高生物膜形成能力小球藻的分离鉴定及其生物絮凝与抗生素去除功能研究

陈志红[1,2]，范小萍[3]，郑金贵[1,2]，黄韬远[1]，郭志英[1*]

（1. 福建技术师范学院 食品与生物工程学院，福建 福州 350300；2. 福建技术师范学院 食品工业与发酵工业研究所，福建 福州 350300；3. 福州市连江生态环境局 福州市连江环境监测站，福建 福州 350500）

摘 要 本研究旨在筛选具有高生物膜形成能力的微藻，解析微藻胞外聚合物（Extracellular Polymeric Substances，EPS）组分与功能特性，并评估其在微藻絮凝及抗生素去除中的应用潜能。通过微藻的贴壁成膜特性筛选目标藻株并进行鉴定；对提取 EPS 的不同方法进行对比，采用傅里叶变换红外光谱（FTIR）表征 EPS 结构；通过絮凝实验验证 EPS 絮凝活性，利用抑菌圈法与高效液相色谱（HPLC）评估微藻抗生素的去除能力。本研究获得一株高成膜性（贴壁率高达 96.83%）微藻 FJPN1，经鉴定为 *Chlorella sorokiniana*。优选离子交换树脂法提取藻株 FJPN1 的 EPS（产率 295 mg/g），FTIR 分析揭示其含多糖-蛋白复合物及羟基、氨基等功能基团。功能研究结果显示：0.5 g/L EPS 可使普通小球藻絮凝率达 90.51%；藻株 FJPN1 对庆大霉素和卡那霉素（0.5 g/L）的去除率达到 100%，且在 50%（稀释 1 倍）抗生素生产废水中的去除率仍达到 100%，抗生素去除机制以 EPS 生物吸附为主。藻株 FJPN1 兼具异种微藻高效絮凝与氨基糖苷类抗生素特异性去除功能，为微藻采收及抗生素污染治理提供了新型功能性生物资源。

关键词 成膜微藻；胞外聚合物；微藻采收；抗生素生产废水；生物吸附

中图分类号 Q93－331 **文献标识码** A **文章编号** 1005－7021(2026)04－0054－10

doi：10.3969/j.issn.1005－7021.2026.04.005

Isolation and Identification of *Chlorella* with High Biofilm-forming Capability and Its Bioflocculation and Antibiotic Removal Functions

CHEN Zhi-hong[1,2], FAN Xiao-ping[3], ZHENG Jin-gui[1,2], HUANG Tao-yuan[1], GUO Zhi-ying[1*]

(1. *College of Food and Bioengineering, Fujian Polytechnic Normal University, Fuzhou* 350300; 2. *Institute of Food and Fermentation Industries, Fujian Polytechnic Normal University, Fuzhou* 350300; 3. *Fuzhou Municipal Lianjiang EcologicalEnvironment Bureau, Fuzhou Municipal Lianjiang Environmental Monitoring Station, Fuzhou* 350500)

Abstract This study aimed to achieve three primary objectives: (1) to isolate high-performance biofilm-forming microalgal strains through systematic phenotypic screening; (2) to characterize the structural and functional properties of their extracellular polymeric substances (EPS) using integrated spectroscopic techniques; and (3) to demonstrate the practical applications of these biopolymers in microalgal biomass harvesting and antibiotic removal. The experimental approach integrated microbial isolation methods with advanced material characterization and environmental biotechnology strategies. A high-performance biofilm-forming algal strain was isolated based on its wall-adhesion capacity and taxonomically identified. Various EPS extraction protocols were systematically evaluated to determine the most effective method, and structural analysis was conducted using Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR). The functional properties of the extracted EPS were assessed through flocculation assays, antibacterial zone tests, and high-performance liquid chromatography (HPLC). Results showed that the isolated strain FJPN1, identified as *Chlorella sorokiniana*, exhibited

基金项目：国家自然科学基金青年科学基金项目（32503215）；福建省自然科学基金项目（2023J05209）

作者简介：陈志红 女，讲师，博士。研究方向为应用微生物。E-mail：chenzhh@fpnu.edu.cn

* 通讯作者。女，副教授，博士，硕士生导师。研究方向为农业微生物。E-mail：guozy@fpnu.edu.cn

收稿日期：2025-12-01

exceptional biofilm-forming capability with a wall-adhesion rate of 96.8%. The ion-exchange resin method yielded the highest EPS quantity (295 mg/g), and FTIR analysis revealed the presence of characteristic functional groups in the polysaccharide-protein complexes, including hydroxyl, amino, and glycosidic bonds. Functional studies demonstrated that EPS at a concentration of 0.5 g/L induced a flocculation efficiency of 90.5% in *Chlorella vulgaris* FACHB-8. Notably, FJPN1 achieved complete removal (100%) of gentamicin and kanamycin at a concentration of 0.5 g/L and retained full removal efficiency in 50% diluted industrial wastewater. Mechanistic analysis confirmed that biosorption mediated by EPS was the dominant removal mechanism. The dual functionality of *C. sorokiniana* FJPN1, enabling efficient heterospecific microalgal flocculation and selective removal of aminoglycoside antibiotics, highlights its potential as a novel functional bioresource for microalgal biomass harvesting and antibiotic pollution removal.

Keywords biofilm-forming microalgae; extracellular polymeric substances (EPS); microalgal harvesting; antibiotic production wastewater; biosorption

微藻胞外聚合物(Extracellular Polymeric Substances,EPS)是由多糖、蛋白质、核酸及脂类等生物大分子构成的复杂混合物,广泛分布于微藻细胞表面及其生物膜基质中[1]。近年来,EPS 因其独特的理化性质在生物技术及环境工程领域展现出重要的应用价值。EPS 可通过电荷中和、桥联等作用促进微藻细胞絮凝沉降[2],显著降低了传统离心或过滤法采收生物质的能耗成本,为解决微藻规模化培养采收效率低的核心问题提供了新思路。此外,EPS 富含羧基、氨基及磷酸基等功能基团,对重金属离子、抗生素及有机污染物具有高效吸附能力。荧光猝灭滴定实验结果表明,莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)EPS 对铅和铜具有强大的络合能力,最大吸附量可达 230 mg/g[3];四尾栅藻(*Scenedesmus guadricauda*)和瑞典四片藻(*Tetraselmis suecica*)对四环素的最大吸附量分别达到 295.34 mg/g 和 56.25 mg/g[4]。然而,普通浮游态微藻 EPS 的分泌水平普遍较低,通常不足微藻细胞干重的 10%[5],且通过常规提取方法获得的 EPS 产率有限,制约了 EPS 的规模化应用。随着对微藻生物膜形成机制的深入研究,发现成膜微藻克服了浮游微藻 EPS 分泌不足的瓶颈,展现出了独特优势。成膜微藻通过分泌大量结构稳定的 EPS,形成三维网状基质包裹微藻细胞群,使微藻细胞牢固附着于固液界面并耐受环境胁迫[6-7]。成膜微藻的 EPS 产量一般可达微藻细胞干重的 20% ~40%[8]。高通量测序分析表明,成膜微藻 EPS 中富含糖醛酸、乙酰化多糖及疏水蛋白组分,其电荷密度与表面疏水性显著高于浮游微藻[9-10]。这种富含带电基团与疏水组分的高浓度复合结构在环境修复与生物资源回收领域具有显著优势,不仅可为 EPS 介导的微藻细胞絮凝提供关键驱动力,也可通过羟基、氨基等官能团增强对抗生素、重金属等污染物的特异性吸附[11-12]。因此,筛选高成膜藻株是优化 EPS 产量与功能协同性的关键因素。基于上述背景,本研究旨在筛选具有高成膜性能的微藻藻株,解析其 EPS 的组分特性,并分别评价其在微藻生物质采收及氨基糖苷类抗生素污染治理中的应用潜力。微藻生物质采收是微藻技术产业化面临的关键挑战之一,其采收成本占总生产能耗的 20% ~30%,严重制约了 EPS 的规模化应用[13-14]。而氨基糖苷类抗生素(如庆大霉素和卡那霉素)因其高水溶性与难降解性[15],在养殖废水中检出浓度可达数百 μg/L,在特定情况下甚至超过 1 mg/L[16-19]。这类污染物不仅通过基因水平转移诱导多重耐药性扩散,还会干扰水生生物的氧化应激系统,造成生态链毒性累积。本研究以福建某富营养化塘坝砾石附着的生物膜为分离源,筛选获得 1 株成膜性能突出的藻株 *Chlorella sorokiniana* FJPN1,并系统研究其异种微藻絮凝效能与氨基糖苷类抗生素去除能力,以期为微藻低成本采收技术及抗生素污染治理提供新型生物材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 普通小球藻(*Chlorella vulgaris* FACHB-8)购自中国科学院淡水藻种库。用于抗菌活性测定的大肠埃希菌(*Escherichia coli* ATCC 25922)由广东省微生物菌种保藏中心提供。

1.1.2 培养基 ①BG11 培养基(mg/L)[20]:$NaNO_3$ 1 500,K_2HPO_4 40,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 75,

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 36, $NaCO_3$ 20, Na_2-EDTA 1, 柠檬酸铁铵 6, 柠檬酸 6, 1 mL A5 原液（H_3BO_3 2.86 g/L, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 1.86 g/L, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.22 g/L, $Na_2MoO_3 \cdot 2H_2O$ 0.39 g/L, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.08 g/L, $Co(NO_3)_2$ 0.049 g/L）。②LB 培养基（g/L）：胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10, pH 值 7.4。

1.1.3 主要试剂与仪器设备 CytoTox 96®非放射性细胞毒性检测试剂盒（G1780, 美国 Promega 公司）；庆大霉素、卡那霉素、链霉素、氨苄青霉素（纯度 >98%, 上海源叶生物科技有限公司）；可溶性两性霉素 B（纯度 >90%, 北京索莱宝科技有限公司）；氨基糖苷类抗生素生产废水（福建福抗药业股份有限公司）。光照培养箱（ZQZY-AGF8V, 上海知楚仪器有限公司）；高速冷冻离心机（CT 14 RD, 上海天美科学仪器有限公司）；电热恒温干燥箱（DKG-9070A, 上海精宏实验设备有限公司）；紫外可见分光光度计（UV-1800, 日本岛津公司）；正置光学显微镜（BX51, 日本奥林巴斯公司）；高效液相色谱仪（Waters, USA）；扫描电子显微镜（SEM）（Hitachi Reguius 8100, 日本日立高新技术公司）；Nicolet 5700 傅里叶变换红外光谱仪（Thermo Fisher Scientific, USA）。

1.2 方法

1.2.1 成膜微藻的筛选 ①采样与藻株分离：于福建省福州市连江县潘渡乡某富营养化塘坝（26.17°N, 119.22°E）砾石滩区（水深 0.3 ~ 0.5 m）采集 5 块生物膜样品。使用无菌陶瓷刮刀刮取生物膜于含 10 μg/mL 两性霉素 B 的 50 mL 无菌 BG11 培养基中，制备成生物膜混合液，密封后低温运输至实验室。样品处理在超净工作台内完成，混合液经涡旋振荡后静置，取上清液用无菌 PBS 缓冲液进行梯度稀释（10^{-1} ~ 10^{-6}），涂布于添加 50 μg/mL 氨苄青霉素的 BG11 琼脂平板。25 ℃、弱光（25 μmol/(m^2 · s)）培养 7 d 后挑取独立藻落进行三区划线纯化，连续传代 3 次。最终将获得的纯藻株经镜检和 18S rRNA 基因测序确认无微生物污染后保存备用。②初筛：将藻株接种于 T25 培养瓶（BG11 培养基初始 OD_{680} = 0.1），25 ℃、50 μmol/(m^2 · s)光照条件下培养 12 d。目视观察筛选出在瓶壁上形成连续绿色生物膜（覆盖率≥50%）的藻株。③复筛：对初筛获得的藻株进行贴壁率计算。将藻株接种于 T300 方形培养瓶（表面积 280 cm^2, 培养基为 BG11, 初始 OD_{680} =0.3），培养 12 d 后 8 000 × g 离心 10 min 和真空抽滤（0.45 μm 滤膜）获得在培养瓶壁上的成膜生物量（B_i）与游离生物量（B_t），60 ℃烘干后称重，计算贴壁率。

$$贴壁率(\%) = \frac{B_i}{B_i + B_t} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.2 成膜微藻的鉴定 ①分子鉴定：采用十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）法[21]提取成膜微藻基因组 DNA：取对数生长期藻细胞，经液氮研磨破碎，加入预热至 65 ℃的 CTAB 提取缓冲液（含 2% CTAB、100 mmol/L Tris-HCl（pH 8.0）、20 mmol/L EDTA、1.4 mol/L NaCl 和 0.2% β-巯基乙醇）混匀，65 ℃水浴 40 min。向水浴后的反应液中加入等体积氯仿-异戊醇（24:1, 体积比）抽提去除蛋白杂质，4 ℃、12 000 × g 离心 10 min 后取上清液，加入 0.8 倍体积异丙醇沉淀 DNA。沉淀经 70% 乙醇洗涤后溶解于含 RNase A（50 μg/mL）的 TE 缓冲液（pH 8.0），NanoDrop 测定 A_{260}/A_{280} 纯度值（1.8 ~ 2.0）后 −20 ℃保存。后续采用通用引物 18sF（CCTGGTTGATCCTGCCAG）/18sR（TTGATCCTTCTGCAGGTTCA）[22]扩增 18S rRNA 基因片段（1 689 bp, 退火温度 55 ℃）。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳验证后送至北京擎科生物科技股份有限公司测序。所得序列通过 NCBI BLAST 进行同源性分析，采用邻接法（Neighbor-joining method）在 MEGA 11 软件中（Bootstrap 重复抽样 = 1 000 次）构建系统发育树。②扫描电子显微镜观察：微藻细胞经 2.5% 戊二醛溶液 4 ℃固定过夜后，用磷酸缓冲液漂洗，经 1% 锇酸溶液进行后固定。随后依次经梯度乙醇脱水、醋酸异戊酯置换，并进行临界点干燥和镀膜。将制备好的样品于 SEM 下观察。

1.2.3 微藻的胞外聚合物（EPS）提取与表征 ①提取方法优化：采用五种方法平行提取胞外聚合物（EPS）。包括离心法（8 000 × g 离心 20 min）、EDTA 法（2%（质量浓度）EDTA, 4 ℃冰箱放置 3 h）、加热法（60 ℃水浴 1 h）、CER 法（阳离子交换树脂法，按 Dowex ®树脂与藻体干重以 4:1 的质量比混合，避光振荡 3 h 后，8 000 × g 离心 20 min）以及 NaOH 法（0.5 mol/L NaOH 溶液，25

℃振荡 4 h,10 000 × g 离心 15 min)。提取液经 3.5 kDa 透析袋纯化后冻干称重。以单纯离心组(细胞未经过提取剂处理)作为对照,通过乳酸脱氢酶(LDH)活性评估细胞膜完整性。提取 EPS 后的 FJPN1 藻体经 PBS 缓冲液重悬,按照 CytoTox 96 ®试剂盒说明书测定 490 nm 处吸光值,并基于标准曲线换算酶活单位,以单纯离心对照组的 LDH 活性定义为 100%,将各提取方法处理组的 LDH 活性值转换为相对于该对照的百分比(%)。最终以 EPS 得率(mg/g)与 LDH 活性(%)两项指标综合评价并优选提取方法。②红外光谱分析:将冷冻干燥的 EPS 样品经 KBr 压片后,使用 Nicolet 5700 傅里叶变换红外光谱仪(4 cm^{-1} 分辨率,扫描范围 400 ~4 000 cm^{-1})进行结构表征。

1.2.4 *絮凝活性评估* 经冻干处理的 FJPN1 胞外聚合物(CER 法提取)精密称量后,直接加入对数生长期普通小球藻 FACHB-8 悬浮液(OD_{680} = 1.0),使体系终浓度梯度分别为 0.1、0.3、0.5、0.8、1.2、1.5、2.0、2.5 g/L。混合物经涡旋振荡混匀后于 25 ℃静置 24 h 进行絮凝反应。絮凝效率通过紫外可见分光光度计测定液面下 2 cm 处的 OD_{680}值,初始空白对照为未添加 EPS 的藻液。絮凝率计算公式:

$$\text{絮凝率}(\%) = \frac{OD_{\text{control}} - OD_{\text{sample}}}{OD_{680}} \times 100\% \quad (2)$$

式中,OD_{control}表示静置 0 h 时的 OD_{680}值,OD_{sample}表示静置 24 h 时的 OD_{680}值。显微观察前取 50 μL 混合液直接滴加至载玻片,采用光学显微镜(40 × 物镜,NA = 0.65)明场模式下观察记录细胞聚集形态,每组样本随机选取 5 个视野进行图像采集。

1.2.5 *抗生素去除效能测试* ①不同氨基糖苷类抗生素去除实验:将 FJPN1 单藻落接种于 50 mL 灭菌的 BG11 培养基中,25 ℃、光照强度 50 μmol/(m^2 · s)、150 r/min 条件下预培养至对数期。离心收集藻体,用新鲜 BG11 培养基重悬,将种子液 OD_{680}调节至 0.5 ± 0.1,随后以 15% 的接种量(体积分数)接种于 500 mL 新鲜 BG11 培养基中进行扩大培养。培养至稳定期(12 d)后再次离心获得藻体,用磷酸盐缓冲液配制成浓度梯度 0.5 ~3.5 g/L 的藻悬液。分别向各浓度藻悬液中加入经 0.22 μm 滤膜除菌的庆大霉素、卡那霉素、链霉素母液(初始浓度 100 g/L),调节抗生素终浓度至 0.5 g/L。将混合体系置于 25 ℃环境中静置 48 h,每 4 h 手动振荡混匀,离心收集上清液用于抑菌实验。采用牛津杯扩散法检测抗菌活性:高温灭菌后的 LB 固体琼脂降至 50 ℃左右加入 1% 对数期大肠埃希菌(*E. coli*)菌液(OD_{600} = 0.6),混匀后倒平板;凝固后放置牛津杯,每杯加入 200 μL 上清液;37 ℃培养 16 h 后测量抑菌圈直径,按下式计算抗生素去除率。

$$\text{抗生素去除率}(\%) = \frac{d_0 - d_s}{d_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中,d_0 为未处理抗生素溶液(对照)的抑菌圈直径;d_s 为经成膜小球藻 FJPN1 处理后的抗生素溶液在含有大肠埃希菌的平板中形成的抑菌圈直径。②对实际生产废水中抗生素残留的去除研究:实际生产废水离心后去除固体杂质,用去离子水稀释配制成 25%(*V* 废水:*V* 去离子水 = 1:3),50%(*V* 废水:*V* 去离子水 = 1:1),75%(*V* 废水:*V* 去离子水 = 3:1)和 100%(未稀释)四种浓度,并调整不同浓度废水中抗生素浓度为 0.5 g/L。取 FJPN1 藻体加入废水至终浓度为 3.5 g/L。室温放置 48 h,每 4 h 摇晃 1 次。离心取上清进行抑菌实验并按照公式(3)计算抗生素去除率。

1.2.6 *FJPN1 去除抗生素机制初步探索* 配制 100 mL BG11 培养基,灭菌后添加卡那霉素母液至终浓度为 0.5 g/L。接入 FJPN1 细胞,于室温下放置至卡那霉素完全从溶液中去除。离心收集 FJPN1 藻体,采用本研究建立的 CER 法提取 EPS。随后,用 BG11 培养基将获得的 EPS 溶液定容至 100 mL 作为待测样品。该实验独立重复 8 次,每次重复均进行抑菌实验和 HPLC 分析。HPLC 分析条件参照文献[23]:待测样品经 0.22 μm 滤膜过滤后,使用 Waters 高效液相色谱仪联用蒸发光散射检测器(ELSD)进行检测。色谱柱为 Welch Ultimate HILIC Amide(4.6 mm × 150 mm,5 μm),柱温 30 ℃;流动相为 *V* 含三氟乙酸的甲醇(0.2 mol/L):*V* 水溶液 = 95:5,等梯度洗脱,流速 1 mL/min;进样量 10 μL,单次运行时间 7 min。ELSD 参数设定为载气(氮气)压力 0.35 MPa,雾化温度 45 ℃。

1.2.7 *数据分析* 采用 Origin 2021 软件对实验数据分析作图。若无特殊说明,各组实验均设 3

次重复,结果用算术平均值 ± 标准偏差(Mean ± SD)表示。$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 成膜微藻 FJPN1 的分离鉴定

通过贴壁成膜特性筛选获得 7 株微藻。其中藻株 M3(后命名为 FJPN1)在 T300 细胞培养瓶中培养 12 d 后,瓶壁上形成厚度约为 0.5 mm 的致密绿色生物膜,且对应的培养液较为澄清(图 1A)。显微观察显示,生物膜内藻细胞密集堆积(图 1Aa),而培养液中游离的藻细胞数量极少,且多以大型聚集体形式存在(图 1Ab)。此外,藻株 FJPN1 的贴壁率达到(96.83 ± 1.47)%,显著高于其他藻株($P<0.01$)(图 1B)。上述结果表明,藻株 FJPN1 具有优异的成膜能力,其可通过藻细胞密集堆积形成稳定的生物膜结构,并伴随明显的细胞自发聚集效应。鉴于 EPS 在细胞黏附、生物膜基质构建以及细胞聚集体稳定性中的关键作用,该结果提示 FJPN1 可能是一株高产 EPS 的功能性藻株。

通过 SEM 观察可见,FJPN1 细胞因失水而发生皱缩,但整体球形结构保持不变,直径为 2 ~ 4 μm(图 1C)。为明确其分类地位,采用 CTAB 法提取其基因组 DNA,使用通用引物扩增 18S rRNA 基因序列,获得长度约为 1 700 bp 的清晰条带(图 1D)。通过 NCBI BLAST 比对,该序列与 *Chlorella sorokiniana* N0N001(登录号 MF101221.1)相似性达 99.80%。基于 MEGA 11 构建的邻接法系统发育树(Bootstrap = 1 000)显示,FJPN1 与 *Chlorella sorokiniana* 聚为一支(Bootstrap 支持率为 99%)(图 1E)。结合形态学特征与分子证据,最终将藻株 FJPN1 鉴定为 *Chlorella sorokiniana*。

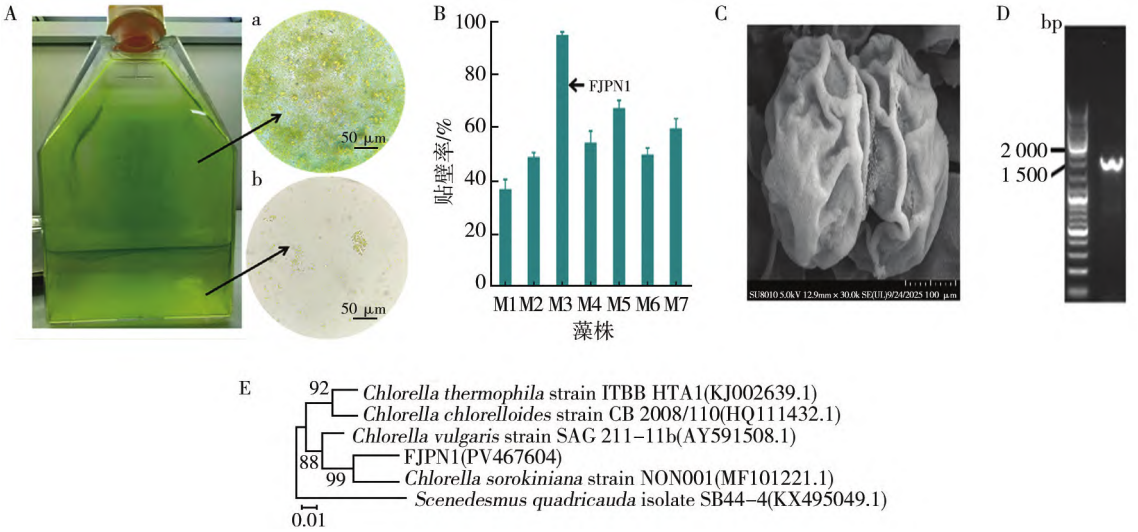


图 1 成膜微藻 FJPN1 的成膜特性及鉴定

Fig. 1 Characterization and identification of biofilm-forming microalga FJPN1

A:FJPN1 成膜;B:FJPN1 高贴壁率;C:FJPN1 的扫描电镜图;D:FJPN1 的 18S rRNA 基因片段电泳图;E:邻接法系统发育树,括号内为菌株 18S rRNA 基因序列的 GenBank 登录号,分支节点数字为 Bootstrap 值,标尺的数据为进化距离

A: Biofilm formation of strain FJPN1; B: High wall-adhesion rate; C: Scanning electron micrograph of FJPN1; D: 18S rRNA gene electrophoresis; E: Phylogenetic analysis of 18S rRNA sequences (Neighbor-joining method), GenBank accession numbers in parentheses, Bootstrap values (1 000 replicates) at nodes, scale bar indicates evolutionary distance

2.2 胞外聚合物的提取及表征

系统比较五种 EPS 提取方法(图 2A),结果显示,虽然 NaOH 法提取率最高((321.72 ± 2.51) mg/g),但该方法可引发严重的细胞损伤。其 LDH 活性与离心法(空白对照,100%)相比,仅为(38.43 ± 3.12)%。CER 法 EPS 提取率位列第二((296.50 ± 4.14) mg/g),EPS 约占细胞干重的 30%。虽然 CER 法 EPS 提取率低于 NaOH 提取法($P<0.05$),但通过 CER 法提取后的 FJPN1 细胞的 LDH 活性为(98.52 ± 0.07)%,表明细胞膜完整性未受明显影响。该结果表明采用 CER 法提取 3 h 可在最大限度保持细胞膜完整性的前提下,获得较高的 EPS,从而有效避免因细胞损伤导致的内容物污染。

通过傅里叶变换红外光谱(FTIR)分析了CER法提取获得的EPS组成结构(图2B)。EPS在3 420.71 cm^{-1}处显示O-H/N-H伸缩振动宽峰,在2 925.32 cm^{-1}和1 396.80 cm^{-1}处显示C-H的不对称与对称伸缩振动。此外,1 632.51 cm^{-1}处的酰胺I带及1 160.21 cm^{-1}处的C-O-C糖苷键提示其含典型多糖-蛋白复合物,而1 074.81 cm^{-1}处的强吸收峰提示多糖含吡喃环结构。综合上述红外光谱特征,推测EPS中富含羟基、氨基、糖苷键及吡喃环等功能基团。这些结构特征可能为藻细胞黏附形成生物膜提供分子基础,同时其多糖-蛋白复合物形成的三维网络结构可能通过疏水相互作用及氢键介导异种微藻的絮凝聚集,并为污染物吸附提供潜在活性位点。

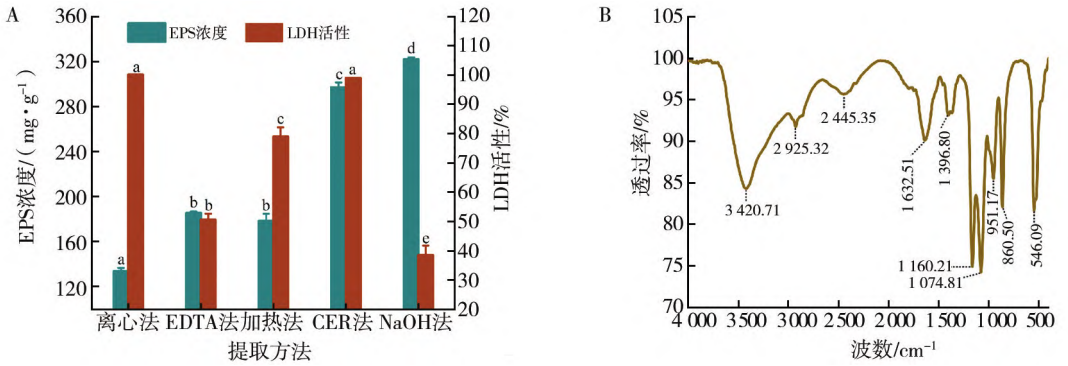


图2　成膜微藻FJPN1胞外聚合物的提取及表征

Fig. 2　Extraction and characterization of extracellular polymeric substances (EPS) from microalga FJPN1

A:不同方法对胞外聚合物提取率和细胞活性的影响;B:FJPN1胞外聚合物的红外光谱分析

A: Effects of extraction methods on EPS yield and cell viability; B: FTIR analysis of the extracted FJPN1

2.3　成膜微藻FJPN1的应用

2.3.1　胞外聚合物诱导异种微藻絮凝活性分析

将提取的FJPN1胞外聚合物冻干粉加入培养至对数期的非絮凝微藻普通小球藻FACHB-8中,25 ℃静置24 h后评估絮凝效应。如图3A所示,空白对照组(0 g/L EPS)藻细胞基本维持稳定悬浮状态,而添加0.5 g/L EPS的实验组出现显著絮凝沉淀,离心管上部藻液澄清,底部形成藻泥。显微观察发现,对照组FACHB-8细胞(未添加EPS)呈均匀单细胞分布,而EPS处理组中,绝大多数细胞桥接形成聚集体(图3B)。该结果表明,从FJPN1中提取的EPS具有诱导异种微藻絮凝的功能。进一步研究不同浓度EPS对絮凝率的影响,结果显示EPS浓度显著影响藻细胞絮凝效率。随着EPS浓度从0.1 g/L增至0.5 g/L,絮凝率由(34.32 ± 1.28)%快速提升至(90.51 ± 1.28)%;当EPS浓度增至1.2 g/L时,絮凝率呈缓慢增长趋势,达到(98.16 ± 0.13)%后趋于稳定(图3C)。研究结果表明,0.5 g/L EPS可实现藻细胞高效絮凝(> 90%),且絮凝效能存在浓度饱和阈值(>1.2 g/L时变化不显著),说明EPS具有浓度依赖性特征。

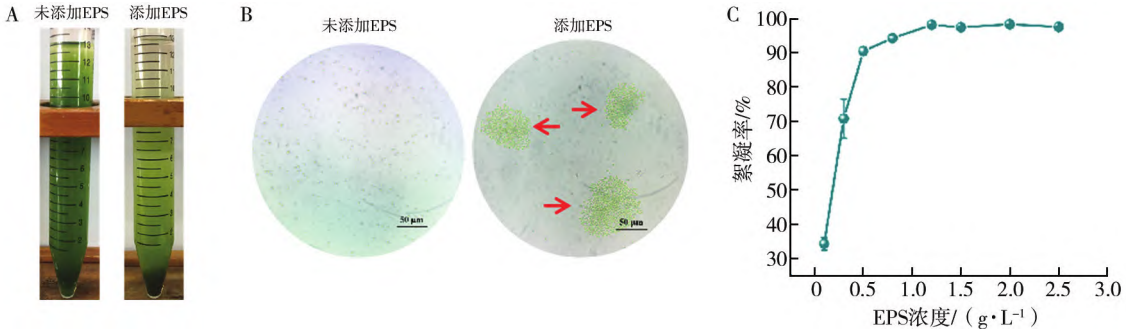


图3　成膜微藻FJPN1胞外聚合物的絮凝活性分析

Fig. 3　Flocculation activity of extracellular polymeric substances (EPS) from FJPN1

A:EPS(0.5 g/L)诱导的FACHB-8絮凝沉淀;B:FACHB-8细胞聚集体显微观察;C:EPS浓度对絮凝效率的影响

A: EPS(0.5 g/L)-induced flocculation of FACHB-8; B: Microscopic observation of cell aggregates; C: Effect of EPS concentrations on flocculation efficiency

2.3.2 成膜微藻 FJPN1 去除抗生素能力评估

如图 4A 和 4B 所示，FJPN1 对庆大霉素和卡那霉素具有显著的去除效果。当 FJPN1 浓度为 0 g/L 时，庆大霉素和卡那霉素对大肠埃希菌的抑菌圈直径可达 16 mm 左右。当 FJPN1 浓度增加至 0.5 g/L时，其对庆大霉素和卡那霉素的去除率较弱，均低于 10%，而当 FJPN1 浓度上升至 3.0 g/L 时，其对抗生素的去除率大幅增加，接近 90%。3.5 g/L 的 FJPN1 能完全去除庆大霉素和卡那霉素(0.5 g/L)，去除率达到 100%。FJPN1 对链霉素(0.5 g/L)的去除能力很弱，在测试浓度范围内去除率均低于 10%(图 4C)。FJPN1 对庆大霉素和卡那霉素表现出的高效去除能力，表明其对这两种抗生素具有较高的吸附能力，在去除废水中的抗生素残留方面具有较大的应用潜力。为探究 FJPN1 在抗生素生产废水中的去除效率，将 FJPN1 藻体分别加入 500 mL 不同稀释浓度(25%、50%、75%)及未稀释(100%)的含庆大霉素和卡那霉素生产废水中。因生产抗生素的废水含有一定浓度的抗生素残留，为保证实验条件的一致性，分别向各废水组中加入相应抗生素的浓缩母液，将其终浓度统一调节至 0.5 g/L，室温放置 7 d 后测定去除效率。结果如图 5A 所示，在 25% 和 50% 抗生素废水中，FJPN1 对两种抗生素均能实现 100% 去除率。当废水浓度升高至 75% 时，抗生素无法被完全去除，FJPN1 对庆大霉素的去除效率降至(84.33 ± 3.72)%，对卡那霉素的去除率降至约 90%。在未稀释组中，FJPN1 的抗生素去除率进一步降低，分别为(65.24 ± 5.18)%（庆大霉素）和(77.8 3 ± 2.89)%(卡那霉素)。为了判断 FJPN1 去除庆大霉素和卡那霉素的可能机制，将 FJPN1 接种于含 0.5 g/L 卡那霉素的 BG11 培养基中培养，待抗生素完全去除后收集藻体并提取 EPS。通过抑菌实验发现，空白对照组卡那霉素溶液对大肠埃希菌的抑菌圈直径为(19.06 ± 0.32) mm，吸附过卡那霉素的 EPS 抑菌圈直径为(18.84 ± 0.45) mm，二者无显著性差异($P > 0.05$，n = 8)(图 5B)。HPLC 定量分析进一步显示，EPS 中吸附的卡那霉素含量为(0.48 ± 0.13) g/L，接近初

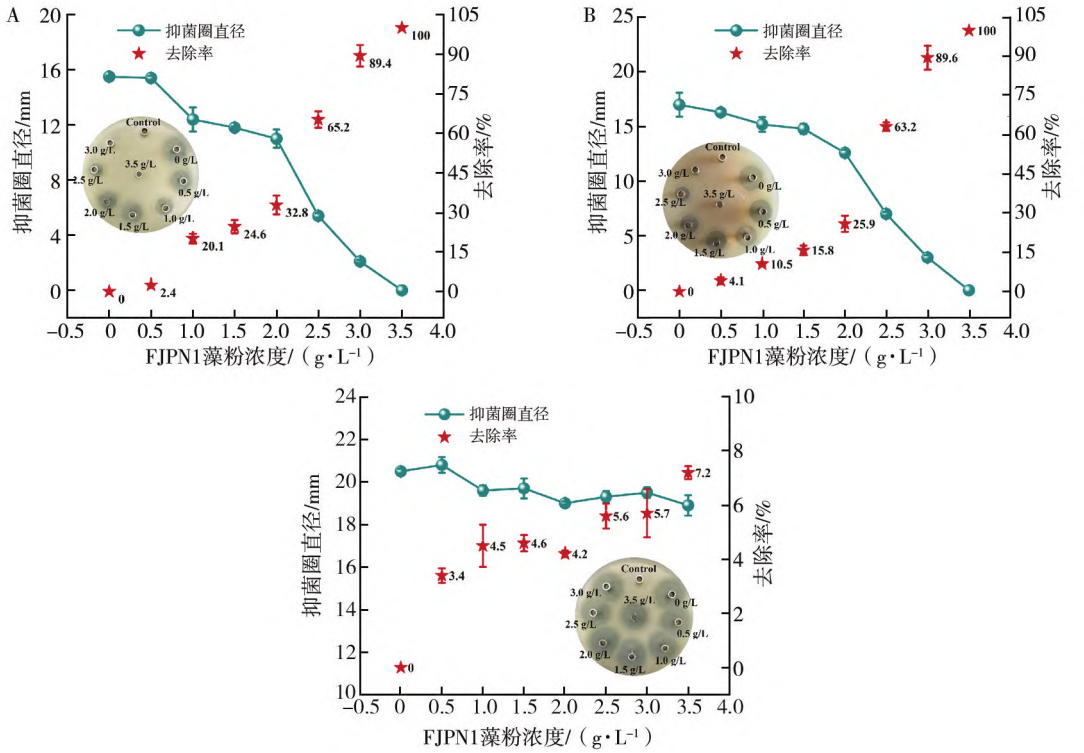


图 4 不同浓度 FJPN1 对三种抗生素去除率的影响

Fig. 4 Effects of FJPN1 concentration on removal rates of three antibiotics

A：庆大霉素；B：卡那霉素；C：链霉素。初始浓度均为 0.5 g/L

A: Gentamicin; B: Kanamycin; C: Streptomycin. Initial concentration 0.5 g/L for all

始卡那霉素浓度(0.5 g/L)(图 5C)。上述结果表明,FJPN1 对卡那霉素的去除主要依赖于 EPS 的生物吸附作用,生物累积或降解效应并未涉及或者并不显著。

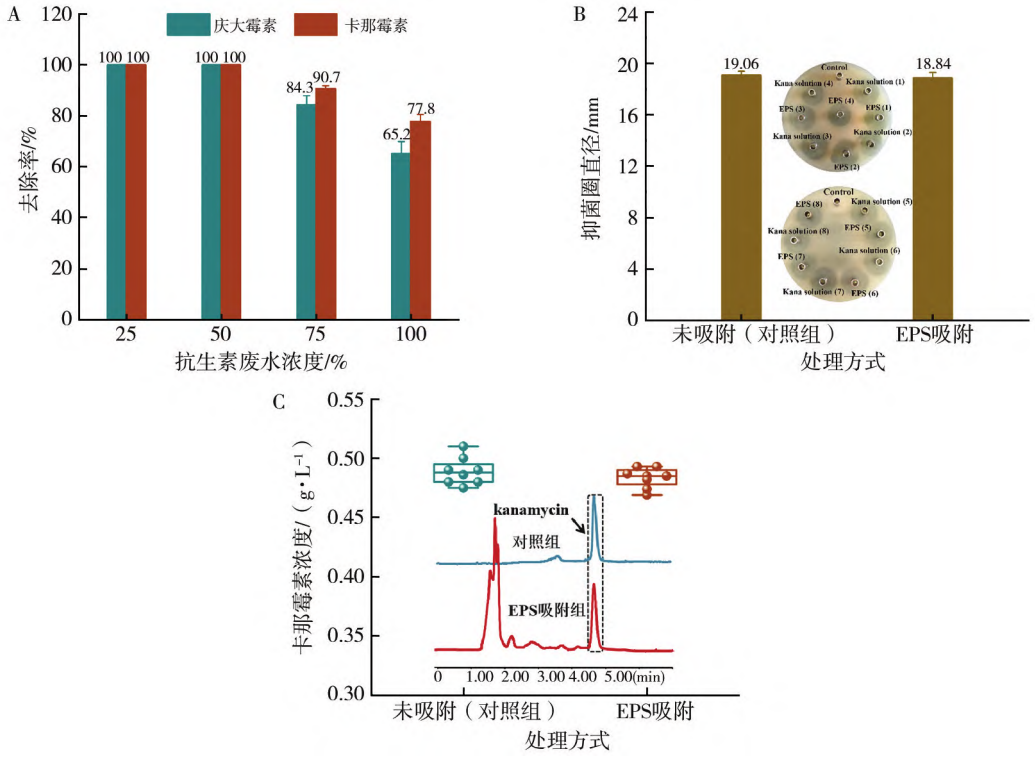


图 5　成膜微藻 FJPN1 对抗生素废水的处理效率及其 EPS 对卡那霉素的吸附验证

Fig. 5　Antibiotic wastewater treatment efficiency by FJPN1 and verification of kanamycin adsorption by EPS

A:废水中抗生素去除率;B:基于抑菌法的吸附检测;C:基于 HPLC 的吸附定量

A: Antibiotic removal rate in wastewater; B: Adsorption detection via microbial inhibition; C: Adsorption quantification by HPLC

3　讨　论

本研究从富营养化湖泊生物膜中筛选出一株高成膜性能的微藻 *Chlorella sorokiniana* FJPN1。作为兼具环境适应性与功能多样性的模式物种,*C. sorokiniana* 在不同生态位中展现出显著的生理特性差异。例如,Qiao 等[24] 分离的菌株 GX-NN01 在异养和微好氧条件下仍能高效生长,其代谢灵活性源于对碳源(如 D,L-苹果酸)的多样化利用能力;本研究中的 FJPN1 则通过高成膜性与 EPS 分泌适应生物膜定殖环境,进一步加深了对该物种功能应用潜力的认知。藻株 FJPN1 表现出优异的贴壁能力(贴壁率高达 96.83%),分泌的大量胞外聚合物(EPS)(295 mg/g)显著高于常规浮游藻株的 EPS 分泌量(通常低于 50 mg/g)[5]。FJPN1 不仅能够通过 EPS 实现藻细胞在固液界面的稳定附着,还具有显著的自发聚集特性,表明 EPS 可能兼具促进细胞间黏附与异种藻类絮凝的双重功能。

FTIR 分析结果进一步证实,FJPN1 的 EPS 具有多糖-蛋白复合物的典型特征,富含羟基、氨基及糖苷键等功能基团,这与 Zhuang 等[25] 报道的成膜藻株 EPS 中极性基团的优势分布一致。本研究结果显示,当 FJPN1 的 EPS 浓度达到0.5 g/L 时,可使普通小球藻的絮凝效率达到 90.51%,显著优于 Prochazkova 等[26] 报道的酵母多糖诱导絮凝效率(约 65%)。这种高效的絮凝活性可能源于其独特的结构和官能团配比,多糖的桥联作用和蛋白质的疏水相互作用促进了细胞聚集体的形成,而羟基、氨基及糖苷键等官能团的协同效应则增强了絮凝体的稳定性。

在抗生素污染治理方面,FJPN1 对氨基糖苷类抗生素的吸附效能与目标化合物分子结构具有强相关性。FJPN1 对庆大霉素和卡那霉素的最高去除率可达 100%,但对链霉素的去除率始终低

于 10%,这种显著的吸附选择性可能源于三类抗生素的结构差异。从分子构效关系角度分析,庆大霉素与卡那霉素同属 2-脱氧链霉胺型抗生素,其六元糖环上的多个氨基(-NH_2)和羟基(-OH)可与 EPS 中的羧基(-COOH)通过静电引力及氢键形成多重配位[27]。相比之下,链霉素的氨基环醇骨架携带的链霉胍基团因空间位阻效应降低了其与 EPS 疏水组分的接触概率,同时其五元糖环的刚性结构可能阻碍糖苷键与 EPS 吡喃环的 π-π 堆叠作用[28],最终导致吸附效率低下。这种结构依赖性特征表明,针对特定污染物设计 EPS 功能化修饰策略(如引入靶向配体)有望进一步提升去除抗生素效率。值得注意的是,高浓度抗生素废水的复杂性会使 FJPN1 的去除效率从 100%(稀释废水)降至 65.24%(未稀释废水)。这一现象可能与废水中高浓度有机物(如残糖、蛋白质)竞争吸附位点有关,也可能源于毒性物质对微藻生理活性的抑制[29]。但即便如此,藻株 FJPN1 在实际废水中的表现仍显著优于常规微藻(平均去除率 62.30%)[30],显示出工程化应用潜力。

通过抑菌实验与 HPLC 联用技术,本研究初步探索了 FJPN1 的抗生素去除方法。实验数据显示,吸附后的 EPS 中卡那霉素回收率达 96.40%,且其抑菌活性未发生显著变化($P > 0.05$),排除了生物降解或细胞内转化为主要去除机制的可能性。结合“EPS 屏障”理论[31],推测 FJPN1 可能通过以下途径实现抗生素的固定:①EPS 表面极性基团与抗生素分子形成可逆络合物;②疏水组分将部分抗生素包裹进基质胶体层;③动态吸附-解吸平衡使抗生素富集于 EPS/溶液界面。这一基于物理吸附的机制需关注吸附饱和后 EPS-抗生素复合体的后续处理问题,未来研究可进一步解析 EPS 关键官能团与抗生素分子的结合能力,开发基于成膜微藻的循环吸附-再生系统,以实现技术工程化应用。

参考文献:

[1] He Y, Ji L, Yuan YC, et al. Recent advances in polysaccharide-dominated extracellular polymeric substances from microalgae: A review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 302: 140572.

[2] Zhou Y, Cui XC, Wu BB, et al. Microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their roles in cultivation, biomass harvesting, and bioproducts extraction[J]. Bioresource Technology, 2024, 406: 131054.

[3] Li C, Li PH, Fu HX, et al. Dynamic responses and adsorption mechanisms of *Chlamydomonas reinhardtii* extracellular polymeric substances under Cd, Cu, Pb, and Zn exposure[J]. Environmental Pollution, 2025, 368: 125747.

[4] Daneshvar E, Zarrinmehr MJ, Hashtjin AM, et al. Versatile applications of freshwater and marine water microalgae in dairy wastewater treatment, lipid extraction and tetracycline biosorption[J]. Bioresource Technology, 2018, 268: 523-530.

[5] Babiak W, Krzeminska I. Extracellular polymeric substances (EPS) as microalgal bioproducts: A review of factors affecting EPS synthesis and application in flocculation processes[J]. Energies, 2021, 14(13): 4007-4030.

[6] Cheah YT, Chan DJC. Physiology of microalgal biofilm: A review on prediction of adhesion on substrates[J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 7577-7599.

[7] Sun W, Peng B. Research progress on attached culture technology of microalgae[J]. Frontiers in Sustainable Development, 2023, 3: 109-113.

[8] Mourelle ML, Díaz-Seoane F, Inoubli S, et al. Microalgae and cyanobacteria exopolysaccharides: An untapped raw material for cosmetic use[J]. Cosmetics, 2025, 12(5): 200-212.

[9] Tong CY, Lim SL, Chua MX, et al. Uncovering the role of algal organic matter biocoating on *Navicula incerta* cell deposition and biofilm formation[J]. Bioengineered, 2023, 14(1): 2252213.

[10] Jung SH, Zell N, Boble F, et al. Influence of process operation on the production of exopolysaccharides in *Arthrospira platensis* and *Chlamydomonas asymmetrica*[J]. Frontiers in Sustainable Food Systems, 2022, 6: 883069.

[11] Roy N, Roy S, Debroy A, et al. *Chlorella* sp. EPS loaded alginate microsphere: A novel bionanomaterial for adsorptive removal of sulfamethoxazole from the aqueous solutions[J]. Environmental Technology & Innovation, 2024, 33: 103513.

[12] 孙尚琛,何碧红,王永刚,等. 微生物生物吸附重金属性能及生理学机理研究[J]. 微生物学杂志, 2025, 45(3): 73-82.

[13] Zhu JY, Wakisaka M, Omura T, et al. Advances in industrial harvesting techniques for edible microalgae: Recent insights into sustainable, efficient methods and future directions[J]. Journal of Cleaner Production, 2024, 436: 140626.

[14] Bhatt A, Khanchandani M, Rana MS, et al. Techno-economic analysisof microalgae cultivation for commercial sustainability: A state-of-the-art review[J]. Journal of Cleaner Production, 2022, 370: 133456.

[15] 尚坤,阎瑾逸,高君梅,等. 放线菌来源活性天然产物发现研究进展[J]. 微生物学杂志, 2023, 43(4): 101-108.

[16] Luo Y, Sun Y, Wei X, et al. Detection methods for antibiotics in wastewater: A review[J]. Bioprocess and Biosystems Engi-

neering,2024,47(9):1433-1451.
[17] Yuan X,Lv ZQ,Zhang ZY,et al. A review of antibiotics, antibiotic resistant bacteria, and resistance genes in aquaculture: Occurrence, contamination, and transmission[J]. Toxics, 2023,11(5):420-433.
[18] Nian Q,Yang H,Meng E,et al. Efficient adsorptive removal of aminoglycoside antibiotics from environmental water[J]. Chemosphere,2023,337:139379.
[19] Sharma A,Singh G,Saini S,et al. Preconcentration through self-assembled structure: Highly selective detection of aminoglycoside antibiotic in the contaminated water[J]. Sensors and Actuators B: Chemical,2023,389:133870.
[20] Tait K,White DA,Kimmange SA,et al. Characterisation of bacteria from the cultures of a *Chlorella* strain isolated from textile wastewater and their growth enhancing effects on the axenic cultures of *Chlorella vulgaris* in low nutrient media[J]. Algal Research,2019,44:101666.
[21] Richards E,Reichardt M,Rogers S. Preparation of genomic DNA from plant tissue[J]. Current Protocols in Molecular Biology,1994,27(1):231-237.
[22] Yuan C,Liu J,Fan Y,et al. Mychonastes afer HSO-3-1 as a potential new source of biodiesel[J]. Biotechnology for Biofuels,2011,4(1):47-54.
[23] Chen ZH,Liu X,Chen LW,et al. Deglycosylation inactivation initiated by a novel periplasmic dehydrogenase complex provides a novel strategy for eliminating the recalcitrant antibiotic kanamycin[J]. Environmental Science & Technology,2023,57(10):4298-4307.
[24] Qiao H,Wang G,Zhang X. Isolation and characterization of *Chlorella sorokiniana* GXNN01 (Chlorophyta) with the properties of heterotrophic and microaerobic growth[J]. Journal of Phycology,2009,45(5):1153-1162.
[25] Zhuang LL,Yu D,Zhang J,et al. The characteristics and influencing factors of the attached microalgae cultivation: A review[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews,2018,94:1110-1119.
[26] Prochazkova G,Kastanek P,Branyik T. Harvesting freshwater *Chlorella vulgaris* with flocculant derived from spent brewer's yeast[J]. Bioresource Technology,2015,177:28-33.
[27] 李思聪,孙宇辉. 氨基糖苷类抗生素生物合成研究进展[J]. 中国抗生素杂志,2019,44(11):1261-1274.
[28] Takemoto JY,Altenberg GA,Poudyal N,et al. Amphiphilic aminoglycosides: Modifications that revive old natural product antibiotics[J]. Frontiers in Microbiology,2022,13:1000199.
[29] Liu XY,HongY,Zhao GP,et al. Microalgae-based swine wastewater treatment:Strain screening, conditions optimization, physiological activity and biomass potential[J]. Science of the Total Environment,2022,807:151008.
[30] Lu WW,Xu C,Liu F,et al. Antibiotic removal efficiency by microalgae:A systematic analysis combined with meta-analysis[J]. Process Safety and Environmental Protection,2023,174:912-920.
[31] Cheah YT,Chan DJC. A methodological review on the characterization of microalgal biofilm and its extracellular polymeric substances[J]. Journal of Applied Microbiology,2022,132(5):3490-3514.