



# 深色有隔内生真菌不同培养时间对胞外聚合物合成的影响

毕银丽<sup>1,2,3\*</sup>, 谭海<sup>1,2</sup>, 张士双<sup>1,2</sup>, 赵静<sup>1,2</sup>

1 西安科技大学地质与环境学院, 陕西 西安 710600

2 西安科技大学西部矿山生态环境修复研究院, 陕西 西安 710600

3 中国矿业大学(北京) 煤炭资源与安全开采国家重点实验室, 北京 100083

毕银丽, 谭海, 张士双, 赵静. 深色有隔内生真菌不同培养时间对胞外聚合物合成的影响[J]. 微生物学报, 2024, 64(4): 1175-1186.

BI Yinli, TAN Hai, ZHANG Shishuang, ZHAO Jing. Effects of different incubation time periods on synthesis of extracellular polymeric substances by dark septate endophytes[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(4): 1175-1186.

**摘要:** 【目的】探索不同培养时间下深色有隔内生真菌(CGMCC 17463)合成胞外聚合物(extracellular polymeric substance, EPS)的产量及组成变化。【方法】通过摇瓶培养深色有隔内生真菌(dark septate endophytes, DSE), 分析不同培养时间合成的 EPS 产量及应用的差异。【结果】摇瓶发酵试验表明, 第 4–12 天, DSE 生长趋于对数期和稳定期, EPS 合成速率较快, 在第 12 天产量达到 1.41 g/L, 之后 EPS 的合成速率逐渐降低。EPS 组分分析结果表明, 在相同质量的 EPS 中, 第 12 天的胞外多糖含量较高, 随着 DSE 生长进入稳定期至衰亡期, 菌丝裂解, EPS 中蛋白含量显著提高。官能团分析结果表明, 不同培养时间的 EPS 中官能团种类并未发生变化, 仅存在官能团含量上的改变。扫描电子显微镜和粒径分析结果表明, 随着培养时间的增加, EPS 的结构逐渐发生改变, EPS 中分子粒径小于 5  $\mu\text{m}$  所占比例逐渐提高, 分子粒径大于 100  $\mu\text{m}$  所占比例逐渐降低。另外, EPS 的生物活性测定结果表明, 不同培养时间合成的 EPS 均具有清除氧自由基和保水的能力, 并且这种能力受 EPS 组分相对丰度变化的影响。【结论】第 12 天为提取胞外多糖含量相对较高的 EPS 最佳时机, 第 24 天为提取蛋白含量相对较高的 EPS 最佳时机, 这为 EPS 在环境复杂的矿山生态中应用奠定了基础。

**关键词:** 深色有隔内生真菌; 胞外聚合物; 胞外多糖; 自由基清除速率; 吸湿能力

资助项目: 黄河流域生态保护和高质量发展联合研究项目(2022-YRUC-01-0304)

This work was supported by the Joint Research Program for Ecological Conservation and High-quality Development of the Yellow River Basin (2022-YRUC-01-0304).

\*Corresponding author. E-mail: ylbi88@126.com

Received: 2023-10-27; Accepted: 2023-12-06; Published online: 2023-12-19

# Effects of different incubation time periods on synthesis of extracellular polymeric substances by dark septate endophytes

BI Yinli<sup>1,2,3\*</sup>, TAN Hai<sup>1,2</sup>, ZHANG Shishuang<sup>1,2</sup>, ZHAO Jing<sup>1,2</sup>

1 College of Geology and Environment, Xi'an University of Science and Technology, Xi'an 710600, Shaanxi, China

2 Institute of Ecological Environment Restoration in Mine Areas of West China, Xi'an University of Science and Technology, Xi'an 710600, Shaanxi, China

3 State Key Laboratory for Coal Resources and Safe Mining, China University of Mining and Technology (Beijing), Beijing 100083, China

**Abstract: [Objective]** To explore the changes in the yield and composition of extracellular polymeric substances (EPS) of *Alternaria* sp. CGMCC 17463, a strain of dark septate endophyte (DSE), cultured for different time periods. **[Methods]** We conducted the shake flask experiment to compare the yield, structure, composition, and activity of EPS synthesized by a DSE strain cultured for different time periods. **[Results]** From day 4 to 12, the growth of the DSE strain entered the logarithmic and stationary phases. During this period, the EPS synthesis rate was high, with the yield reaching 1.41 g/L on day 12. Afterwards, the EPS synthesis rate gradually decreased. The component analysis revealed that the extracellular polysaccharide content was the highest on day 12 in the EPS samples of equal mass. As the growth of DSE continued and entered the decline phase, mycelial lysis occurred, significantly increasing the protein content in the EPS. Functional group analysis showed that as the incubation time was extended, the functional groups in the EPS presented changes only in the content but not species. The results of scanning electron microscopy and particle size analysis showed that the EPS composition gradually changed with the increase in incubation time. Specifically, the EPS components with the particle size smaller than 5  $\mu\text{m}$  presented increased volume percentage, while those with the particle size larger than 100  $\mu\text{m}$  showed gradually decreased volume percentage. Furthermore, the EPS possessed the ability to scavenge oxygen free radicals and retain water, which were significantly influenced by the changes in EPS composition. **[Conclusion]** The day 12 marks the optimal time point for the production of EPS with high polysaccharide content, while the day 24 marks the optimal time point for the production of EPS with high protein content. This result establishes a foundation for the application of EPS in the complex eco-environment of mines.

**Keywords:** dark septate endophytes; extracellular polymeric substance; extracellular polysaccharide; free radical scavenging; hygroscopicity

胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)是微生物分泌出的一种复杂的大分子聚合物,主要成分为多糖和蛋白,还包含少量的脂肪酸、核酸、腐植酸、氨基酸和其他分子<sup>[1]</sup>。由于

EPS 溶液较为黏稠且带有离子电荷, Chenu<sup>[2]</sup>提出 EPS 可以像胶水一样,附着在黏土和离子上,将固体颗粒保持在一起,促进土壤团聚体的形成和稳定。同时 EPS 还可以提高土壤的持水能力,

减少土壤的水土流失, 增强土壤的孔隙度<sup>[3-4]</sup>。EPS 中含有大量的碳水化合物, 随着时间的延长, EPS 可以被土壤中的微生物分解, 改善土壤微生物环境和土壤肥力。另外, EPS 还具有较强的抗氧化能力, 可以提高植物的抗胁迫能力<sup>[5]</sup>。因此, 鉴于 EPS 具有生物分解性和无污染的特点, EPS 在生态环境的修复中具有较好的应用前景。

目前, 在部分真核生物和原核生物中均发现 EPS 的合成。Parikh 等<sup>[6]</sup>在蓝藻中提取出 EPS 并进行了成分分析, 发现主要含有甘露糖、葡萄糖、木糖和核糖等 4 种物质。在真菌中, 通过对碳源、氮源、无机盐等培养基组分优化, 使红曲霉的 EPS 产量提高了 5 倍<sup>[7]</sup>。Hao 等<sup>[8]</sup>在假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas agarivorans*)的代谢产物中提取出 EPS, 在溶氧效果较好的条件下, 更有利于 EPS 的合成。还有研究通过添加表面活性剂促使食用菌 *Lentinus edodes* EPS 的产量提高了 20.85%, 达到了 2.6 g/L<sup>[9]</sup>。

深色有隔内生真菌(dark septate endophytes, DSE)是一类广泛定殖于植物根部的内生真菌, 在植物生长和生态环境修复中起着重要作用。Newsham 等<sup>[10]</sup>和 Li 等<sup>[11]</sup>在干旱、寒冷等环境的植物根部均分离出了 DSE。Tienaho 等<sup>[12]</sup>发现内生真菌的代谢产物中有大量具有生物活性的物质, 可以影响氧自由基的清除速率。Wang 等<sup>[13]</sup>发现 DSE 的代谢产物可以促进植物根部的生长和对营养物质的吸收。然而 DSE 具体的作用机制仍未研究透彻。在此背景下, 本研究在深色有隔内生真菌 CGMCC 17463 的代谢产物中提取了 EPS, 对不同培养时间下菌体形态、DSE 生长情况、EPS 产量、结构变化和 EPS 的功能方面进行了分析, 探索该菌株生长过程中合成 EPS 的规律, 为后续 EPS 培养条件的优化和矿山生态修复中的应用奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株

本实验室筛选并保存的深色有隔内生真菌 CGMCC 17463 藏于中国典型培养物保藏中心。根据其形态特征和内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)系统发育, 该菌株被鉴定为链格孢属(*Alternaria* sp.)。

### 1.2 培养基

液体培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, 麦芽提取物 10.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5, NaCl 0.025, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.25, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.15, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.012, CaCl<sub>2</sub> 0.05, vitamin B<sub>1</sub> (硫胺素) 0.000 1 和柠檬酸 0.2, 调整 pH 为 5.7, 121 °C 灭菌 20 min。

### 1.3 培养方法

250 mL 摇瓶中装有 100 mL 液体培养基, 121 °C 灭菌 20 min。接入培养 8 d 直径为 5 mm 的 DSE 菌块, 28 °C、170 r/min 摇床培养 2、4、8、12、16、20、24 d。

### 1.4 EPS 的提取方法

将发酵液以 10 000×g 离心 5 min, 保留上清, 加入 3 倍体积的无水乙醇, 旋转振荡后再次离心, 收集白色絮状物质, 冷冻干燥, 称重计算 EPS 的产量<sup>[14]</sup>。

### 1.5 分析方法

#### 1.5.1 生物量的测定

DSE 生物量采用干重法测定<sup>[15]</sup>。将发酵液 10 000×g 离心 5 min 后用蒸馏水冲洗 3 次, 在 80 °C 下烘干至恒重。

#### 1.5.2 残糖含量的测定

采用 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)法测定<sup>[16]</sup>。将发酵液稀释 10 倍, 加入 2 倍体积的 DNS, 在沸水中水浴 5 min。冷却后稀释适当倍数, 540 nm 处测量其吸光度。

#### 1.5.3 蛋白含量的测定

采用考马斯亮蓝染色法测定 EPS 中蛋白浓

度<sup>[17]</sup>。将提取的EPS按照1 g/L浓度溶解于水中，在595 nm波长下测定蛋白含量。

#### 1.5.4 多糖含量的测定

采用苯酚硫酸法测定EPS中多糖的含量<sup>[8]</sup>。将提取出的EPS按照1 g/L浓度溶解于水中，在490 nm波长下测定胞外多糖含量。

#### 1.5.5 黏度的测定

使用LC-NDJ-1T黏度计测定发酵液黏度。将30 mL发酵液倒入样品槽，使用0号转子进行测量。

#### 1.5.6 EPS官能团的测定

使用傅里叶红外光谱分析仪(Bruker Optics公司)测定EPS的官能团。扫描宽度为4 00–4 000 cm<sup>-1</sup>。

#### 1.5.7 EPS溶液粒径分析

称取25 mg EPS溶于5 mL水中。使用MASTERSIZER 3000激光粒度仪测定EPS溶液粒径<sup>[18]</sup>。

#### 1.5.8 EPS形态的分析

取约10 mg EPS固体粉末，置于导电胶上喷金，扫描电子显微镜上进行表面扫描。

#### 1.5.9 EPS对自由基清除速率测定

采用芬顿(Fenton)反应分析EPS对羟自由基清除活性的影响<sup>[19]</sup>。在此方法上进行改进：将1,10-菲啰啉(5 mmol/L) 1.0 mL、磷酸钠缓冲液(0.05 mol/L, pH 7.4) 1.0 mL、FeSO<sub>4</sub> (7.5 mmol/L) 0.5 mL和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%, 体积分数) 0.5 mL混匀作为反应体系。在96孔板中，加入150 μL反应体系和100 μL水溶液后，在510 nm处测量吸光度，将混合物在37 °C下孵育30 min，在510 nm处测量吸光度(记为ΔA<sub>水</sub>)。加入150 μL体系和100 μL样品溶液后，在510 nm处测量吸光度，将混合物在37 °C下孵育30 min，在510 nm处测量吸光度(记为ΔA<sub>样</sub>)。将1,10-菲啰啉(5 mmol/L) 1.0 mL、磷酸钠缓冲液(0.05 mol/L, pH 7.4) 1.0 mL、FeSO<sub>4</sub> (7.5 mmol/L) 0.5 mL和H<sub>2</sub>O

0.5 mL混匀作为空白体系，在37 °C下孵育30 min，在510 nm处测量吸光度(记为ΔA<sub>空白</sub>)。按照公式(1)计算清除率。

$$\text{OH清除率}(\%) = \frac{\Delta A_{\text{水}} - \Delta A_{\text{样}}}{\Delta A_{\text{空白}} - \Delta A_{\text{水}}} \times 100 \quad (1)$$

采用邻苯三酚自氧化法测定超氧阴离子自由基(O<sup>2-</sup>)清除速率<sup>[20-21]</sup>。用10 mmol/L HCl溶液配制成6 mmol/L的溶液邻苯三酚，配制50 mmol/L pH 8.2的Tris-HCl缓冲溶液。取2.5 mL的Tris-HCl缓冲溶液加入0.3 mL超纯水，25 °C保温10 min后加入6 mmol/L的邻苯三酚溶液，3 min后在320 nm处测定吸光度，记为A<sub>0</sub>，取2.5 mL的Tris-HCl缓冲溶液加入0.3 mL样品溶液，25 °C保温10 min后加入10 mmol/L的盐酸溶液，3 min后在320 nm处测定吸光度，记为A<sub>i</sub>，取2.5 mL的Tris-HCl缓冲溶液加入0.3 mL样品溶液，25 °C保温10 min后加入6 mmol/L的邻苯三酚溶液，3 min后在320 nm处测定吸光度，记为A<sub>j</sub>。按照公式(2)计算清除率。

$$\text{O}^{2-}\text{清除率}(\%) = \left[ 1 - \frac{A_j - A_i}{A_0} \right] \times 100 \quad (2)$$

#### 1.5.10 EPS对空气中水分吸湿能力测定

取一定量的EPS于铝盒中，称重记为M<sub>0</sub>；然后置于人工气候培养箱中，温度25 °C，相对湿度50%条件下黑暗培养，每隔6 h取出，称重记为M<sub>x</sub>。按照公式(3)计算吸湿率。

$$\text{H}(\%) = \left[ \frac{M_x - M_0}{M_0} \right] \times 100 \quad (3)$$

## 1.6 数据处理

使用Excel分析数据, Origin 2021软件作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同培养时间对DSE生长和EPS合成的影响

在250 mL摇瓶中进行液体DSE (*Alternaria* sp. CGMCC 17463)发酵试验，对能反映DSE生

长情况和 EPS 产量变化的主要参数进行测定和计算(图 1)。在培养 0–2 d, DSE 生物量仍处于较低水平, 表明该阶段为延滞期。在培养 2–8 d, DSE 生物量呈现出快速增长的趋势, 表明该阶段为 DSE 生长的对数期。在培养 8–16 d, DSE 生长速率降低并呈现稳定的趋势, 与此同时, 发酵液 pH 呈缓慢升高的趋势。pH 的升高表明真菌菌丝出现裂解, 部分细胞内产物融入至发酵液中<sup>[22]</sup>。因此, 在培养的 8–16 d 阶段可能进入了稳定期。

与此同时, 对发酵液中残糖含量和 EPS 产量进行分析。发现在 0–4 d, 残糖含量显著降低, EPS 合成速率较慢, 含量仍处于较低水平。4–12 d, 残糖含量仍保持快速的消耗, 与此同时 EPS 的合成速率一直处于较高水平, 表明在该阶段为 DSE 合成 EPS 的关键时期。12 d 后, EPS 的合成速率降低, EPS 的产量不再发生显著的变化。第 12 天 EPS 的含量分别是第 4 天和第 8 天的

4.96 倍和 1.67 倍。另外, DSE 发酵液的黏度与 EPS 产量呈正相关关系, EPS 产量越高, DSE 发酵液的黏度越大。

随着培养时间的变化, DSE 发酵液的颜色逐渐加深, 在 DSE 培养至第 20 天, 菌体开始聚集, 这可能为 DSE 培养至衰亡期的表征(图 2)。另外, EPS 的颜色也随时间的推移逐渐加深。推断其可能是由于发酵后期菌丝内的黑色素类物质释放到发酵液中, 进而导致 EPS 呈黑色。

## 2.2 不同培养时间对 EPS 中胞外多糖和蛋白合成的影响

对不同培养时间 EPS 中多糖和蛋白分析发现, 相同质量 EPS 中多糖和蛋白的含量随时间的推移发生改变。其中多糖的含量占主要地位, 维持在 70%–78% (图 3A), 而蛋白含量维持在 6%–24%, 呈现逐渐升高的趋势。随时间的增加, 相同质量的 EPS 中多糖和蛋白含量所占的比例总和也逐渐增加。

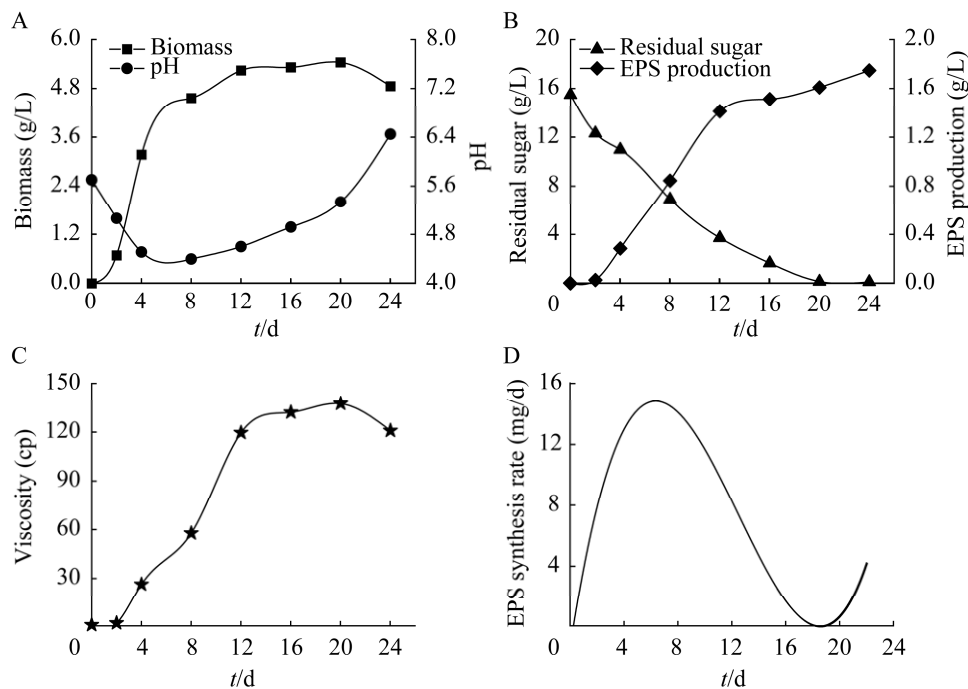


图 1 不同培养时间对 DSE 生长和 EPS 合成的影响

Figure 1 Effect of different culture times on the growth of DSE and EPS production. A: Biomass and pH. B: EPS production and residual sugar. C: Viscosity. D: EPS synthesis rate.

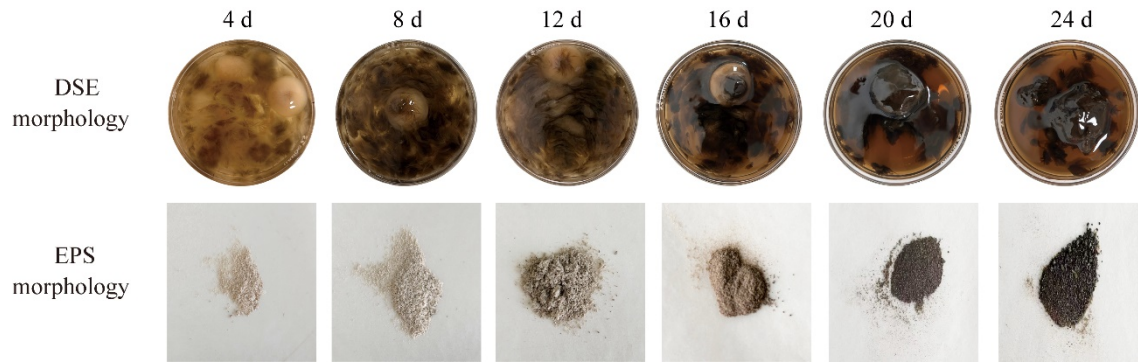


图 2 不同培养时间对 DSE 和 EPS 形态的影响

Figure 2 Effect of different culture times on the morphology of the DSE and the EPS.

胞外多糖的含量在 4–12 d 呈快速合成的阶段,这可能与发酵液中葡萄糖快速消耗有关,第 12 天胞外多糖的含量是第 4 天和第 8 天的 4.95 倍和 1.85 倍(图 3B)。在 12 d 后,胞外多糖的含量不再发生显著的变化,而蛋白含量随着培养时间的增加呈快速增长的趋势。第 24 天蛋白含量较第 12 天提高了 2.49 倍(图 3C)。这可能与 DSE 进入生长稳定期或衰亡期,菌丝裂解,部分蛋白释放融入至发酵液中有关。

### 2.3 不同培养时间对 EPS 官能团的影响

对不同培养时间 EPS 的红外光谱分析结果

表明,不同培养时间的 EPS 组分并未发生改变。 $3\ 000\text{--}3\ 500\ \text{cm}^{-1}$  处存在较宽的吸收带,可能为  $\text{-OH}$  和  $\text{-NH}$  的伸缩振动峰,分别来自 EPS 中的糖环和蛋白质。在  $1\ 638\ \text{cm}^{-1}$  处的振动带可能是仲酰胺基 ( $\text{-NHC=O-}$ ) 中的  $\text{C=O}$  键伸缩振动造成的,该结构可能是无规则卷曲和螺旋状中的蛋白肽链,并且 EPS 中振动强度较小,表明该结构在 EPS 中含量相对较低。 $1\ 249\text{--}1\ 424\ \text{cm}^{-1}$  处出现的振动带可能为 EPS 结构中  $\text{C-H}$  的变角振动。在  $1\ 023\ \text{cm}^{-1}$  处较强的吸收峰为吡喃糖环结构,其中 DSE 培养 12 d 提取的 EPS 在此处吸

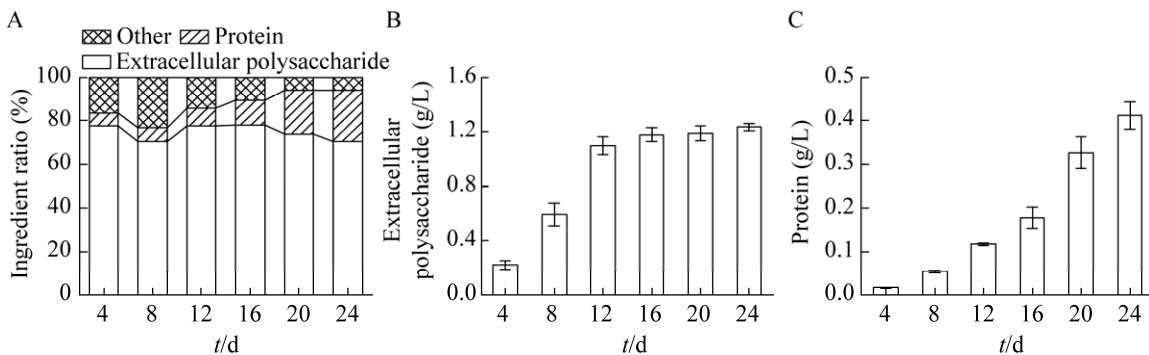


图 3 不同培养时间对 EPS 各组分比例、胞外多糖和蛋白产量的影响

Figure 3 Effect of different culture times on the proportion of each component in EPS. A: Proportion of extracellular polysaccharide, protein and other components. B: Extracellular polysaccharide production. C: Protein production. Column height represents the average and the error bar represents the SD of measurements with four samples.

收峰强度最大, 表明在该时间提取的 EPS 中糖的含量相对较高, 与苯酚硫酸法测多糖含量的结果相吻合。另外, 在 $-889\text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰表明 EPS 中的多糖为  $\alpha$  构型<sup>[23]</sup>。

### 2.4 不同培养时间对 EPS 粒径的影响

EPS 分子粒径变化会影响 EPS 的吸水和持水能力<sup>[24]</sup>。不同培养时间下提取的 EPS 粒径分布存在显著的差异(图 4)。随着培养时间的增加, EPS 中小分子粒径所占比例逐渐增加, 大分子粒径所占比例逐渐降低。第 20 天和第 24 天提取的 EPS 中, 分子粒径小于  $5\ \mu\text{m}$  占比相较于第 12 天提取的 EPS 提高了 11.2%和 10.2%, 分子粒径大于  $100\ \mu\text{m}$  占比分别降低了 50.1%和 18.0%。这可能是由于在 DSE 生长后期, 发酵液中的残糖含量降低, DSE 将胞外多糖分解以供自身生长需要。

### 2.5 不同培养时间对 EPS 形貌特征的影响

随着时间的变化, DSE 合成的 EPS 形态逐渐发生改变(图 5)。第 4 天 DSE 合成的 EPS 表面相对呈多孔性网状结构, 而第 12 天合成的 EPS

表面更为光滑, 呈较为规则的束状结构。第 24 天, EPS 表面结构紊乱, 并且存在大量的细小结晶物质。这种视觉变化可能就是由于在第 4 天, EPS 合成的较少, 而在第 12 天 EPS 合成量逐渐增加, 更容易聚合在一起。而第 24 天 EPS 形态变化可能来自于两个方面: 一方面, DSE 进入衰亡期, 部分细胞裂解, 胞内 EPS 溶于发酵

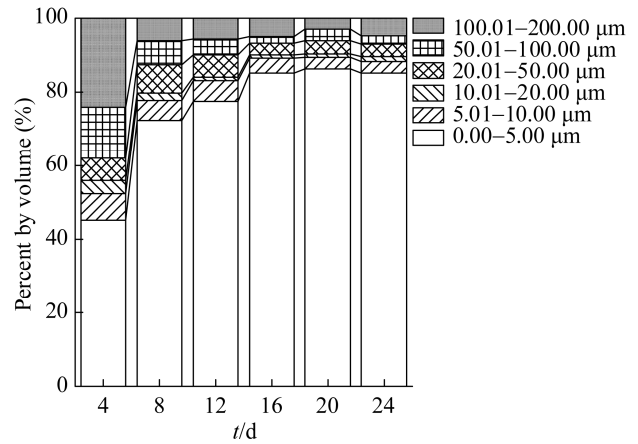


图 4 不同培养时间对 EPS 粒径的影响

Figure 4 Effect of different culture times on EPS particle size.

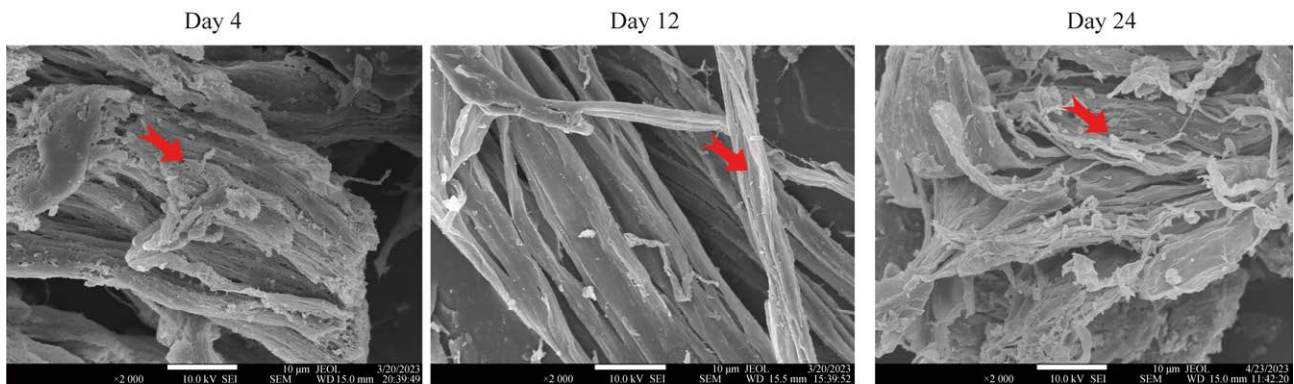


图 5 不同培养时间对 EPS 结构的影响

Figure 5 Effect of different culture time on EPS structure. Red arrows represent differences between different treatments.

液中；另一方面，由于 DSE 在培养 16 d 后发酵液中的碳源被消耗殆尽，部分 DSE 需要维持生长，将部分胞外多糖分解，导致 EPS 结构发生改变。

## 2.6 不同培养时间对 EPS 抗氧化能力的影响

结果表明，不同培养时间的 EPS 均具有清除氧自由基的作用，并且随浓度增加，EPS 的清除能力逐渐增强(图 6)。其中，羟自由基的清除速率并未随时间的变化而发生显著的变化。第 4 天提取 EPS 的清除速率显著低于其他培养时间提取的 EPS 清除速率。结合红外光谱结果发现，该时期 EPS 中官能团的相对丰度较低，而 EPS 中醛基和酮基具有促使氢键解离能力，可以起到

清除氧自由基的作用<sup>[8]</sup>。另外，黑色素为酪氨酸的衍生物，也属于大分子物质，具有抗氧化的能力<sup>[25]</sup>。由图 2 可知，随着培养时间的增加，提取的 EPS 的颜色逐渐增加，这也是影响 EPS 抗氧化能力的因素之一。

## 2.7 不同培养时间对 EPS 吸湿能力的影响

不同培养时间的 EPS 吸湿能力均呈先升高后趋向于平稳的趋势(图 7)。相对比于其他培养时间的 EPS，培养第 12 天的 EPS 吸湿能力较强，吸湿率达到了 5.92%，相对比于其他时间提取的 EPS 提高了 1.78%–19.88%。这可能是由于相同量的 EPS 中，胞外多糖相对含量、粒径、官能团和分子结构的变化有关。

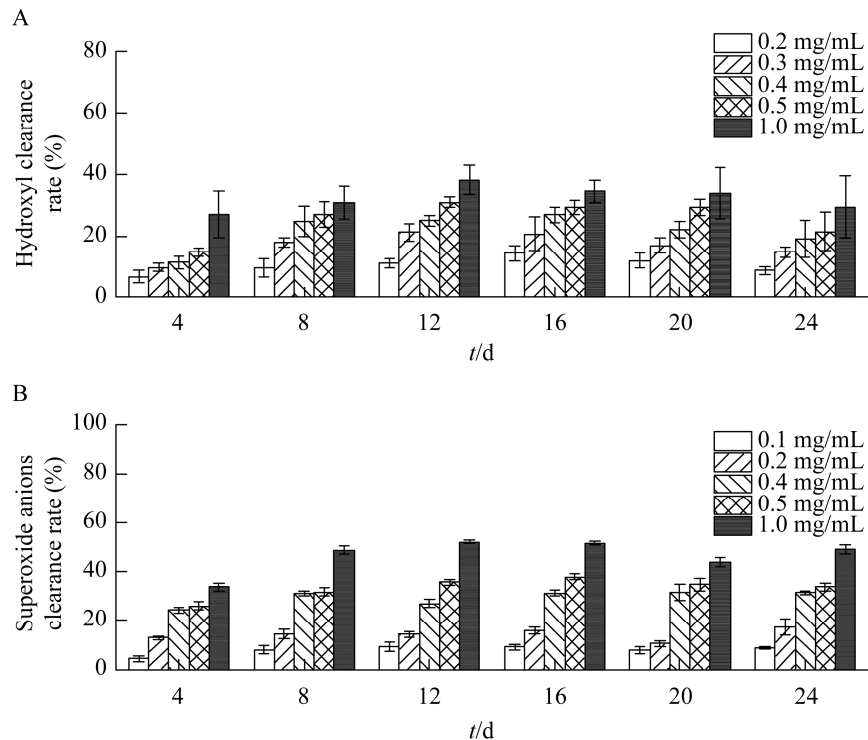


图 6 不同培养时间的 EPS 对羟自由基和超氧阴离子自由基清除速率的影响

Figure 6 Effect of EPS on the clearance rate of hydroxyl (A) and superoxide anions (B) by different culture times. 0.1–1.0 mg/mL represents the concentration of EPS solution. Column height represents the average and the error bar represents the SD of measurements with four samples.



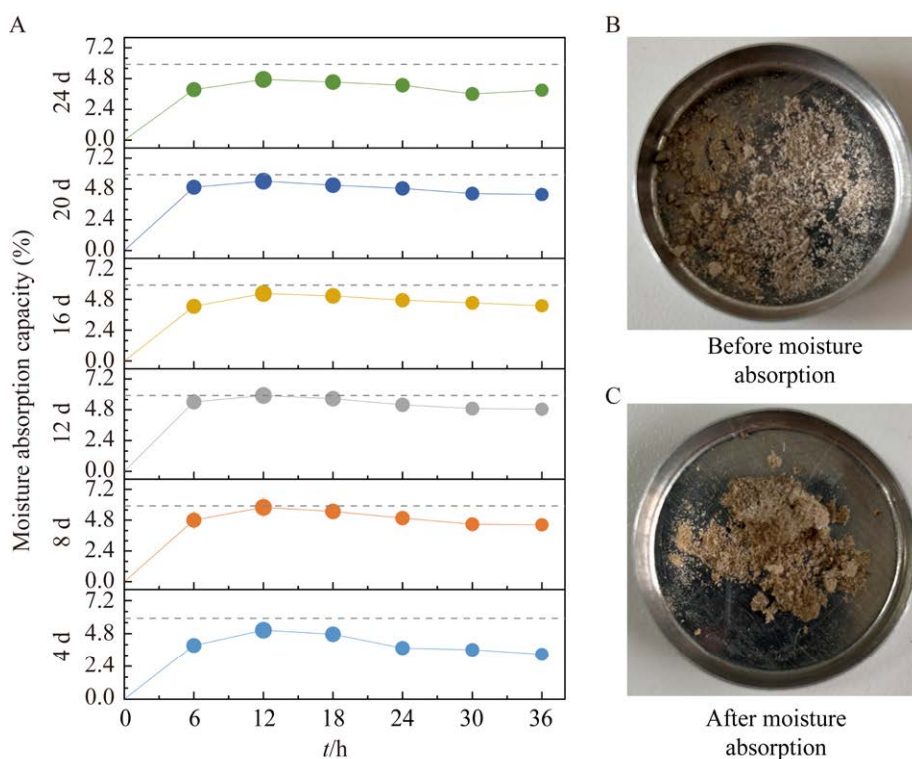


图 7 不同培养时间对 EPS 吸湿能力的影响

Figure 7 Effect of different culture times on the moisture absorption capacity of EPS. A: EPS moisture absorption capacity. B: Before EPS moisture absorption. C: After EPS moisture absorption.

### 3 讨论

#### 3.1 DSE 生长与 EPS 合成的关系

在培养前期,真菌主要将葡萄糖用于菌体生长, EPS 合成途径的相关基因表达量相对较低<sup>[7]</sup>。在 DSE 生长过程中表现出了相同的趋势,在培养的前 4 d,残糖含量呈显著的变化,而 EPS 的合成速率较慢,产量较低,表明 DSE 在该阶段主要用于菌体的生长。真菌培养至稳定期前后,是 EPS 合成的关键时期<sup>[26]</sup>。4–12 d,残糖含量仍保持快速的消耗,与此同时 EPS 的合成速率一直处于较高水平,表明在该时间内, DSE 消耗了大量的碳源用于合成 EPS。而在 16 d, EPS 的合成速率降低,可能发酵液内残糖含量处于较低水平有关。碳源水平的降低直接影响着 EPS

的合成。研究发现,在第 16 天和第 20 天中间 EPS 的合成速率降至最低点后出现了反弹,这可能是由于培养基中糖的含量被消耗殆尽后,部分 DSE 裂解,细胞内 EPS 溶解至发酵液中,导致 EPS 在糖消耗殆尽进一步提高。因此,基于 EPS 中多糖和蛋白的作用和 DSE 不同培养时间产量不同,可以设置不同的培养时间得到的 EPS 以应对不同情况下的矿山生态修复。

#### 3.2 EPS 对于矿山生态修复中的应用

微生物合成的 EPS 具有多种功能。在土壤方面,土壤团聚体的形成维持了农业生产力和环境质量<sup>[27–28]</sup>。由于 EPS 溶于水后具有黏性,被称作瞬时胶结剂<sup>[29]</sup>,其对于干旱-半干旱地区土壤团聚体的形成具有重要作用<sup>[30]</sup>。Raliya 等<sup>[4]</sup>将 EPS 应用于沙土中,使土壤团聚体提高 82%,

水分保持提高 10.7%–14.2%。本研究发现 DSE 产生的 EPS 也具有吸收空气水分的作用,并且胞外多糖相对含量越高,其吸水能力越强。这表明 DSE 在生态修复中除了可以产生脂类、氨基酸及有机酸类、多肽类等促进植物生长的物质外,还可以产生促进土壤团聚体形成的物质,进一步探究 DSE 对生态修复的机理。

在植物生长方面,植物受干旱或其他胁迫影响产生大量的氧自由基,如超氧自由基阴离子( $O_2^{\cdot-}$ )和羟自由基( $\cdot OH$ ),可以与细胞膜不饱和脂肪酸发生过氧化反应,导致植物细胞膜受损。而 EPS 清除氧自由基的作用机制主要有两方面。一方面, EPS 分子中的亲电子基团(醛基和酮基)促使氢键解离,进而稳定超氧化物阴离子,缓解氧化应激反应<sup>[31-32]</sup>。另一方面, EPS 可以螯合亚铁和铜等离子来抑制自由基的产生<sup>[33]</sup>,其中 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-COOH$ 、 $-PO_3H_2$ 、 $-C=O$ 、 $-NR_2$ 、 $-S-$ 和 $-O-$ 的结构有利于其螯合金属离子<sup>[34]</sup>。Hao 等<sup>[8]</sup>发现, EPS 可以作为抗氧化剂,清除部分自由基。这与本文的结果相一致。随着 DSE 合成的 EPS 浓度逐渐升高,其对氧自由基的清除速率呈逐渐升高的趋势。培养时间的改变并未引起 EPS 种类发生变化,而不同培养时间的 EPS 清除速率出现差异,这可能是在不同培养时间下 EPS 中胞外多糖的含量及官能团的相对丰度发生了改变。

在微生物方面, EPS 可以促进细胞黏附<sup>[35]</sup>、参与细胞间的信号传递,在细胞外围形成一层保护膜,提高微生物的耐胁迫能力<sup>[36-37]</sup>。另外, EPS 可以作为碳储备,其可以改善土壤的微生物多样性<sup>[38]</sup>。因此,基于 EPS 的保水和清除氧自由基的作用背景下,可用于干旱地区土地复垦与土壤改良,对于矿山生态修复应用具有重要的意义。

## 4 结论

通过对 DSE 不同培养时间下生长和 EPS 合

成情况的分析,相比于其他时间,第 12 天的胞外多糖含量较高。在第 12 天后残糖含量处于较低水平, EPS 合成速率减慢,胞外多糖不再发生显著的变化,蛋白含量显著提高。傅里叶红外光谱分析结果表明,培养时间的变化并未引起 EPS 的组分发生改变。但扫描电子显微镜和粒径分析结果表明,随着培养时间的增加, EPS 的结构逐渐发生改变,当培养至生长后期,发酵液中残糖含量较低, DSE 将部分 EPS 分解,导致 EPS 分子粒径小于  $5\ \mu m$  占比提高。另外, DSE 生长过程中合成的 EPS 均具有清除氧自由基和吸水能力,并受 EPS 组分相对丰度变化的影响。因此,第 12 天为提取胞外多糖含量相对较高的 EPS 最佳时机,第 24 天为提取蛋白含量相对较高的 EPS 最佳时机,这为 EPS 在环境复杂的矿山生态中应用奠定了基础。

## 参考文献

- [1] 谢淑仪, 陈姗姗, 栾天罡. 电活性微生物胞外聚合物的特征与应用[J]. 微生物学报, 2023, 63(2): 540-552. XIE SY, CHEN SS, LUAN TG. Characteristics and applications of extracellular polymeric substances of electroactive microorganisms[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(2): 540-552 (in Chinese).
- [2] CHENU C. Extracellular polysaccharides: an interface between microorganisms and soil constituents[J]. *Natural and Anthropogenic Organics*, 1995, 217-234.
- [3] WANG XQ, SHARP CE, JONES GM, GRASBY SE, BRADY AL, DUNFIELD PF. Stable-isotope probing identifies uncultured planctomycetes as primary degraders of a complex heteropolysaccharide in soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(14): 4607-4615.
- [4] RALIYA R, TARAFDAR JC, MAHAWAR H, KUMAR R, GUPTA P, MATHUR T, KAUL RK, PRAVEEN-KUMAR, KALIA A, GAUTAM R, SINGH SK, GEHLOT HS. ZnO nanoparticles induced exopolysaccharide production by *B. subtilis* strain JCT1 for arid soil applications[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014, 65: 362-368.

- [5] Sun L, YANG Y, WANG R, LI S, QIU Y, LEI P, GAO J, XU H, ZHANG F, LV Y. Effects of exopolysaccharide derived from *Pantoea alhagi* NX-11 on drought resistance of rice and its efficient fermentation preparation[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 162: 946-955.
- [6] PARIKH A, MADAMWAR D. Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria[J]. Bioresource Technology, 2006, 97(15): 1822-1827.
- [7] XIE LM, XIE JH, CHEN XX, TAO X, XIE JY, SHI XY, HUANG Z. Comparative transcriptome analysis of *Monascus purpureus* at different fermentation times revealed candidate genes involved in exopolysaccharide biosynthesis[J]. Food Research International, 2022, 160: 111700.
- [8] HAO LJ, LIU WL, LIU K, SHAN K, WANG CL, XI CX, LIU JB, FAN QP, ZHANG XF, LU XP, XU YR, CAO RW, MA YH, ZHENG L, CUI B. Isolation, optimization of fermentation conditions, and characterization of an exopolysaccharide from *Pseudoalteromonas agarivorans* Hao 2018[J]. Marine Drugs, 2019, 17(12): 703.
- [9] LI QY, LEI YG, HU GY, LEI YZ, DAN DM. Effects of Tween 80 on the liquid fermentation of *Lentinus edodes*[J]. Food Science and Biotechnology, 2018, 27(4): 1103-1109.
- [10] NEWSHAM KK, UPSON R, READ DJ. Mycorrhizas and dark septate root endophytes in polar regions[J]. Fungal Ecology, 2009, 2(1): 10-20.
- [11] LI X, HE XL, ZHOU Y, HOU YT, ZUO YL. Effects of dark septate endophytes on the performance of *Hedysarum scoparium* under water deficit stress[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 903.
- [12] TIENAHO J, KARONEN M, MUILU-MÄKELÄ R, KASEVA J, de PEDRO N, VICENTE F, GENILLOUD O, AAPOLA U, UUSITALO H, VUOLTEENAHO K, FRANZÉN R, WÄHÄLÄ K, KARP M, SANTALA V, SARJALA T. Bioactive properties of the aqueous extracts of endophytic fungi associated with scots pine (*Pinus sylvestris*) roots[J]. Planta Medica, 2020, 86(13-14): 1009-1024.
- [13] WANG SH, BI YL, QUAN WZ, CHRISTIE P. Growth and metabolism of dark septate endophytes and their stimulatory effects on plant growth[J]. Fungal Biology, 2022, 126(10): 674-686.
- [14] CHENG C, SHANG-GUAN WL, HE LY, SHENG XF. Effect of exopolysaccharide-producing bacteria on water-stable macro-aggregate formation in soil[J]. Geomicrobiology Journal, 2020, 37(8): 738-745.
- [15] SHENG L, ZHU GL, TONG QY. Comparative proteomic analysis of *Aureobasidium pullulans* in the presence of high and low levels of nitrogen source[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(43): 10529-10534.
- [16] LI P, LIN WF, LIU X, WANG XW, LUO LX. Environmental factors affecting microbiota dynamics during traditional solid-state fermentation of Chinese Daqu starter[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1237.
- [17] LIU CB, PAN F, LI Y. A combined approach of generalized additive model and bootstrap with small sample sets for fault diagnosis in fermentation process of glutamate[J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1): 132.
- [18] 白雪蕊, 聂麦茜, 谢铮胜, 宋勃轩, 聂红云. 共存碳源对克雷伯氏菌 NIII2 发酵蔗糖产絮凝剂的影响[J]. 工业微生物, 2016, 46(6): 41-46.
- BAI XR, NIE MQ, XIE ZS, SONG BX, NIE HY. Effects of co-carbon source compounds on production of bioflocculant by *Klebsiella* sp. NIII2 with sucrose[J]. Industrial Microbiology, 2016, 46(6): 41-46 (in Chinese).
- [19] CHEN QQ, CHEN JC, DU HT, LI Q, CHEN J, ZHANG GC, LIU H, WANG JR. Structural characterization and antioxidant activities of polysaccharides extracted from the pulp of *Elaeagnus angustifolia* L.[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(7): 11446-11455.
- [20] MARKLUND S, MARKLUND G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase[J]. European Journal of Biochemistry, 1974, 47(3): 469-474.
- [21] 梁云, 王洪新. 几种天然抗氧化剂清除自由基能力的比较研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(6): 2181-2183.
- LIANG Y, WANG HX. Comparative study on the abilities of scavenging free radical of some natural antioxidants[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36(6): 2181-2183 (in Chinese).
- [22] SHENG L, TANG GY, SU P, ZHANG JL, XIAO Q, TONG QY, MA MH. Understanding the influence of Tween 80 on pullulan fermentation by *Aureobasidium pullulans* CGMCC 1234[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 136: 1332-1337.

- [23] ZHANG H, LI CC, LAI PFH, CHEN JS, XIE F, XIA YJ, AI LZ. Fractionation, chemical characterization and immunostimulatory activity of  $\beta$ -glucan and galactoglucan from *Russula vinosa* Lindblad[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 256: 117559.
- [24] MOHITE BV, KOLI SH, RAJPUT JD, PATIL VS, AGARWAL T, PATIL SV. Production and characterization of multifacet exopolysaccharide from an agricultural isolate, *Bacillus subtilis*[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2019, 66(6): 1010-1023.
- [25] HU JF, YANG L, YANG P, JIANG SH, LIU XH, LI YW. Polydopamine free radical scavengers[J]. *Biomaterials Science*, 2020, 8(18): 4940-4950.
- [26] YANG XB, YANG YY, ZHANG YF, HE JH, XIE YZ. Enhanced exopolysaccharide production in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* by Tween 80 supplementation[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2021, 44(1): 47-56.
- [27] PICCOLO A, MBAGWU JSC. Role of hydrophobic components of soil organic matter in soil aggregate stability[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1999, 63(6): 1801-1810.
- [28] 母锐敏, 王曦晗, 马桂霞, 祁峰, 孟倩雅. 藻类胞外聚合物的产生因素及其在污水处理和生物絮凝方面的应用[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(3): 1324-1336.  
MU RM, WANG XH, MA GX, QI F, MENG QY. Factors influencing the production of algal extracellular polymers and their application in wastewater treatment and biological flocculation[J]. *Microbiology China*, 2023, 50(3): 1324-1336 (in Chinese).
- [29] COSTA OYA, RAAIJMAKERS JM, KURAMAE EE. Microbial extracellular polymeric substances: ecological function and impact on soil aggregation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1636.
- [30] HENAO LJ, MAZEAU K. Molecular modelling studies of clay-exopolysaccharide complexes: soil aggregation and water retention phenomena[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2009, 29(8): 2326-2332.
- [31] CHENG ZY, ZHANG YW, SONG HY, ZHOU HL, ZHONG FL, HU HB, FENG Y. Extraction optimization, characterization and antioxidant activity of polysaccharide from *Gentiana scabra* bge[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 93: 369-380.
- [32] XIAO LY, HAN S, ZHOU JZ, XU Q, DONG MS, FAN X, RUI X, CHEN XH, ZHANG QQ, LI W. Preparation, characterization and antioxidant activities of derivatives of exopolysaccharide from *Lactobacillus helveticus* MB2-1[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 145: 1008-1017.
- [33] WANG JQ, HU SZ, NIE SP, YU Q, XIE MY. Reviews on mechanisms of *in vitro* antioxidant activity of polysaccharides[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 2016: 5692852.
- [34] GÜLÇİN İ. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine[J]. *Life Sciences*, 2006, 78(8): 803-811.
- [35] GUHRA T, STOLZE K, TOTSCHKE KU. Pathways of biogenically excreted organic matter into soil aggregates[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2022, 164: 108483.
- [36] FLEMMING HC, WINGENDER J, SZEWZYK U, STEINBERG P, RICE SA, KJELLEBERG S. Biofilms: an emergent form of bacterial life[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(9): 563-575.
- [37] FREY SD. Mycorrhizal fungi as mediators of soil organic matter dynamics[J]. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 2019, 50: 237-259.
- [38] COSTA O, PIJL A, KURAMAE EE. Dynamics of active potential bacterial and fungal interactions in the assimilation of acidobacterial EPS in soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2020, 148: 107916.