

硅藻粘附性 EPS 提取方法的比较研究

于兆伟¹, 谢雅清¹, 张珮璇¹, 鲍金¹, 孙陈炼¹, 靳翠丽^{1,2}, 周晓见^{1,2}

(1. 扬州大学环境科学与工程学院, 江苏 扬州 225127; 2. 扬州大学海洋科学与技术研究所, 江苏 扬州 225127)

摘要:底栖硅藻是可见光能照射到的水下表面生物膜中的主要污损生物,胞外多聚物(Extracellular Polymeric Substances, EPS)是硅藻生物膜形成和发育过程中的关键物质,可溶性EPS和粘附性EPS的提取方法不同,对粘附性EPS的分离提取仍没有统一的方法。本研究选用了4种方法提取底栖硅藻(*Amphora* sp.)粘附性EPS:30℃水浴处理、70℃水浴处理、福尔马林-NaOH处理和阳离子交换树脂处理,研究了不同分离方法条件下,*Amphora* sp.粘附性EPS中各主要成分的提取量。结果表明,粘附性EPS中各主要成分普遍受提取方法的影响,其中DNA含量变化幅度最大,其次是蛋白质、总糖和糖醛酸含量,硫酸基含量受提取方法的影响最小。低温水浴处理提取效率低,高温水浴处理可能影响EPS的后续分析,阳离子交换树脂提取粘附性EPS的效果较好,但对细胞的破坏最严重,福尔马林-NaOH处理提取的EPS总量最高,提取总糖、糖醛酸的效果最好,而且没有造成严重的细胞破裂。因此福尔马林-NaOH处理是相对均衡和高效的提取硅藻粘附性EPS的方法。

关键词:海洋生物学;硅藻;粘附性EPS;提取;福尔马林-NaOH处理

DOI: 10.3969/J. ISSN. 2095-4972. 2019. 04. 015

中图分类号:P735

文献标识码:B

文章编号:2095-4972(2019)04-0592-08

海洋生物污损(biofouling)指的是在海水浸泡中的无特殊保护的船底、码头、浮标和各类水下人工设施的表面上常常发生大量海洋生物聚集的现象^[1]。生物污损在海洋运输、军事安全、海洋水产养殖、近岸海洋资源利用、海洋科学研究与海洋工程等方面危害严重,每年在全球范围内由海洋生物污损造成的经济损失高达200亿美元^[2]。生物污损不仅包括大型藻类和海洋无脊椎动物如藤壶(*Amphibalanus amphitrite*)、贻贝(*Mytilus edulis*)等造成的污损,还包括由细菌和硅藻形成的生物膜^[3]。生物膜除了造成设备孔道堵塞、表面粗糙、金属腐蚀等问题,还为后续的污损生物附着提供支撑,影响大型污损生物的附着和后续生长,最终导致复杂的污损生物群落的形成^[4-5]。在水下可见光照射范围内,硅藻是生物膜的主体。与细菌相比,硅藻对水下表面的附着覆盖面更广泛,附着强度更大、更顽固^[6-8]。

硅藻附着离不开硅藻向细胞外大量分泌的胞外多聚物(Extracellular Polymeric Substances, EPS),EPS最主要的成分是糖和蛋白质。EPS直接影响生

物膜的形成过程、垂直结构以及稳定性等多个方面^[4]。按照与硅藻细胞结合的紧密程度,可将EPS分为两大类:可溶性EPS(Soluble EPS, SL-EPS)和粘附性EPS(Bound EPS, B-EPS)两部分^[9-11]。不同类的EPS成分组成也不尽相同,生理功能也有差异,因此往往对这两类EPS分别进行分离提取。溶解在水中的SL-EPS一般均可以通过高速离心分离藻细胞后获得,该分离提取方法在目前的研究中较为一致。而B-EPS是和藻细胞紧密粘附的,不能通过简单离心的方法获得,目前使用的分离方式多种多样,并没有形成统一的分离方法。目前使用的分离提取B-EPS的方法有物理方法和化学方法两大类^[12]。前者主要有超声提取法、热提取法、阳离子交换树脂法、超声-阳离子交换树脂法等;后者主要有硫酸提取法、氢氧化钠提取法、福尔马林-NaOH提取法、EDTA法和戊二醛法等。本研究选取了其中几种分离提取效率较高的方法,提取典型污损硅藻双眉藻(*Amphora* sp.)的EPS,比较EPS主要成分的提取量和EPS总量,为硅藻EPS的相关研究提供

收稿日期:2018-11-26

基金项目:国家自然科学基金资助项目(41776156,41271521);扬州大学大学生科技创新资助项目(x20180466)

作者简介:于兆伟(1994—),男,硕士研究生;E-mail: 1648834112@qq.com

通讯作者:周晓见(1976—),男,博士,教授;E-mail: zhouxiaojian@yzu.edu.cn

合适的分离提取方法。

1 材料与方法

1.1 实验藻种与培养

实验所研究的硅藻双眉藻 (*Amphora* sp.) 由扬州大学海洋科学与技术研究所提供。

使用含硅的 f/2 培养液培养双眉藻,按 100 cm^3 培养液接种 10 cm^3 藻液的比例接种,细胞初始密度为 $7.1 \times 10^4\text{ cells/cm}^3$ 。FHI-2010HT 型光照培养箱中培养,温度为 $23 \pm 2^\circ\text{C}$,光照强度 $5\ 000\text{ lx}$,光暗比 12 h: 12 h 条件下,培养 21 d 得到密度为 $8.11 \times 10^5\text{ cells/cm}^3$ 的藻液。培养结束,将藻液彻底混匀后形成悬浊液。

1.2 EPS 提取方法

1.2.1 离心处理提取 SL-EPS 在无菌操作台中,在离心管中加入 10 cm^3 混匀后的藻液。将藻液在 $4\ 000\text{ r/min}$ 离心 10 min ,收集上清液,即得到 SL-EPS。每组处理设置 3 个平行。所有提取得到的样品置于 -20°C 冰箱内待测。

对离心得到的藻细胞沉淀分别用 4 种方法进行处理,以提取 B-EPS。并且在各 B-EPS 处理过程中,均使 B-EPS 提取液的体积等于原始藻液体积。

1.2.2 30°C 水浴处理提取 B-EPS 向藻细胞沉淀加入 10 cm^3 纯水,充分混匀, 30°C 下水浴 1 h。冷却至室温再在 $4\ 000\text{ r/min}$ 离心 15 min ,收集上清液,即得到 B-EPS^[12]。

1.2.3 70°C 水浴处理提取 B-EPS 向藻细胞沉淀加入 10 cm^3 磷酸盐缓冲液 (0.1 mmol/cm^3 , $\text{pH} = 7.5$)。室温下静置 20 min , 70°C 水浴 1 h。冷却至室温,再在 $4\ 000\text{ r/min}$ 离心 15 min ,收集上清液,即得到 B-EPS^[13]。

1.2.4 福尔马林-NaOH 处理提取 B-EPS 向藻细胞沉淀加入 0.05% 的 NaCl 溶液 10 cm^3 ,充分摇匀后静置 5 min ,再加入 37% 的福尔马林 0.06 cm^3 ,室温下用恒温磁力搅拌器搅拌 (转速 900 r/min) 1 h,再加入 1 mmol/cm^3 NaOH 溶液 4 cm^3 ,继续搅拌 (转速 900 r/min) 3 h。在 $4\ 000\text{ r/min}$ 离心 15 min ,收集上清液,即得到 B-EPS^[14]。

1.2.5 阳离子交换树脂处理提取 B-EPS 向藻细胞沉淀加入 10 cm^3 含有 $2\text{ nmol/cm}^3\text{ Na}_3\text{PO}_4$ 、 $4\text{ mmol/cm}^3\text{ NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $9\text{ nmol/cm}^3\text{ NaCl}$ 、 $1\text{ nmol/cm}^3\text{ KCl}$ 的缓冲溶液 (pH 为 7.0),静置 20 min 。按照树脂:藻沉淀为 70:1 (质量比) 加入阳离子交换树脂。在恒温磁力搅拌器上搅拌 16 h (转速 900 r/min),抽滤 (滤膜孔径为 $0.45\ \mu\text{m}$) 去除阳离子交换树脂和

藻细胞,收集滤液即得到 B-EPS^[14]。

1.3 EPS 中各成分含量测定方法

采用考马斯亮蓝染色法测量样品中的蛋白质含量^[15],硫酸-苯酚法测量总糖含量^[16],硫酸钡比浊法测量硫酸基含量^[17],硫酸-咔唑法测量糖醛酸含量^[18]。DNA 含量使用 NANODROP 2000 超微量紫外分光光度计检测获得。将测得的蛋白质、总糖、硫酸基、糖醛酸和 DNA 的总和作为提取得到的 EPS 总量。

各成分和 EPS 浓度均按照原始藻液体积进行浓度换算。

1.4 数据处理

本实验每组处理均设置 3 个平行,所获得的数据采用 IBM SPSS 22.0 软件分析。对于方差分析显著性的因素,利用 Dunnett's T3 进行多重比较,各分析指标差异显著性以 $p = 0.05$ 或 0.01 为标准。

2 结果与讨论

2.1 水溶性 SL-EPS 的组成成分

如表 1 所示,提取获得的水溶性 SL-EPS 溶液中,不仅含有 0.208 mg/cm^3 蛋白质、 0.115 mg/cm^3 总糖,而且含有的硫酸基也非常丰富,达到 0.266 mg/cm^3 。此外还含有糖醛酸和少量 DNA,含量分别为 0.046 mg/cm^3 和 0.009 mg/cm^3 。从占比上看,SL-EPS 中硫酸基含量丰富,达到了 41.3%;其次是蛋白质,占比为 32.3%;总糖占比为 17.9%;糖醛酸占比为 7.1%;还含有极少量的 DNA。

表 1 双眉藻 SL-EPS 中各成分的含量

Tab. 1 Contents of each components in SL-EPS from *Amphora* sp. cells

成分	含量/($\text{mg} \cdot \text{cm}^{-3}$)	质量占比/%
蛋白质	0.208 ± 0.012	32.3
总糖	0.115 ± 0.005	17.9
硫酸基	0.266 ± 0.002	41.3
糖醛酸	0.046 ± 0.000	7.1
DNA	0.009 ± 0.001	1.4

2.2 不同处理方法对提取 B-EPS 中蛋白质含量的影响

对双眉藻的 B-EPS 进行 4 种不同的处理,提取得到 B-EPS 中的蛋白质含量如图 1 所示 (图中大写字母代表显著性 $p \leq 0.01$,小写字母代表显著性 $p \leq 0.05$ ^[19])。其中 70°C 水浴处理效率最高,提取到的蛋白质含量达到了 0.044 mg/cm^3 ;阳离子交换树脂

处理其次,提取到的蛋白质含量为 0.035 mg/cm^3 ; 福尔马林-NaOH 处理提取到的蛋白质较少,含量为 0.023 mg/cm^3 ; 30°C 水浴处理提取效率最低,远低

于其它 3 组,蛋白质含量仅为 0.008 mg/cm^3 ,不足 70°C 水浴处理的 1/5。不同处理提取到的蛋白质的含量存在极显著差异。

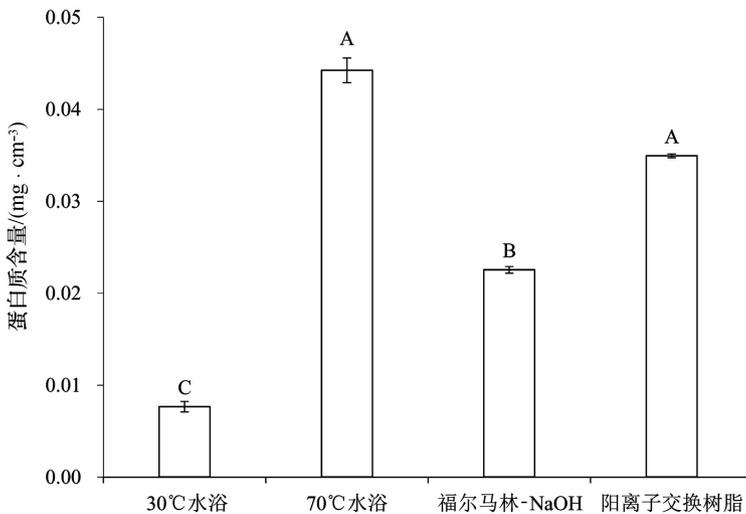


图 1 不同处理方法提取的双眉藻 B-EPS 中蛋白质含量

Fig. 1 Protein contents in B-EPS extracted from *Amphora* sp. cells by different treatments

图中大写字母代表显著性 $p \leq 0.01$,小写字母代表显著性 $p \leq 0.05$;下同。

2.3 不同处理方法对提取 B-EPS 中总糖含量的影响

从图 2 可以看到,福尔马林-NaOH 处理提取到的总糖含量最高,为 0.170 mg/cm^3 ,显著高于其它方法; 70°C 水浴处理和阳离子交换树脂处理区别不大,提取

总糖的含量都低于福尔马林-NaOH 处理。提取总糖效率最低的为 30°C 水浴处理,含量为 0.019 mg/cm^3 ,是福尔马林-NaOH 处理提取量的 1/10 左右,也显著低于 70°C 水浴处理和阳离子交换树脂处理。

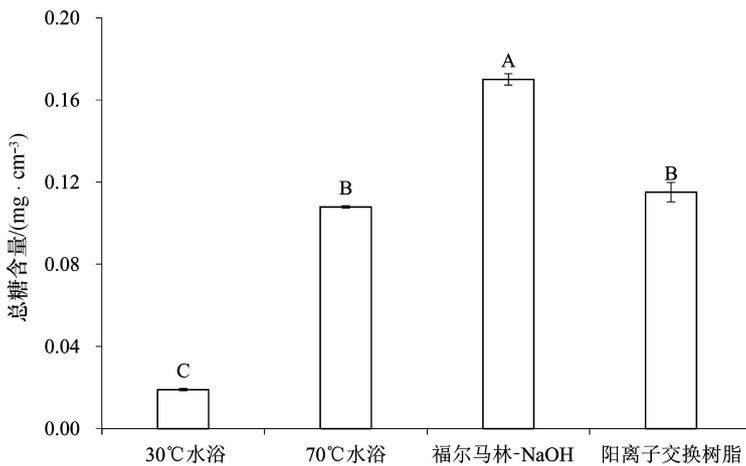


图 2 不同处理方法提取的双眉藻 B-EPS 中总糖含量

Fig. 2 Total sugar contents in B-EPS extracted from *Amphora* sp. cells by different treatments

2.4 不同处理方法对提取 B-EPS 中硫酸基含量的影响

不同处理方法对硫酸基的提取量也有一些影响(图 3),阳离子交换树脂处理的提取效率比其它方法略低,获得的硫酸基浓度为 0.228 mg/cm^3 。 30°C 水浴处理提取到的硫酸基的含量最高,为 0.386

mg/cm^3 ,是阳离子交换树脂处理的 1.7 倍。 70°C 水浴、福尔马林-NaOH 处理的硫酸基含量与 30°C 水浴处理差别不大。

2.5 不同处理方法对提取 B-EPS 中糖醛酸的影响

从图 4 中可以发现,4 种方法中最适合提取糖醛酸的是福尔马林-NaOH 处理,得到的糖醛酸的含

量为 0.138 mg/cm^3 , 显著高于其它 3 组。30℃ 水浴处理提取的糖醛酸最少, 为 0.009 mg/cm^3 , 只是福尔马林-NaOH 处理的 1/15。70℃ 水浴与阳离子交

换树脂处理提取效率也不高, 提取的糖醛酸浓度相似, 分别为 0.018 mg/cm^3 和 0.021 mg/cm^3 。

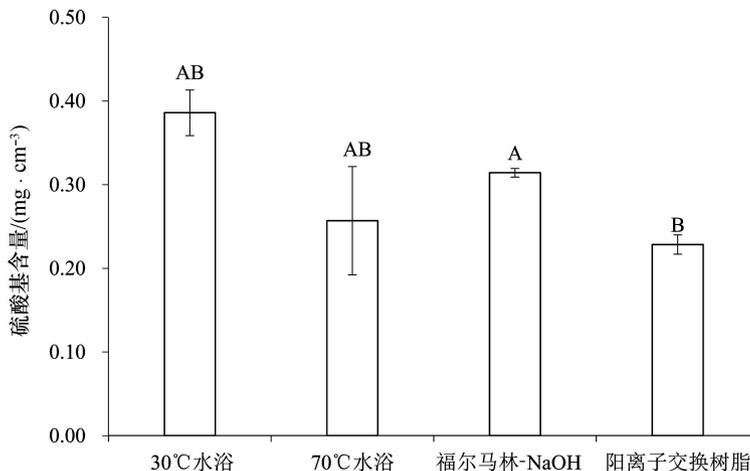


图 3 不同处理方法提取的双眉藻 B-EPS 中硫酸基含量

Fig. 3 Sulfate contents in B-EPS extracted from *Amphora* sp. cells by different treatments

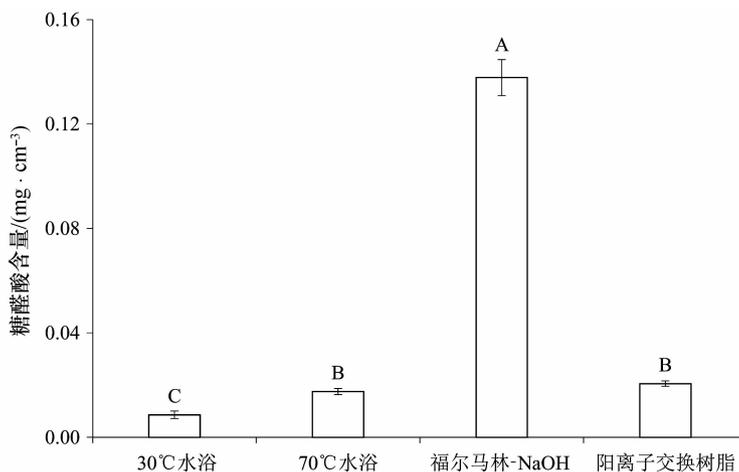


图 4 不同处理方法提取的双眉藻 B-EPS 中糖醛酸含量

Fig. 4 Uronic acid contents in B-EPS extracted from *Amphora* sp. cells by different treatments

2.6 不同处理方法对提取 B-EPS 中 DNA 含量的影响

从图 5 可以看出, 使用阳离子交换树脂提取得到的 DNA 含量远远超出其它 3 组, 达到了 0.132 mg/cm^3 , 而 30℃ 水浴处理提取到的 DNA 含量最低, 只有 0.001 mg/cm^3 , 是阳离子交换树脂处理的 1/132。70℃ 水浴处理与福尔马林-NaOH 处理得到的 DNA 含量也不高, 分别为 0.004 mg/cm^3 和 0.003 mg/cm^3 。

2.7 不同处理方法对提取 B-EPS 总量的影响

从 4 种方法提取到的 B-EPS 总量来看 (图 6), 福尔马林-NaOH 处理得到 B-EPS 总量最多, 达到

0.647 mg/cm^3 , 优于阳离子交换树脂法, 30℃ 和 70℃ 水浴的处理方法得到的 B-EPS 总量区别不大。

2.8 讨论

硅藻双眉藻 (*Amphora* sp.) 的 EPS 可分为水溶性 SL-EPS 和粘附性 B-EPS 两部分。SL-EPS 中硫酸基含量最丰富, 其次是蛋白质、总糖以及糖醛酸, 还含有少量的 DNA。粘附性 B-EPS 中同样含有上述各成分, 总体上看各成分含量按从高到低的顺序依次为: 硫酸基、总糖、蛋白质、糖醛酸以及少量 DNA。不同的提取方法对于 B-EPS 中各成分的提取效率总体上差异显著。各成分提取效率普遍受提取方法的影响, 其中 DNA 含量变化幅度最大, 如阳离子交

换树脂处理使 DNA 含量剧增达数百倍,提示此方法可能造成了严重的细胞破裂,使细胞核的 DNA 渗漏到胞外造成 DNA 含量严重偏高。不论 SL-EPS 和各方法提取的 B-EPS 中均出现一定量的 DNA,说明

EPS 提取物中存在少量 DNA 属于正常现象,但过高 DNA 含量则说明胞内物质的渗漏溶出^[12-14]。蛋白质、总糖和糖醛酸含量由于提取方法的不同,会有 5~10 倍的差别,硫酸基含量也出现了翻倍的情况。

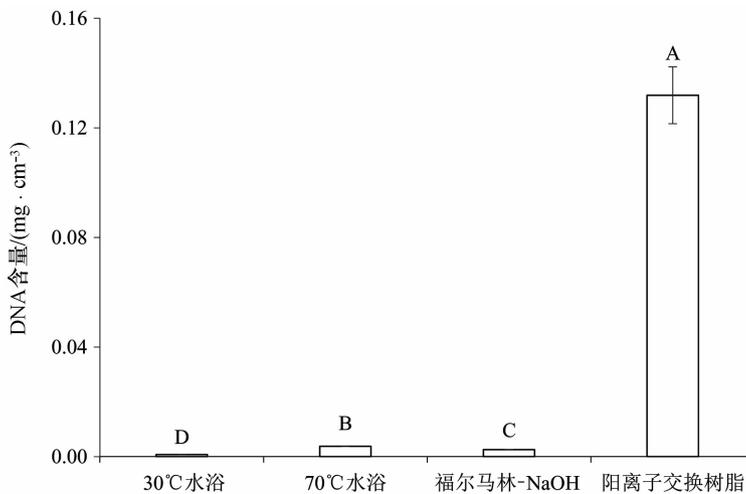


图 5 不同处理方法提取的双眉藻 B-EPS 中 DNA 含量

Fig. 5 DNA contents in B-EPS extracted from *Amphora* sp. cells by different treatments

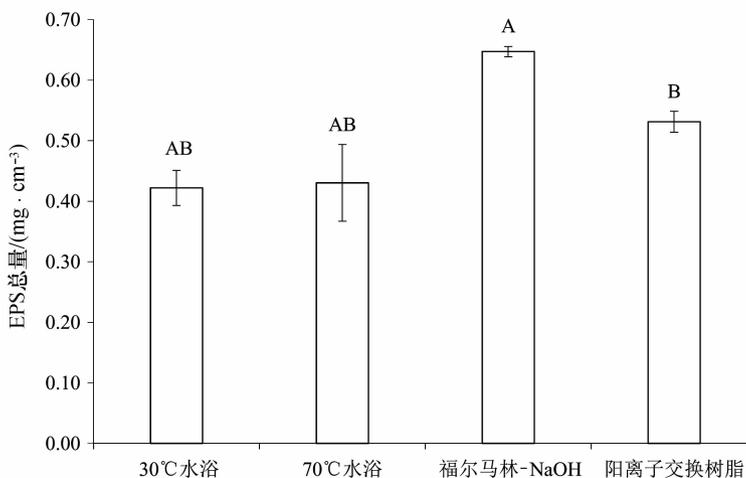


图 6 不同处理方法提取的双眉藻 B-EPS 的总量

Fig. 6 Total amount of B-EPS extracted from *Amphora* sp. cells by different treatments

采用物理方法分离 B-EPS 的测试中,热处理和阳离子交换树脂这两种方法用的比较多。其中,热处理方法通过提升体系的温度,提高了 B-EPS 各成分在水中的溶解度,并通过后续的高速离心处理,进一步增加 B-EPS 在水中的溶解度,从而达到分离 B-EPS 的目的^[20]。因此,B-EPS 的提取效率与温度密切相关。当温度较低时,B-EPS 的分离效率十分有限,因此 30°C 处理提取的 B-EPS 各成分普遍低于其他方法提取的对应成分,以蛋白质为例,30°C 水浴提取到蛋白质浓度为 0.008 mg/cm³,不足最高组 0.044 mg/cm³ 的 1/5;30°C 水浴提取到的总糖浓度

为 0.019 mg/cm³,只占最高组 0.170 mg/cm³ 的 1/10 左右;而在温度过高时,有可能导致蛋白质、核酸以及酶的变性,会对 B-EPS 成分的进一步分析造成不利影响,是需要注意的问题^[21]。另外,由于长时间的热处理还可能带来胞内物质的溶出,目前热处理的方法大多采用较短时间(如 1 h)的加热溶解^[12-13]。实际上,B-EPS 的提取效率应可能是处理温度和处理时间共同作用的效果,但关于处理时间方面的研究尚未有深入的报道。

EPS 能与许多金属离子(例如 Ca²⁺、Mg²⁺ 等)螯合形成单价、双价、多价阳离子与 EPS 阴离子相结

合的复合物。多价阳离子通过静电交联作用,维持 EPS 中总糖和蛋白质之间链接的稳定性,而阳离子交换树脂在溶液中可解离出氢离子(H^+),与溶液中的金属离子或其他阳离子基团发生相互交换作用,具有去除二价阳离子的功能,使得加入阳离子交换树脂的体系中 EPS 的基质变得不稳定,导致 EPS 更容易从细胞膜上剥离^[22]。另外,通过调节磁力搅拌器的转速使水流产生紊流运动,流体质点的不规则运动产生剪切力。这些因素都有助于 EPS 从藻细胞表面的剥离^[22-23]。本研究中阳离子交换树脂的使用量为 70 g/1 g(树脂重量/藻沉淀重量),恒温磁力搅拌器转速为 900 r/min,提取时间为 16h。此方法提取到的 EPS 总量居于第 2 位,其中蛋白质 0.035 mg/cm³,按浓度由高到低排第 2 位;提取到总糖浓度为 0.115 mg/cm³,按浓度由高到低排第 2 位,但是对于硫酸基和糖醛酸的提取效果不佳,提取到硫酸基 0.229 mg/cm³,浓度是 4 种方法中最低的;提取到糖醛酸浓度为 0.021 mg/cm³,远低于浓度最高组的 0.138 mg/cm³,而且细胞破碎的情况比较严重,DNA 含量剧增。同时,DNA 含量的剧增也提示在此 B-EPS 提取条件下,其它胞内物质也存在渗漏至 B-EPS 提取物中的可能,干扰后续 EPS 相关研究结果。实际上,阳离子交换树脂的提取效果受多种因素的影响,提取效率以及细胞的破裂程度受树脂的提取时间以及使用量的影响,还受水流剪切力(搅拌器转速、溶液深度、转子及容器大小等)的影响。树脂用量低,提取效率不高,使用量过高则可能会对细胞造成严重影响;提取时间过长有可能造成严重的细胞破碎;水流剪切力越大,EPS 从细胞剥离越彻底但是细胞破碎也越严重^[24-25]。因此阳离子交换树脂法提取 B-EPS 时的条件应包括树脂使

用量、提取时间、提取搅拌情况等,仍需要更多的实验进行探索、确定。

化学方法中采用的是福尔马林-NaOH 处理,福尔马林通过和蛋白质中的胺基、羟基等基团及细胞膜中的核酸相互作用来固定细胞,从而达到抑制细胞消解的作用,以减少对分离 B-EPS 产生的干扰。EPS 含有的羟基、羧基等多种有机官能团在溶液中呈负电荷性,添加适量的 NaOH,提高了 B-EPS 内酸性基团的解离,增强了本身带负电的 EPS 之间的排斥,并增加了 B-EPS 在水中的溶解度,从而提高 B-EPS 的分离效率^[26]。本研究中,福尔马林-NaOH 处理取得了良好的提取效果,提取到的 EPS 总量最高,其中提取到的总糖和糖醛酸浓度最高;硫酸基排在第 2 位;但提取蛋白质的效率不是最高;从 DNA 的含量上看,福尔马林-NaOH 处理方法并没有造成严重的细胞破裂。

3 结论

EPS 提取方法的不同对于 EPS 各成分的提取效率会造成严重影响^[14]。对文献中提取效果较好的 4 种 B-EPS 提取方法进行比较。综合 4 种方法提取硅藻 B-EPS 的效果来看,阳离子交换树脂容易导致严重的细胞破坏;低温水浴处理的 EPS 提取方法效率太低;较高的温度水浴处理可能会导致蛋白质、核酸和酶等物质的变性,不利于 EPS 成分的后续分析;福尔马林-NaOH 的处理方法提取效果良好,且不会造成严重的细胞破裂。比较这 4 种文献报道的 EPS 提取方法,为研究硅藻 EPS 时提供参考。就典型污损硅藻 *Amphora* sp. 而言,福尔马林-NaOH 处理的方法是一种相对均衡和高效的硅藻细胞 B-EPS 的提取方法。

参考文献:

- [1] TOWNSIN R L. The ship hull fouling penalty[J]. Biofouling, 2003, 19: 9-15.
- [2] HERTIANI T, EDRADEBEL R, ORTLEPP S, et al. From anti-fouling to biofilm inhibition[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2010, 18:1 297-1 311.
- [3] KRISTENSEN J B, MEYER R L, LAURSEN B S, et al. Antifouling enzymes and the biochemistry of marine settlement[J]. Biotechnology Advances, 2008, 26(5): 471-481.
- [4] HOAGLAND K D, ROSOWSKI J R, GRETZ M R, et al. Diatom extracellular polymeric substances: function, fine structure, chemistry, and physiology[J]. Journal of Phycology, 1993, 29: 537-566.
- [5] PATRO S, ADHAVAN D, JHA S. Fouling diatoms of Andaman waters and their inhibition by spinal extracts of the sea urchin *Diadema setosum* (Leske, 1778)[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2012, 75: 23-27.
- [6] LEFLAIVE J, TEN-HAGE L. Effects of 2E,4E-decadienal on motility and aggregation of diatoms and on biofilm formation[J]. Microbial Ecology, 2011, 61(2): 363-373.
- [7] SEKAR R, VENUGOPALAN V P, SATPATHY K K, et al. Laboratory studies on adhesion of microalgae to hard substrates[J]. Hydrobiologia, 2004, 512: 109-116.

- [8] 李燕, 高亚辉, 杨金莹, 等. 海洋污损硅藻附着强度的定量测定[J]. 海洋环境科学, 2010, 29(1): 127-130.
- [9] PHILIPPIS R D, MARGHERI M C, MATERASSI R, et al. Potential of unicellular cyanobacteria from saline environments as exopolysaccharide producers[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1998, 64(3): 1 130-1 132.
- [10] GLOAGUEN V, MORVAN H, HOFFMANN L, et al. Capsular polysaccharide produced by the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*[J]. FEBS Journal, 1999, 266(3): 762-770.
- [11] PEREIRA S, ZILLE A, MICHELETTI E, et al. Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2009, 33(5): 917-941.
- [12] TAKAHASHI E, GOUX D, ORVAIN F. Optimising extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from benthic diatoms: comparison of efficiency of six EPS extraction methods[J]. Marine & Freshwater Research, 2009, 60(12): 1 201-1 210.
- [13] CHU H, YU H, TAN X, et al. Extraction procedure optimization and the characteristics of dissolved extracellular organic matter (dEOM) and bound extracellular organic matter (bEOM) from *Chlorella pyrenoidosa*[J]. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2015, 125:238-246.
- [14] LEE B M, SHIN H S, HUR J. Comparison of the characteristics of extracellular polymeric substances for two different extraction methods and sludge formation conditions[J]. Chemosphere, 2013, 90(2): 237-244.
- [15] 闫景坤. 抗氧化新型冬虫夏草胞外多糖的制备、结构与溶液特征研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2010.
- [16] 冯学珍, 陈颖, 伍善广. 石莼多糖的单糖组成成分分析[J]. 食品工业科技, 2014, 35(7): 91-94.
- [17] 丛建波, 王长振, 李妍, 等. 褐藻硫酸多糖硫酸基含量测定-硫酸钡比浊法研究[J]. 解放军药学报, 2003, 19(3): 181-183.
- [18] 闫景坤, 李琳, 吴建勇. 人工培养冬虫夏草胞外多糖的分离纯化研究[J]. 现代食品科技, 2010, 26(4): 366-369.
- [19] 高忠江, 施树良, 李钰. SPSS 方差分析在生物统计的应用[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(11): 2 116-2 120.
- [20] MORGAN J W, FORSTER C F, EVISON L. A comparative study of the nature of biopolymers extracted from anaerobic and activated sludges[J]. Water Research, 1990, 24(6): 743-750.
- [21] 黄兴, 孙宝盛, 吕英. MBR 中活性污泥胞外聚合物的物理提取方法研究[J]. 中国给水排水, 2009, 25(5): 80-83.
- [22] 傅金祥, 由昆, 朱志锋, 等. 磁力搅拌/阳离子交换树脂法提取胞外聚合物的试验研究[J]. 沈阳建筑大学学报(自然科学版), 2007, 23(1): 101-104.
- [23] JACHLEWSKI S, JACHLEWSKI W D, LINNE U, et al. Isolation of extracellular polymeric substances from biofilms of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*[J]. Frontiers in Bioengineering & Biotechnology, 2015, 3: 123.
- [24] DURMAZ B, SANI F D. Effect of carbon to nitrogen ratio on the composition of microbial extracellular polymers in activated sludge[J]. Water Science & Technology, 2001, 44(10): 221-229.
- [25] 龙向宇, 龙腾锐, 唐然, 等. 阳离子交换树脂提取活性污泥胞外聚合物的研究[J]. 中国给水排水, 2008, 24(3): 29-33.
- [26] ZHANG Z, WU W, WANG J. Influence of formaldehyde and NaOH on the analysis of proteins and polysaccharides in sludge EPS[J]. Journal of Tsinghua University, 2009, 49(9): 1 534-1 537.

Comparison of extraction methods for diatom bound EPS

YU Zhao-wei¹, XIE Ya-qing¹, ZHANG Pei-xuan¹, BAO Jin¹, SUN Chen-lian¹,
JIN Cui-li^{1,2}, ZHOU Xiao-jian^{1,2}

(1. College of Environmental Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China;

2. Marine Science and Technology Institute, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China)

Abstract: Diatoms are the biofouling organisms that live on the underwater biofilm in the light reachable depth. The extracellular polymeric substances (EPS) is an important factor for diatoms adhering on the surfaces and plays crucial roles in biofilm formation and development. The methods to extract the soluble EPS and the bound EPS are different and no accredited extraction methods available for the bound EPS until now. In this study, the components of the bound EPS of benthic diatom *Amphora* sp. were studied with four different extraction methods including water

bath treatment at 30°C and 70°C , formalin-sodium hydroxide treatment and cationic exchange resin treatment. The results showed that the main components of bound EPS varied generally with the extraction methods, among which the range of DNA content changed the most, the next were protein, sugar and uronic acid, the least was sulfonic acid. The extraction efficiency by low temperature water bath was relatively low while high temperature water bath might have negative influences on the subsequent EPS analysis. The cationic exchange resin treatment showed a good extraction efficiency but it caused serious damages to cells. The method of formalin-sodium hydroxide treatment gave a balanced and efficient result as the extraction derived the highest total EPS especially for sugar and uronic acid and less serious damage to the cells.

Key words: marine biology; diatom; bound EPS; extraction; formalin-sodium hydroxide treatment

DOI: 10.3969/J. ISSN.2095-4972.2019.03.015

(责任编辑:肖 静)