁生长, 易与水体分离, 可减少藻细胞的采收难度, 在采收的脱水环节比浮游藻类节省成本, 因而, 利用光生物反应器进行底栖硅藻的培养也是提高藻生物质产量、降低成本的有效途径

基金项目: 海南省国际科技合作专项(KJHZ2014-07); 国家自然科学基金(40966002); 海南大学研究生科技创新项目

* 通信作者。Tel: +86-89-866279184; E-mail: liuzhiyuan111@163.com

作者简介: 陈周(1989–), 男, 湖北监利人, 硕士研究生, 研究方向为微藻生物技术。E-mail: 403327205@qq.com

收稿日期: 2015-03-28; **修回日期:** 2015-05-28

之一。de Viçose 利用光生物反应器中培养的普氏藻 (*Proschkinia* sp.) 在对数生长期的细胞浓度达到 6.56×10^6 cells/mL 的高密度^[10]; Haifa Chtourou 分离培养的一株双眉藻生长量可达 2200 mg/L (DW) 且油脂最高含量可达 370 mg/g (DW)^[11]; De la Pena MR 在实验室内培养的双眉藻的浓度达到 1.33×10^6 cells/cm², 显著性大于在室外培养的藻细胞浓度 (1.0×10^6 cells/cm²)^[12]。

研究表明, 底栖硅藻在基质上的附着状态对藻细胞的生物质产量和采收性均有显著影响。张磊等研究表明, 凸形表面模型与平面模型上底栖藻类的附盖度显著高于凹形模型^[13]。邹宁等利用脱脂棉和海绵作为底栖硅藻的附着基质, 硅藻生长良好, 细胞载色体饱满, 但脱脂棉和海绵载体透光性差, 藻体被纤维包裹, 不利收集^[14]。

此外, 我们认为, 底栖硅藻培养所用附着材料必须有良好的透光性, 才能合理利用立体空间, 提高单位面积的培养密度。为此, 开展不同附着材料和环境条件对硅藻生长和附着状态影响的研究, 对于硅藻的产业化培养具有重要意义。

我们在海南海口近岸海域分离到一株油脂含量较高(30%左右)、可用于养殖污水净化处理^[15]的底栖硅藻——双眉藻 (*Amphora* sp. HN08), 具有研发潜力。为提高其生物质产量和采收性, 降低生产成本, 室内研究了日常生活中常见的玻璃、PVC 板、保鲜膜等透明附着材料和在 10‰ - 60‰ 盐度条件下对这株富油硅藻的生长、附着状态和采收性能的影响, 为该株硅藻进一步研发提供理论依据, 也为其他底栖硅藻的生产提供参考。

1 材料和方法

1.1 主要仪器与试剂

紫外分光光度计 (U-3900, Hitachi Spectrophotometer); 冷冻离心机 (3-30K, Sigma); 荧光显微镜 (DM 2500, Leica); 超低温冷冻干燥机 (Labconco); 分析天平 (MA200, 上海良平仪器仪表有限公司)。实验所用试剂均为分析纯。

1.2 藻种培养

双眉藻 (*Amphora* sp. HN08) 分离自海口市白沙门, 用加 Si 的 f/2 培养基^[16] 单藻种无菌静置培养。培养条件为 28 °C, 80 μmol/(m²·s), 光暗周期为

14 h:10 h。海水取自海口市白沙门, 经过滤后高压灭菌。

1.3 附着材料实验

取面积为 0.2 m × 0.3 m 的不同附着材料: 琼脂 (Biowest Regular Agarose G-10, Hong Kong) 板 (配制浓度为 3% 的琼脂培养基, 灭菌后均匀的倒在面积为 0.2 m × 0.3 m 的玻璃板上形成琼脂板)、玻璃、PVC 塑料板、PE 保鲜膜、高密度尼龙网, 用玻璃胶将实验附着材料与保鲜盒 (华隆塑料保鲜盒 AA-2) 底部紧密接触粘附, 防止双眉藻在保鲜盒底部附着。向放好附着材料的保鲜盒中加入 1000 mL 盐度为 32‰ 加 Si 的 f/2 培养基, 接入 10 mg (FW) 处于对数生长期的双眉藻, 静置培养, 培养条件为 (35 ± 1) °C, 80 μmol/(m²·s), pH8.2, 光暗周期为 14 h:10 h。每个处理设 3 个平行。

1.4 盐度梯度实验

在 500 mL 三角瓶中通过调节 NaCl 含量设置 6 个不同盐度梯度 (10‰ - 60‰) 的培养液, 每瓶中加入 4 mg (FW) 处于对数生长期的双眉藻细胞, 置于培养箱中静置培养, 培养条件同附着材料实验。每个梯度设 3 个平行。

1.5 采收

培养 9 d 后, 用毛刷刮取附着材料表面的硅藻于离心管中, 加入少量无菌水离心, 弃上清, 重复 2 次, 以除掉藻体表面的盐分。将离心采收的藻泥置于烘干至恒重的滤纸上称取鲜重 (FW), 超低温冷冻干燥至恒重, 称取藻粉干重 (DW)。

1.6 叶绿素的提取

90% 丙酮法提取, 按照下式计算提取液中叶绿素^[17] 和类胡萝卜素的浓度^[18]:

$$\text{Chla (mg/L)} = 11.64 \times D_{663} - 2.16 \times D_{645} + 0.1 \times D_{630}$$

$$\text{Chlc (mg/L)} = -5.53 \times D_{663} - 14.81 \times D_{645} + 54.22 \times D_{630}$$

$$\text{类胡萝卜素 (mg/L)} = (1000 \times D_{470} - 3.27 \times \text{Chla} - 104 \times \text{Chlb}) / 229$$

1.7 油脂积累观察

藻体经尼罗红染色后在荧光显微镜下观察油脂积累情况^[19]。

1.8 附着强度测定

根据藻细胞采收时毛刷刮取的力度和离心法脱水的难易程度, 将双眉藻在附着材料表面的附着强

度定义为 I - V 5 个等级。

I 级:藻细胞基本不在固体附着材料上附着,而是悬浮在培养液中下层;10000 × g 离心 10 min 才能使藻细胞与液体培养基分离,离心法采收难度非常大。

II 级:藻细胞贴在固体附着材料表面,用水轻轻冲洗即可使细胞从附着物上脱落,脱落后的藻体积聚形成雪花状漂浮在培养液中;6000 × g 离心 10 min 可使藻体与液体培养基分离脱水,离心法采收难度较大。

III 级:藻细胞紧贴附着材料表面,用水冲洗脱落后形成片状;4000 × g 离心 5 min 即可使固液分离,离心法采收较容易。

IV 级:藻细胞紧贴附着材料表面,用水轻轻冲洗不易脱落,需借软毛刷从附着基质上剥离藻体,脱落后的藻细胞在培养液中形成块状,静置几分钟后藻体即沉淀在容器底部;2000 × g 离 5 min 即可使固液分离,采收容易。

V 级:藻细胞与附着材料相互之间结合紧密,需借用硬毛刷才可刮取,脱落后的藻细胞积聚成团状沉淀在培养液底部;离心力小于 2000 × g 即可使固液分离。

1.9 数据处理和分析

对 3 次平行实验结果,用 DPS 数据处理系统进行单因素方差分析^[20],Duncan 新复极差法检验各处理间差异。图中或表中的同一栏内标有相同字母

的表示处理之间无显著差异 ($P < 0.01$)。

2 结果和分析

2.1 附着材料对双眉藻生长的影响

加入藻液 24 h 后,5 种附着材料表面均产生大量气泡,表明双眉藻已开始在附着材料上生长;培养第 4 天,附着材料上形成均匀的棕黄色藻落;随着培养时间的延长,附着的藻落颜色逐渐变深。

静置培养至第 9 天进行采收。双眉藻在不同附着材料上的脱离难度和离心脱水难易程度差异显著。双眉藻在 PVC 塑料板上附着最紧密,附着强度达到 V 级,硬毛刷难以刷下,但采用离心法脱水收集容易。双眉藻在保鲜膜和琼胶表面的附着强度为 II 级,用水轻轻冲洗即形成雪花状悬浮在培养液中,但离心法采收难度较大。双眉藻在尼龙网上的附着强度为 IV 级,适合采用离心法收集,但在用软毛刷刮取过程中,有少量藻细胞在网孔中,采收过程花费时间较长。双眉藻在玻璃表面的附着强度为 III 级,用水冲过后形成片状,在 4000 × g 离心 5 min 即可固液分离,采收容易。

如图 1 所示,不同附着材料对双眉藻的干物质产量有极显著差异 ($P < 0.01$) 双眉藻在玻璃板和塑料板组的干重达到 3.64 g/m²,显著高于琼脂组的 2.23 g/m²,是琼脂组的 1.63 倍。

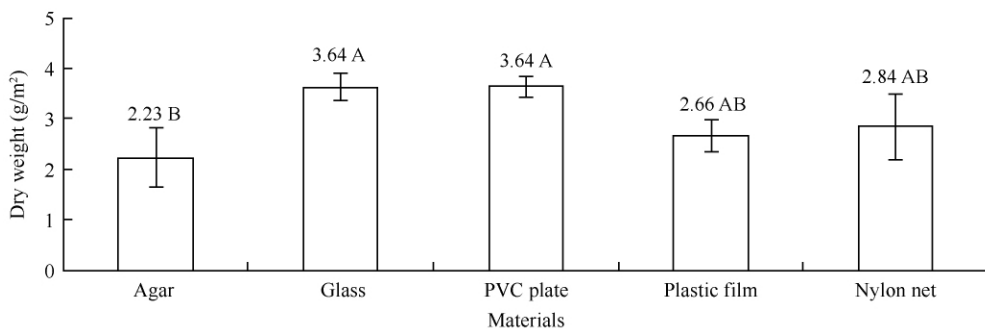


图 1. 5 种附着材料对双眉藻干重的影响

Figure 1. Dry weight of *Amphora* sp. HN08 cultured with 5 adhesive materials. Error bars represent standard error ($n = 3$). Means denoted by the same letter do not differ significantly ($P < 0.01$).

附着材料对双眉藻的油脂积累无显著影响。5 组材料培养的双眉藻在荧光显微镜下观察第 5 天均开始积累油脂。显微镜观察显示,随着培养时间的延长,藻细胞积油越来越明显,培养至第 8 天,油体占双眉藻体的 30% 左右。

2.2 盐度对双眉藻生长的影响

2.2.1 盐度对双眉藻生物量和采收的影响:图 2 显示,双眉藻在盐度为 10‰ - 60‰ 的培养液中均可以正常生长,盐度对双眉藻的生长无显著差异 ($P > 0.01$)。

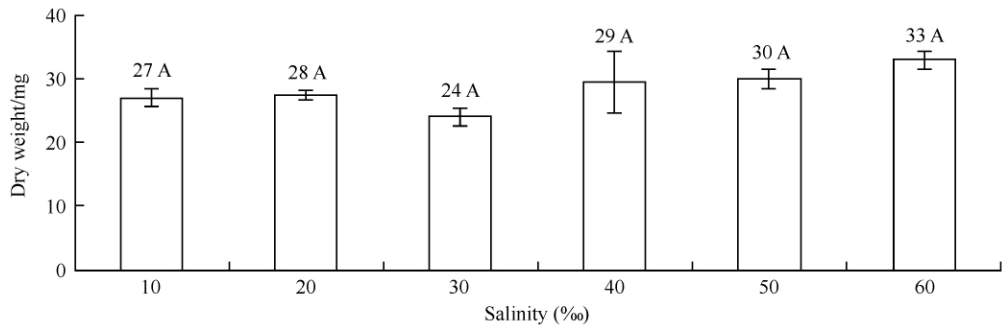


图 2. 6 个盐度培养条件下的双眉藻的鲜重

Figure 2. Fresh weight of *Amphora* sp. HN08 cultured under six salinity levels. Error bars represent standard error ($n = 3$). Means denoted by the same letter do not differ significantly ($P < 0.01$).

不同盐度条件下, 双眉藻在三角瓶底部的附着强度差异显著。盐度为 50‰ 和 60‰ 时附着强度最弱, 为 I 级, 轻轻晃动三角瓶即可明显看到藻悬浮在培养液中, 10000 × g 离心 10 min, 仍有少许藻体悬浮在液体中, 很难使藻体与培养液完全分离, 离心法采收难度大。盐度为 10‰ 和 20‰ 的附着强度为 II, 用水轻轻冲洗即可使藻细胞脱离三角瓶底, 6000 × g 离心 10 min 后藻体贴住离心管底部。盐度为 30‰ 和 40‰ 时的附着强度为 IV 级, 需用软毛刷将藻细胞从玻璃瓶底刮起收集, 静置 5 min 后, 藻体聚集在容器底部, 2000 × g 离心 5 min 即可使固液完全分离。

不同盐度生长下的双眉藻的油脂积累差异明显。盐度 30‰ 及以上盐度培养条件下的双眉藻油体占据整个藻体体积的 30% 以上; 10‰ 和 20‰ 盐度培养条件下藻细胞的油体则小于藻体的 20%。显微镜观察结果还显示, 高盐条件下的藻细胞变小,

在 50‰ 和 60‰ 高盐度培养下的双眉藻细胞大小为 7 - 8 μm, 明显小于其他盐度培养下的藻细胞 (10 μm)。

2.2.2 盐度对双眉藻光合色素含量的影响: 由表 1 可知, 在同等附着面积下, 盐度对双眉藻 Chl a 和类胡萝卜素的总产量产生极显著差异 ($P < 0.01$)。Chl a 和类胡萝卜素含量随盐度的升高而变大, 盐度 50‰ 条件下 Chl a 和类胡萝卜素值达到最大值 100.33 mg/m² 和 42.42 mg/m², 是盐度为 10‰ 培养条件下的 1.77 倍和 1.78 倍。

盐度也显著影响双眉藻细胞色素含量。在盐度 50‰ 时, 双眉藻 Chl a 和类胡萝卜素含量达到 26.27% 和 11.11%, 极显著高于 ($P < 0.01$) 低盐度 (10‰ 和 20‰) 培养条件下的 Chl a 和类胡萝卜素含量; 在 30‰ - 50‰ 的盐度范围内都有利于类胡萝卜素含量的积累。

表 1. 不同盐度条件下双眉藻光合色素含量

Table 1. Photosynthetic pigments content of *Amphora* sp. HN08 cultured under six salinity levels

Salinity / (‰)	Photosynthetic pigments production / (mg/m ²)			Photosynthetic pigments concentration / (%)		
	Chl a	Chl c	Carotenoid	Chl a	Chl c	Carotenoid
10	56.67 E	14.26 A	23.78 C	16.47 B	4.15 A	6.91 B
20	57.63 DE	16.85 A	23.95 C	16.44 B	4.81 A	6.82 B
30	71.51 CD	16.66 A	32.60 B	23.41 A	5.46 A	10.67 A
40	84.62 BC	18.11 A	36.66 AB	22.72 A	4.93 A	9.84 A
50	100.33 A	19.53 A	42.42 A	26.27 A	5.13 A	11.11 A
60	91.81 AB	14.64 A	38.17 AB	21.86 A	3.51 A	9.09 AB

Means followed by the same letter in a column are not very significantly different ($P < 0.01$).

3 讨论

底栖硅藻附着固相材料的过程包括到达固相表

面后的随机着陆、初始附着、滑行及永久附着 4 个步骤。硅藻的随机着陆和初始附着主要是受到藻体本身的重力所影响, 但海洋底栖硅藻的滑行和永久附着与固相表面粗糙度、微观拓扑结构以及润滑性等

相关^[21]。从实验结果可以看出,双眉藻在不同的附着材料上的附着程度不同。玻璃和 PVC 塑料板表面的附着量极显著高于琼胶($P < 0.01$),单位面积产量达到干重 3.64 g/m^2 ,可能是由于玻璃和 PVC 塑料板化学性质稳定,表面微观结构均匀,受环境因素变化较小,有助于双眉藻附着的原因。保鲜膜表面光滑,藻细胞初始附着后,藻细胞在材料表面易脱附,影响永久附着。琼胶是一类以半乳糖为主要成分的一种高分子多糖,具有较低的黏性,溶于水形成凝胶后,表面会有一定的孔径,藻细胞初始附着后,可能会阻碍藻细胞的滑动,从而导致生物质产量低,在采收过程中,琼胶易破碎且成本较高,不适合应用到生产中。尼龙网孔径密集,藻体聚集堵住网孔,采收时难以刮取。而附着于玻璃和塑料板上的藻体形成片状,容易采收,在较小的离心力条件下即与液相分离。以上分析可知,玻璃和塑料板是培养双眉藻较理想的材料,但玻璃质地沉重易碎,应用于规模培养时可能会有一定难度;双眉藻在 PVC 塑料板上附着强度大,在采收过程中会加大刮取难度,但 PVC 塑料板质量轻,价格低廉,透明度较高,在大规模培养中具有更大的优势。

光照、盐度和营养条件等是影响底栖硅藻生长的重要环境因素^[9]。马美荣在研究底栖硅藻 *Amphora coffeaeformis* 时指出高盐度限制条件下咖啡双眉藻生长受到严重抑制^[7],而 Clavero Ester 等对 34 株底栖硅藻的盐度实验后指出大部分培养的底栖硅藻种属表现出极度的广盐性,最适盐度在 30‰ 左右,2/3 的种类在 75‰ 的盐度下仍能正常生长^[22]。本实验结果显示,在盐度 10‰ - 60‰ 的培养液中双眉藻均可正常生长,表明该藻株为适应性强的广盐性底栖硅藻。

Hoagland、Gebeshuber 等指出硅藻胞外多聚物对硅藻的附着、在固相表面的滑行^[21]、藻生物膜的形成及其栖息地的稳定具有重要影响^[23]。钱振明通过盐度对 8 种底栖硅藻的生理生化影响研究指出在最适生长条件下,底栖硅藻胞外多糖的产量最高,过高或过低盐度都不利于胞内外总糖的积累^[9]。本实验中,在低盐(10‰、20‰)和高盐条件下(50‰、60‰),双眉藻悬在瓶底附着强度低,可能是因为双眉藻不处于生长最适盐度,胞外多糖的积累量低,影响到双眉藻的附着。

实验结果表明,高盐条件下有利于双眉藻 Chl a

和类胡萝卜素的积累(表 1)。类胡萝卜素作为抗氧化剂有缓解心血管病的药疗性能,还能够防止年龄相关性黄斑病(AMD),到 2018 年其全球市场销售总值将达到 3.09 亿美元^[24]。目前,粘红酵母和杜氏盐藻是工业上生产类胡萝卜素的主要原料,其最高含量分别为 3.5%^[25] 和 10%^[26]。本实验结果表明,在 50‰ 的高盐度培养条件下,双眉藻细胞内类胡萝卜素含量高达 11.11%。因此,本藻株除了具有生产生物柴油的潜力外,也可以用来生产类胡萝卜素。

实验结果显示,盐度对双眉藻的生物量的影响无极显著差异($P > 0.01$),但对双眉藻的附着强度有显著影响;在 30‰ - 60‰ 盐度培养下的双眉藻类胡萝卜素含量无极显著差异($P > 0.01$)。30‰ - 40‰ 盐度培养下的双眉藻附着强度大,适合采用离心法采收;50‰ - 60‰ 高盐环境下生长的双眉藻藻体悬浮于培养液中但易污染可采取其他采收方式。在后续生产中,可以根据采收方法选择并优化相应的双眉藻生长培养条件,提高双眉藻生长量和类胡萝卜素含量。

参考文献

- [1] Zhou YC, Hu CQ, Peng PF, Luo P, Zhang LP. The optimal culture of benthic diatom (*Amphora* sp.), a tropical sea cucumber (*Stichopus horrens*) bait. *Marine Sciences*, 2012, 36(10): 40-47. (in Chinese)
周一春, 胡超群, 彭鹏飞, 罗鹏, 张吕平. 一株底栖硅藻——双眉藻的优化培养. *海洋科学*, 2012, 36(10): 40-47.
- [2] Sanjay KR, Nagendra PMN, Anupama S, Yashaswi BR, Deepak B. Isolation of diatom *Navicula cryptocephala* and characterization of oil extracted for biodiesel production. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 2013, 7(1): 41-48.
- [3] Ma ZZ, Zhang JH. Studies on immobilization culture of a marine benthic diatom, *Navicula dissipata* hastelt. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1996, 3(2): 13-19. (in Chinese)
马志珍, 张继红. 海产底栖硅藻的固定化培养研究. *中国水产科学*, 1996, 3(2): 13-19.
- [4] Qu QM, Zou N. Research progress on suspension culture conditions and compositions of benthic diatoms. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2013, 41(33): 13090-13093. (in Chinese)
曲青梅, 邹宁. 底栖硅藻悬浮培养条件及活性物质研

- 究进展. 安徽农业科学, 2013, 41 (33): 13090-13093.
- [5] Lebeau T, Robert JM. Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part I: Cultivation at various scales. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 60 (6): 612-623.
- [6] Zhou YH. Effect of nitrogen, phosphorus, iron and silicon on growth of *Amprhora exigua*. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2008, 28 (1): 35-39. (in Chinese)
周银环. 氮、磷、铁、硅对简单双眉藻生长的影响. 广东海洋大学学报, 2008, 28 (1): 35-39.
- [7] Ma MR, Li PF, Chen L, Meng FF, Liu ZL. Effects of salinity and nutrient limitation on the growth and exopolysaccharide production of the benthic diatom *Amphora Coffeaeformis* in salt pan. *Journal of Salt and Chemical Industry*, 2008, 37 (5): 30-34. (in Chinese)
马美荣, 李朋富, 陈丽, 孟飞飞, 刘志礼. 盐度和营养限制对盐田底栖硅藻咖啡双眉藻生长及胞外多糖产率的影响. 盐业与化工, 2008, 37 (5): 30-34.
- [8] Qian ZM, Xing RL, Wu CX, Wang CH, Tang N. Effects of temperature on growth and physiological biochemical compositions of eight benthic diatoms. *Journal of Yantai University (Natural Science and Engineering Edition)*, 2009, 22 (1): 30-34. (in Chinese)
钱振明, 邢荣莲, 吴春雪, 王长海, 汤宁. 温度对 8 种底栖硅藻生长及其理化成分的影响. 烟台大学学报 (自然科学与工程版), 2009, 22 (1): 30-34.
- [9] Qian ZM, Xing RL, Tang N, Wang CH. Effects of light and salinity on growth and physiological biochemical compositions of eight benthic diatoms. *Journal of Yantai University (Natural Science and Engineering Edition)*, 2008, 21 (1): 46-52. (in Chinese)
钱振明, 邢荣莲, 汤宁, 王长海. 光照和盐度对 8 种底栖硅藻生长及其生理生化成分的影响. 烟台大学学报 (自然科学与工程版), 2008, 21 (1): 46-52.
- [10] de Viçose GC, Porta A, Viera MP, Fernández-Palacios H, Izquierdo MS. Effects of density on growth rates of four benthic diatoms and variations in biochemical composition associated with growth phase. *Journal of Applied Phycology*, 2012, 24 (6): 1427-1437.
- [11] Chtourou H, Dahmen I, Jebali A, Karray F, Hassairi I, Abdelkafi S, Ayadi H, Sayadi S, Dhoub A. Characterization of *Amphora* sp., a newly isolated diatom wild strain, potentially usable for biodiesel production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2015, 38 (7): 1381-12392.
- [12] De la Peña MR. Cell growth and nutritive value of the tropical benthic diatom, *Amphora* sp., at varying levels of nutrients and light intensity, and different culture locations. *Journal of Applied Phycology*, 2007, 19 (6): 647-655.
- [13] Zhang L, Hao ZL, Zhang XM. Preliminary study on attaching effect of benthic algae on different reef models. *South China Fisheries Science*, 2011, 7 (2): 1-7. (in Chinese)
张磊, 郝振林, 张秀梅. 不同模型礁底栖藻类附着效果的初步研究. 南方水产科学, 2011, 7 (2): 1-7.
- [14] Qiu FL. Micro-algal immobilization technology and application on marine benthic diatom. *Life Science Instruments*, 2007, 5 (5): 21-24. (in Chinese)
邱芳蕾. 微藻固定化技术及底栖硅藻固定化培养研究现状. 生命科学仪器, 2007, 5 (5): 21-24.
- [15] Zhang TY, Tang XP, Li HW, Chen ZH, Liu ZY. Efficiency of nitrogen and phosphorus removal from shrimp breeding wastewater by *Chlorella* sp. HNC11 and *Amphora* sp. HNY. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2013, 40 (18): 169-171. (in Chinese)
张桐雨, 唐选盼, 李洪武, 陈志辉, 刘志媛. 小球藻和双眉藻对虾塘养殖废水氮、磷的去除效果. 广东农业科学, 2013, 40 (18): 169-171.
- [16] Guillard RRL, Ryther JH. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*, 1962, 8 (2): 229-239.
- [17] Liu ZY, Wang GC. Dynamics of lipid accumulation in marine microalga *Chlorella vulgaris* promoted by iron. *Marine Sciences*, 2008, 32 (11): 56-59. (in Chinese)
刘志媛, 王广策. 铁促进海水小球藻油脂积累的动态过程. 海洋科学, 2008, 32 (11): 56-59.
- [18] Lichtenthaler HK. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 1987, 148: 350-382.
- [19] Liu ZY, Wang GC, Zhou BC. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 2008, 99 (11): 4717-4722.
- [20] Tang QY, Zhang CX. Data Processing System (DPS) software with experimental design, statistical analysis and data mining developed for use in entomological research. *Insect Science*, 2013, 20 (2): 254-260.
- [21] Gebeshuber IC, Thompson JB, Amo YD, Stachelberger H, Kindt JH. *In vivo* nanoscale atomic force microscopy investigation of diatom adhesion properties. *Materials*

- Science and Technology*, 2002, 18 (7) : 763-766.
- [22] Clavero E, Hernández-Maríné M, Grimalt JO, Garcia-Pichel F. Salinity tolerance of diatoms from thalassic hypersaline environments. *Journal of Phycology*, 2000, 36 (6) : 1021-1034.
- [23] Hoagland KD, Rosowski JR, Gretz MR, Roemer SC. Diatom extracellular polymeric substances: function, fine structure, chemistry, and physiology. *Journal of Phycology*, 1993, 29 (5) : 537-566.
- [24] Ahmed F, Fanning K, Netzel M, Turner W, Li Y, Schenka PM. Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters. *Food Chemistry*, 2014, 165 : 300-306.
- [25] Aksu Z, Eren TA. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochemistry*, 2005, 40 (9) : 2985-2991.
- [26] Xu CM, Li D, Wang YY, Wang CT, Sun BG, Wen YJ. Research development of food pigment biosynthesis. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2014, 14 (2) : 225-233. (in Chinese) 徐春明, 李丹, 王英英, 王成涛, 孙宝国, 文雁君. 食品色素的生物合成研究进展. *中国食品学报*, 2014, 14 (2) : 225-233.

Effects of salinity and adhesive materials on the growth and adhesion of *Amphora* sp. HN08 under static conditions

Zhou Chen, Zhiyuan Liu^{*}, Yufei Peng, Shuai Wang

College of Oceanology, Hainan University, Haikou 570228, Hainan Province, China

Abstract: [Objective] To optimize the cultural conditions including adhesive materials and salinity for one tropical benthic diatom (*Amphora* sp. HN08). [Methods] Two experiments were performed: (1) five adhesive materials including agar, glass, PVC plate, plastic film and nylon net were used to culture *Amphora* sp. HN08; (2) *Amphora* sp. HN08 was cultured under 6 salinity levels from 1 through 6‰. The algal cells were harvested after 9 days treatments, and the biomass productivity, adhesive strength and pigments content of cells were examined. [Results] For the adhesive materials experiment, cultures with glass and plastic plate showed the highest biomass production and the dry weight of cells reached to 3.64 g/m². The adhesion strength level of cells on the glass plate was III degree, which means the cells were easy to be separated from the glass and dewatered by centrifugation. Salinity did not contribute significantly to the biomass production, while it significantly influenced the cells adhesion and pigments concentration. The adhesive strength levels of the cells under 3‰ or 4‰ salinity was IV degree, which led to an easy harvest process. While the cells cultured under high salinity (5‰ and 6‰) usually suspended in the medium and were difficult to be dewatered by centrifugation. Both chlorophyll a and carotenoid content of cells cultured with higher salinity ($\geq 3\%$) are extremely higher ($p < 0.01$) than that with lower salinity (1‰ and 2‰). Chlorophyll a and carotenoid content of cells under 5‰ salinity was 26.27% and 11.11% by dry weight, respectively. [Conclusion] Taking the harvest and biomass production together, we think the optimal salinity for *Amphora* sp. HN08 was between 3‰ and 4‰, and the glass plate was suitable for adhesive material. However, considering the cost and safety, the PVC plate is suggested to be used for biomass production.

Keywords: *Amphora* sp., adhesion, salinity, materials, photosynthetic pigments

(本文责编:李磊)

Supported by the International Science and Technology Cooperation Program of Hainan Province (KJHZ2014-07), National Natural Science Foundation of China (40966002), and by Postgraduate Technological Innovation Project of Hainan University

^{*} Corresponding author. Tel: +86-89-866279184; E-mail: liuzhiyuan111@163.com

Received: 28 March 2015/Revised: 28 May 2015