

T/GRM

中关村绿色矿山产业联盟团体标准

T/GRM 098—2024

深色有隔内生菌胞外聚合物

Extracellular Polymeric Substances (EPS) of Dark Septate Endophytes (DSE)

2024 - 12 - 23 发布

2024 - 12 - 24 实施

目 次

前言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
3.1 胞外聚合物	1
3.2 深色有隔内生菌	1
4 技术要求	1
4.1 分子质量和官能团结构	1
4.2 成分组成要求	1
4.3 外观质量	2
5 试验方法	2
5.1 胞外聚合物的分子质量检验方法参照附录 A 执行。	2
5.2 胞外聚合物的官能团结构检验方法参照附录 B 执行。	2
5.3 胞外聚合物的成分检验方法应参照附录 C 和 D 执行。	2
5.4 胞外聚合物外观质量测定采用目视检测法和扫描电镜观测法执行。	2
6 检验规则	2
6.1 组批规则	2
6.2 取样方法	2
6.3 检验项目	2
6.4 检查与验收	2
6.5 判定规则	2
7 包装、标识、贮存	2
7.1 包装	2
7.2 标识	2
7.3 贮存	3
附录 A (规范性) 胞外聚合物分子量的测定 凝胶渗透色谱法	4
A.1 方法提要	4
A.2 材料和仪器	4
A.3 分析步骤	4
A.4 结果计算	4
A.5 允许差	4
附录 B (规范性) 胞外聚合物官能团的测定	5
B.1 方法提要	5
B.2 仪器	5
B.3 分析步骤	5
B.4 结果计算	5
B.5 允许差	5

附录 C (规范性) 胞外聚合物多糖和蛋白含量占比的测定	6
C.1 方法提要	6
C.2 仪器和材料	6
C.3 分析步骤	6
C.4 结果计算	6
C.5 允许差	6
附录 D (规范性) 胞外聚合物单糖组成的测定 液相色谱法	7
D.1 方法提要	7
D.2 材料和仪器	7
D.3 分析步骤	7
D.4 结果计算	7
D.5 允许差	7

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

近年来，生态修复技术逐步成为解决矿山环境问题的关键手段。其中，胞外聚合物（EPS）作为一种由微生物分泌的生物活性物质，在改良土壤结构、提升土壤水分保持能力及促进植物生长方面显示出巨大的应用潜力。胞外聚合物通过增强土壤团聚体的形成与稳定性，改善了土壤的理化性质，同时为微生物群落提供了有利的生存环境，为退化生态系统的重建提供了重要支撑。制定胞外聚合物的团体标准，旨在规范其生产、检测与应用，为生态修复特别是矿山生态修复领域提供科学依据和技术指导。这不仅有助于提升胞外聚合物的实际应用效果，还为矿区生态环境的恢复与可持续发展提供了切实可行的技术支撑。

本文件由中关村绿色矿山产业联盟提出并归口。

本文件起草单位：西安科技大学西部矿山生态环境修复研究院、中国矿业大学（北京）矿山生态修复研究院、天山实验室、北京合生元生态环境工程技术有限公司。

本文件主要起草人：毕银丽、彭苏萍、谭海、张士双、解琳琳、赵静、柯增鸣、肖礼、王坤、白雪蕊、武超、全文智

深色有隔内生菌胞外聚合物

1 范围

本文件规定了由深色有隔内生菌合成胞外聚合物的技术要求、实验方法、检验规则及标志、包装、标识、贮存等要求。

本文件适用于深色有隔内生菌以蔗糖、麦芽提取物、硫酸镁、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾和维生素B1为原料合成的胞外聚合物。本产品是矿山土壤的优良改良剂，溶于水后具有较强的粘性，具有改良土壤团聚的作用效果。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

- GB/T 8170数值修约规则与极限数值的表示和判定
- GB/T 603化学试剂试验方法中所用制剂及制品的制备
- GB 19489-2008实验室生物安全通用要求
- GB/T 16631-2008高效液相色谱法通则
- GB/T 5009.5-2016食品中还原糖的测定

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 胞外聚合物

由深色有隔内生菌（DSE）合成并分泌到细胞外的一种大分子物质。

3.2 深色有隔内生菌

深色有隔内生菌是一类可以定殖于植物根部的真菌。

4 技术要求

4.1 分子质量和官能团结构

深色有隔内生菌胞外聚合物的相对分子质量和官能团结构应符合表1规定。

表1 深色有隔内生菌胞外聚合物的分子量和主要官能团组成

产品	分子量	官能团
胞外聚合物	533.754 kDa	CH-, C=O, (-NHC = O-), -OH, -NH

4.2 成分组成要求

深色有隔内生菌胞外聚合物含有多糖、蛋白和其他脂类或衍生物，占比应符合表2的规定。

表2 深色有隔内生菌胞外聚合物各组分含量占比（%）

产品	多糖（%）	蛋白（%）
胞外聚合物	78	8

深色有隔内生菌胞外聚合物中多糖的各单糖组分应符合表3的规定。

表3 深色有隔内生菌胞外聚合物中多糖组分占比

多糖组成结构	占比 (%)
葡糖糖	88.6
半乳糖	1.3
阿拉伯糖	0.6
木糖	0.5
甘露糖	1.5
半乳糖醛酸	7.5

4.3 外观质量

深色有隔内生菌胞外聚合物研磨后呈灰白色粉末状，扫描电镜下200倍下应为絮状结构。

5 试验方法

5.1 胞外聚合物的分子质量检验方法参照附录 A 执行。

5.2 胞外聚合物的官能团结构检验方法参照附录 B 执行。

5.3 胞外聚合物的成分检验方法应参照附录 C 和 D 执行。

5.4 胞外聚合物外观质量测定采用目视检测法和扫描电镜观测法执行。

6 检验规则

6.1 组批规则

深色有隔内生菌胞外聚合物应批次提交验收，每批应保证同等质量的产品组成。

6.2 取样方法

将样品应被分为两份，每个试样不少于完整规格测试所需数量的两倍，分别入带有干燥剂的离心管中，贴上标签，注明试样名称、生产日期。供检验和查用。

6.3 检验项目

本文件3.2和3.3中规定的所有项目均为出厂检验项目。

6.4 检查与验收

产品需经供方检测，确保其符合本标准要求。需方收到产品后，应根据本标准规定进行检验。如检测结果与标准或合同（订货单）不符，需在收到产品后15日内向供方提出，并对不合格样品进行二次检测后决定是否更换。

6.5 判定规则

检测结果如果有一项指标不符合本标准要求时，应当重新采样复验。本文件中产品质量指标合格判定，采用GB/T 8170中“修约值比较法”。

7 包装、标识、贮存

7.1 包装

产品使用清洁的闭口离心管包装，或者根据用量独立包装成胶囊，装在瓶内。内置干燥剂防潮，必须保证密封性和防潮性。

7.2 标识

产品外包装需明确标注生产日期、批次、成分含量、储存条件及适用领域。

7.3 贮存

最终产品可为冻干粉或液态（溶于水），储存条件应避免高温、高湿等条件。推荐储存温度分别是，液态胞外聚合物2 - 8° C，冻干粉胞外聚合物室温保存，湿度低于40%。

全国团体标准信息平台

附录 A (规范性)

胞外聚合物分子量的测定 凝胶渗透色谱法

A.1 方法提要

利用示差检测器根据其折光强度检测样品的浓度信息,利用多角度激光光散射仪检测大分子的光散射信息,并根据马克·霍温克方程(Mark-Houwink Equation)计算出每个组分对应的分子量。

A.2 材料和仪器

A.2.1 液相系统、示差检测器和激光光散射检测器

液相系统为U3000(Thermo, USA),示差检测器为Optilab T-rEX(Wyatt technology, CA, USA),激光光散射检测器为DAWN HELEOS II(Wyatt technology, CA, USA)

A.2.2 色谱柱

采用凝胶排阻色谱柱Ohpak SB-805 HQ(300×8mm)和Ohpak SB-803 HQ(300×8mm)串联。

A.3 分析步骤

A.3.1 色谱条件

进样量: 100 μL

柱温: 45 $^{\circ}\text{C}$

流动相: 0.02% NaN_3 , 0.1 mol/L NaNO_3

流速: 0.6 mL/min

洗脱梯度: 等度75 min。

A.3.2 操作步骤

将样品溶解在0.1 mol/L NaNO_3 水溶液(含0.02% NaN_3 , w/w)中,终浓度为1 mg/mL,并通过孔径为0.45 μm 的过滤器过滤。启动仪器,并按照A.3.1设置为响应的色谱条件,待仪器稳定后进样。

A.4 结果计算

根据峰面积利用马克·霍温克方程(Mark-Houwink Equation)计算出每个组分对应的分子量。

A.5 允许差

两次平行测定结果的允许不大于0.2%。

附 录 B
(规范性)
胞外聚合物官能团的测定

B.1 方法提要

在干燥条件下,利用傅里叶红外光谱测定胞外聚合物官能团。

B.2 仪器

傅里叶红外光谱分析仪(Bruker Optics 公司)。

B.3 分析步骤

待仪器稳定后,将适量样品放置于样品槽中测定胞外聚合物的官能团。扫描宽度为400—4000 cm^{-1} 。

B.4 结果计算

根据出峰位置进行比对,分析胞外聚合物中的官能团。

B.5 允许差

三次平行测定结果的允许不大于0.2%。

附录 C

(规范性)

胞外聚合物多糖和蛋白含量占比的测定

C.1 方法提要

使用紫外分光光度计测定胞外聚合物中糖和蛋白所占比例。

C.2 仪器和材料

C.2.1 仪器

紫外分光光度计 (SHIMADZU公司)。

C.2.2 材料

考马斯亮蓝, 牛血清蛋白, 苯酚溶液, 浓硫酸。

C.3 分析步骤

C.3.1 蛋白含量检测

将胞外聚合物按照1 g/L溶于水中, 按照1: 27比例与考马斯亮蓝混匀于590 nm下测定蛋白含量。

C.3.2 多糖含量检测

将胞外聚合物按照1 g/L溶于水中, 取1 mL加入6%苯酚3 mL和5 mL浓硫酸混匀静置30 min后在490 nm下测定吸光度。

C.4 结果计算

根据吸光度, 将结果带入标准曲线中, 分析胞外聚合物中的多糖和蛋白含量。

C.5 允许差

三次平行测定结果的允许不大于0.5%。

附 录 D
(规范性)
胞外聚合物单糖组成的测定 液相色谱法

D.1 方法提要

在一定的色谱条件下,用液相色谱仪测定。试样中单糖成分与标准品的出峰时间进行比对,根据峰面积计算每种单糖的含量。

D.2 材料和仪器

D.2.1 色谱系统

色谱系统: Thermo ICS 5000+离子色谱系统(ICS 5000+, Thermo Fisher Scientific, USA)。

D.2.2 色谱柱

色谱柱: Dionex™ CarboPac™ PA20 (150×3.0mm, 10 μm)。

D.3 分析步骤

D.3.1 色谱条件

进样量: 5 μL

柱温: 30℃

流动相: A:水, B: 0.1 mol/L NaOH, C: 0.1 mol/L NaOH, 0.2 mol/L NaAc

流速: 0.5 mL/min

洗脱梯度: 0 min A相/B相/C相(95: 5: 0, V/V), 26 min A相/B相/C相(85: 5: 10, V/V), 42 min A相/B相/C相(85: 5: 10, V/V), 42.1 min A相/B相/C相(60: 0: 40, V/V), 52 min A相/B相/C相(60: 40: 0, V/V), 52.1 min A相/B相/C相(95: 5: 0, V/V), 60 min A相/B相/C相(95: 5: 0, V/V)。

D.3.2 操作步骤

称取适量多糖样品,加入1 mL 2M TFA酸溶液,121 °C加热2小时。通氮气,吹干。加入99.99%甲醇清洗,再吹干,重复甲醇清洗2-3次。加入无菌水溶解,转入色谱瓶。按照D.3.1设置为响应的色谱条件,待仪器稳定后进样。

D.4 结果计算

利用软件Chromeleon处理色谱数据。根据峰面积计算单糖含量。

D.5 允许差

两次平行测定结果的允许不大于0.2%。