

# 藻菌生物膜胞外聚合物(EPS)与Al<sup>3+</sup>的配位作用机理\*

刘静<sup>1,3</sup> 张道勇<sup>1,2,3</sup> 潘响亮<sup>1,2\*\*</sup> 王立英<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>中国科学院地球化学研究所环境地球化学国家重点实验室 贵阳 550002)

(<sup>2</sup>中国科学院新疆生态与地理研究所 乌鲁木齐 830011; <sup>3</sup>中国科学院研究生院 北京 100049)

**摘要** 利用三维荧光光谱(3DEEM)和傅立叶转换红外光谱(FTIR)研究了藻菌生物膜EPS与Al<sup>3+</sup>的相互作用机理。3DEEM结果表明,生物膜EPS含有3个荧光峰。其中,峰A (Ex/Em=225~235 nm/300~330 nm)和峰B (Ex/Em=275~280 nm/325~330 nm)荧光较强,属类蛋白峰,峰C (Ex/Em=335 nm/432~434 nm)荧光较弱,属类腐殖酸峰。峰A和峰B都能不同程度地被Al<sup>3+</sup>猝灭,它们的条件稳定常数(logK)分别为5.89和6.95。Al<sup>3+</sup>-EPS体系的峰A和峰B荧光强度明显受溶液pH值的影响。在pH为2~4之间时,荧光强度随pH的增大而增大,在4~7之间随pH的增大而减小,在7~11之间随pH增大而增大。FTIR光谱图分析表明,Al<sup>3+</sup>主要与EPS中所含的—NH—、C=O等发生强的配位作用。图6 参21

**关键字** 胞外聚合物; Al<sup>3+</sup>; 三维荧光光谱; 荧光猝灭; 傅立叶转换红外光谱; 生物膜; 条件稳定常数

CLC X172 : Q936

## Characterization of the Complexation Between Al<sup>3+</sup> and Extracellular Polymeric Substances Prepared from Alga-bacteria Biofilm\*

LIU Jing<sup>1,3</sup>, ZHANG Daoyong<sup>1,2,3</sup>, PAN Xiangliang<sup>1,2\*\*</sup> & WANG Liying<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China)

(<sup>2</sup>Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China)

(<sup>3</sup>Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract** Three-dimensional excitation emission matrix fluorescence spectroscopy (3DEEM) and fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy were used to study the extracellular polymeric substances (EPS) produced by alga-bacteria biofilm. Three excitation/emission (Ex/Em) fluorescence peaks at Ex/Em 225~235/300~330 nm (Peak A), 275~280/325~330 nm (Peak B), and 335/432~434 nm (Peak C) were identified in the 3DEEM, respectively. Peaks A and B were referred to as protein-like fluorescence and peak C as humic-like fluorescence. The fluorescence intensity at both peaks A and B decreased as Al<sup>3+</sup> concentration increased. The values of logK (conditional stability constant) for peaks A and B were 5.89 and 6.95, respectively. It was also found that solution pH strongly affected the fluorescence intensity at peaks A and B for the Al<sup>3+</sup>-EPS complexation. The fluorescence intensity at peaks A and B increased consistently with solution pH increasing from 2 to 4, decreased with solution pH increasing from 4 to 7, and increased again with solution pH increasing from 7 to 11. FTIR analysis demonstrated that —NH— and C=O groups in EPS were responsible for binding with Al<sup>3+</sup>. Fig 6, Ref 21

**Keywords** extracellular polymeric substance (EPS); Al<sup>3+</sup>; three-dimensional excitation emission matrix (3DEEM); fluorescence quenching; Fourier transform infrared spectroscopy; biofilm; conditional stability constant

CLC X172 : Q936

微生物胞外聚合物(Extracellular polymeric substances, EPS)是由微生物细胞分泌的一种主要由蛋白质、多糖等成分组成的聚合物。EPS具有大量电负性基团,可以与多种金属阳离子具有很强的配位络合作用<sup>[1,2]</sup>。例如, Liu等对活性污泥中提取的EPS对重金属的吸附作用的研究表明,1 mg EPS大约去除0.25~1.48 mg金属离子<sup>[4]</sup>。因为微生物在地表环境中普遍存在,且生物量巨大,所以EPS在环境中普遍存在。有研究表明,滩涂中每kg沉积物中EPS的含量达到四百多mg<sup>[3]</sup>。由于

EPS与重金属离子之间很强的络合作用及在水土环境中的广泛存在, EPS对重金属等污染物的迁移、转化具有十分重要的影响<sup>[1]</sup>。然而,目前关于EPS与重金属相互作用的研究大多数是关于活性污泥所产生的EPS与重金属之间的络合作用<sup>[4,5]</sup>,而对自然界普遍存在的天然生物膜产生的EPS与重金属之间相互作用的研究还相对有限,如,李鱼等研究了自然水体采集的生物膜对镉、镍、钴等金属的吸附<sup>[6,7]</sup>。

Al<sup>3+</sup>在环境中普遍存在,环境中自由态Al<sup>3+</sup>的增加会对生态系统产生毒害作用<sup>[8]</sup>。通常认为,不同化学形态的重金属在环境中的可迁移性及对生物的有效性和毒性有较大的差别,有机态的金属要比无机态的毒性小<sup>[9]</sup>。因此,研究EPS与Al<sup>3+</sup>之间的络合作用对研究Al<sup>3+</sup>在水环境中的行为归宿及正确评估Al<sup>3+</sup>的生态毒理学效应具有重要意义。

荧光光谱法由于具备灵敏度高、选择性好、信息量大且

收稿日期: 2008-10-23 接受日期: 2009-02-17

\*国家“863”项目(No. 2006AA06Z339), 中国科学院“百人计划”项目和国家自然科学基金项目(Nos. 40673070, 40872169)资助 Supported by the National High-tech Research and Development Program of China (863 Program, No. 2006AA06Z339), the Program of 100 Distinguished Young Scientists of the Chinese Academy of Sciences, and the National Natural Science Foundation of China (Nos. 40673070, 40872169)

\*\*通讯作者 Corresponding author (E-mail: xiangliangpan@163.com)

不破坏样品结构等优点被广泛应用于研究各种含有荧光基团的物质与金属离子的相互作用。由于EPS中含有蛋白质、腐殖酸等荧光生色团, 荧光光谱技术有望成为研究EPS化学性质及其与阳离子相互作用的重要手段。目前已经有少数研究者利用三维荧光光谱技术(3DEEM)对EPS的结构、基本性质进行了初步研究<sup>[10, 11]</sup>。Sheng和Yu<sup>[10]</sup>应用3DEEM描述了好氧活性污泥和厌氧活性污泥的EPS的荧光性质, 发现了两个类蛋白峰和一个类腐殖酸峰。Adav和Lee<sup>[11]</sup>利用3DEEM研究了用不同方法从颗粒污泥中所提取的EPS的荧光性质。他们的研究表明, 不同的提取方法对所获取的EPS的组分及相应的荧光性质有着很大的影响。现有的少数研究大都是对活性污泥的基本荧光性质进行研究, 鲜有应用荧光光谱技术来研究EPS与金属离子的配位作用。

生物膜是微藻、细菌等在固体表面通过EPS等粘附并被EPS所包被在一起的膜状微生物聚合物。生物膜在水环境中普遍存在。本文的主要目的即是利用高灵敏度荧光光谱分析仪和FT-IR研究藻菌生物膜EPS的基本荧光特征及其与Al<sup>3+</sup>的相互作用机理。

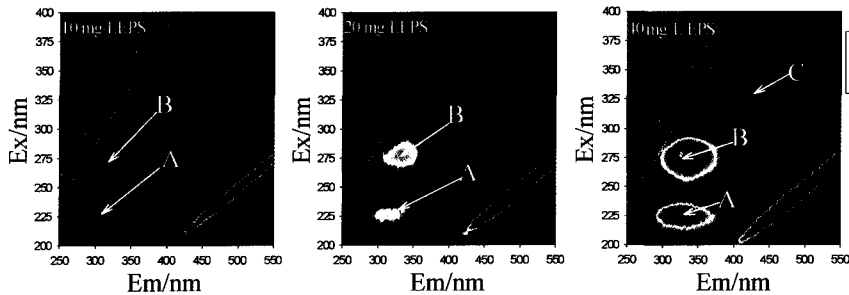


图1 不同浓度EPS的3DEEM荧光光谱图

Fig. 1 3DEEM of solutions containing different amounts of EPS

## 1 材料与方法

### 1.1 生物膜EPS的提取

藻菌生物膜采集自中国科学院地球化学研究所内的池塘。生物膜EPS用高速冷冻离心法分离<sup>[11, 12]</sup>, 这种方法被证实为不破坏细胞<sup>[2]</sup>。将生物膜用去离子水洗涤干净后在4℃、20 000 r/min离心20 min。离心后取上清液冷冻干燥获得EPS样品, 放入冰箱保存备用。

### 1.2 荧光测量参数设置和数据分析

EPS的荧光特征用F-4500荧光仪(Hitachi, Japan)检测。3DEEM荧光测量时荧光仪参数设置如下: 带通: Ex = 5 nm, Em = 10 nm; 响应时间: 自动; 扫描速度: 1 200 nm/min; 扫描光谱进行仪器自动校正。激发波长范围为Ex = 200~400 nm (间隔5 nm), 发射波长为Em = 250~550 nm (间隔2 nm)。所测结果均扣除实验空白(即相同条件下去离子水的3DEEM)。使用SigmaPlot 2000 (Systat Software, Inc)绘制3DEEM荧光光谱图, 使用Origin 7.0分析二维荧光光谱数据及红外光谱数据。

### 1.3 溶液pH对Al<sup>3+</sup>与EPS配位作用的影响

在10 mL 10 mg/L的EPS溶液中加入Al<sup>3+</sup>溶液使其最终浓度达到1 mmol/L, 用HCl和NaOH溶液将EPS-Al<sup>3+</sup>溶液的pH分别调节为2~11。每个EPS溶液样品加入的酸碱试剂最多不超过50 μL。EPS-Al<sup>3+</sup>溶液用磁力搅拌器搅拌15 min后用F-4500

荧光仪测定不同峰值处的荧光强度。

### 1.4 Al<sup>3+</sup>对EPS的猝灭实验

取10 mg/L的EPS溶液置于10 mL小烧杯中, 用微量加样器不断加入Al<sup>3+</sup>, 同时用磁力搅拌器持续搅拌。EPS溶液中的Al<sup>3+</sup>的浓度控制在0.2~60 μmol/L。溶液的pH始终保持在4±0.05。用同步荧光测定不同Al<sup>3+</sup>时荧光峰的荧光强度。

### 1.5 红外样品的制备

EPS利用冷干燥技术制备, EPS溶液与Al<sup>3+</sup>发生配位作用后用红外灯烘干, 并用KBr压片后用FTIR仪(岛津IR-408)测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 生物膜EPS的荧光性质

从图1可以看出, 藻菌生物膜的EPS含有2个主要的荧光峰, 峰A: Ex/Em = 225~235 nm/300~330 nm; 峰B: Ex/Em = 275~280 nm/325~330 nm; 当EPS的浓度达到40 mg/L时, 检测到了峰C (Ex/Em = 335 nm/432~434 nm), 根据峰的位置和以往学者们的研究<sup>[11, 13-15]</sup>, 峰A位于II区(含芳香基团的蛋白质), 峰B位于IV区(溶解性微生物副产物类), 峰C位于V区(类

腐殖酸)。峰A和峰B都属于类蛋白的荧光峰, 峰C属于类腐殖酸的荧光峰。与Sheng等的研究结果<sup>[14]</sup>相比较, 峰B发生蓝移大约10 nm。

从图1-a-c还可以看出, 藻菌生物膜EPS的类蛋白质成分含量较高, 而类腐殖酸物质很低, 因此对EPS与Al<sup>3+</sup>相互作用的荧光光谱的研究主要以两个类蛋白峰为研究对象。

### 2.2 pH对Al-EPS配位能力的影响

在水环境中, pH不仅是影响荧光峰强度和位置的主要

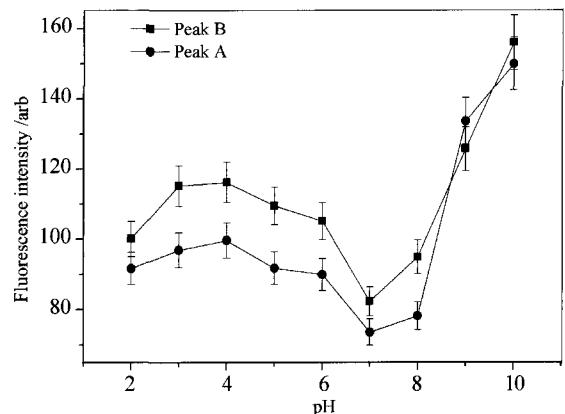


图2 pH对EPS与Al<sup>3+</sup>配位作用的影响

Fig. 2 Effect of solution pH on binding of EPS with Al<sup>3+</sup>

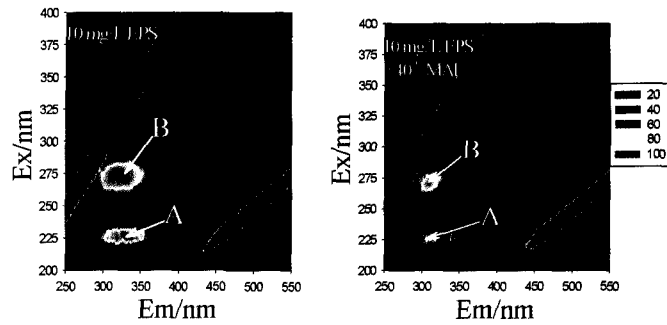


图3 EPS被Al<sup>3+</sup>猝灭前(a)和猝灭后(b)的3DEEM荧光光谱图  
Fig. 3 3DEEM of EPS before (a) and after (b) quenched by Al<sup>3+</sup>

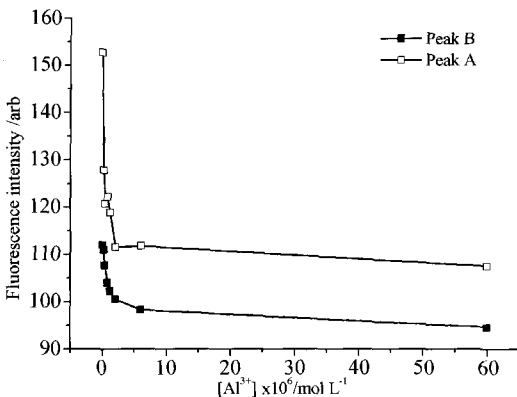


图4 Al<sup>3+</sup>对EPS荧光的猝灭  
Fig. 4 Fluorescence quenching of EPS by Al<sup>3+</sup>

因素, 还是影响Al的形态的重要参数之一。图2表明, A、B两个峰随pH的变化基本一致, 在pH 2~4随着pH增大荧光强度增强, 在pH 4~7, 随着pH的增大荧光强度减小, 但到了pH 7~10荧光密度随pH的增大而增大。这主要是因为pH 2~4时Al在水溶液中以Al<sup>3+</sup>离子状态存在, 随着pH的增大发荧光基团的质子化作用逐渐减弱<sup>[6]</sup>, 而且铝与发光基团络合的作用小于质子化减弱的作用, 所以导致荧光强度增强; 在pH 4~7时, Al<sup>3+</sup>不断把发荧光基团中的H<sup>+</sup>置换出来<sup>[5, 16, 17]</sup>, 使发荧光基团发生猝灭, 使荧光强度减弱; 当pH由7不断增加时, 越来越多的Al<sup>3+</sup>水解生成AlO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 后者与荧光基团的络合作用很弱, 从而导致荧光强度增强。

### 2.3 Al<sup>3+</sup>对EPS荧光的猝灭

Al<sup>3+</sup>有很高的离子系数和很低的共价系数, 因此可以作为配位原子和配位体发生配位反应。在上面的讨论中可以看出, 在pH=4时, Al主要以Al<sup>3+</sup>的形式存在, EPS荧光较强, 因此选择pH=4做猝灭滴定实验。图3是在pH=4的条件下, 随着不断加入Al<sup>3+</sup>, EPS的2个荧光峰荧光强度的变化情况。从图4可以看出, 随着Al<sup>3+</sup>浓度增加, EPS的荧光明显地被猝灭。当Al<sup>3+</sup>在EPS溶液中的浓度为0.2~6 μmol/L之间时, 峰A、峰B的荧光强度不断降低; 但当Al<sup>3+</sup>浓度达到6 μmol/L之后, 随着Al<sup>3+</sup>的浓度增加, 两个荧光基团的荧光强度基本不变, 说明10 mg/L的EPS溶液中发荧光的配位体能与大约6 μmol/L的Al<sup>3+</sup>发生配位作用。为了定量地研究Al<sup>3+</sup>与EPS的配位作用, 可以像学者们研究溶解有机质中假定金属与DOM之间以1:1发生络合作用<sup>[18, 19]</sup>那样, 假定Al<sup>3+</sup>与EPS也以1:1发生络合, 利用修正后的Stern-Volmer方程来计算配位稳定常数:

$$F_0/\Delta F = 1/fK_{[Al]} + 1/f$$

其中, F<sub>0</sub>和F是EPS样品在滴加Al<sup>3+</sup>前后的荧光强度。ΔF = F<sub>0</sub> - F, 而f是被Al<sup>3+</sup>配位的荧光基团的比例, [Al]为Al<sup>3+</sup>浓度, K是条件稳定常数。

从图5可以看出, F<sub>0</sub>/Δf与1/[Al<sup>3+</sup>]之间都显示出较好的线性关系, 峰A和峰B的R<sup>2</sup>分别为0.761和0.972, 说明修正后的Stern-Volmer方程基本上可以用来描述EPS与Al<sup>3+</sup>的配位作用。经计算, 峰A和峰B所在的两个基团的条件稳定常数logK分别为5.89和6.95, 表明EPS与Al<sup>3+</sup>有很强的配位能力, 即自然

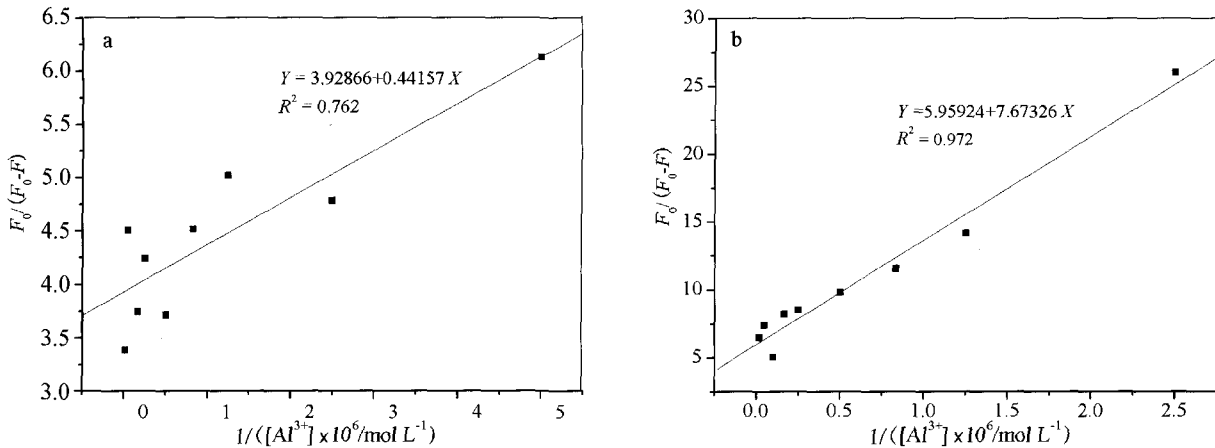


图5 Al<sup>3+</sup>对EPS猝灭的Stern-Volmer方程拟合(a: 类蛋白荧光峰A; b: 类蛋白荧光峰B)  
Fig. 5 Stern-Volmer curves for fluorescence quenching of EPS by Al<sup>3+</sup> at peak A (a) and peak B (b)

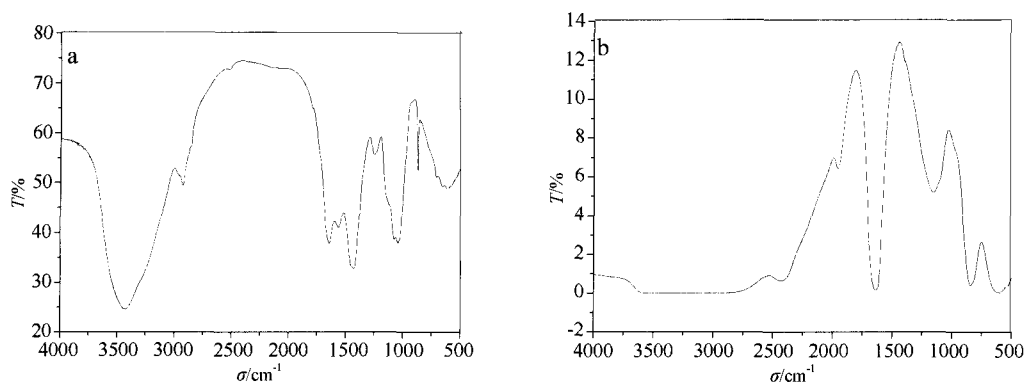


图6 EPS与Al<sup>3+</sup>反应前(a)和反应后(b)的FTIR谱图  
Fig. 6 FTIR spectra of EPS before (a) and after (b) binding with Al<sup>3+</sup>

环境中藻菌生物膜的EPS是Al<sup>3+</sup>的强配位体。

## 2.4 EPS与Al<sup>3+</sup>作用的红外特征

由图6-a可以看出, EPS主要有N—H和O—H的伸缩振动(3 500~3 100 cm<sup>-1</sup>)、C—H的伸缩振动(2 928.8 cm<sup>-1</sup>)、C=O的伸缩振动(1 648.5 cm<sup>-1</sup>)、CH<sub>2</sub>的弯曲振动(1 428.2), 多糖中C—O—C的伸缩振动(1 150~1 030)及指纹区(<1 000 cm<sup>-1</sup>)。EPS与入Al<sup>3+</sup>配位之后(图6-b), N—H、O—H、C=O的峰几乎都消失, 说明EPS中的N—H、O—H、C=O参与了Al<sup>3+</sup>的配位作用<sup>[20, 21]</sup>。

## 3 结论

3.1 藻菌生物膜EPS的荧光峰主要由类蛋白质物质产生。

3.2 EPS中类蛋白质物质与Al<sup>3+</sup>具有较强的配位作用。

3.3 pH值对Al<sup>3+</sup>-EPS体系的配位作用影响明显, pH在2~4之间时, 峰A、B两个荧光基团的荧光强度随pH的增大而增大, 4~7之间时随pH的增大而减小, 7~11之间时随pH增大而增大。

3.4 EPS中N—H、C=O等基团参与Al<sup>3+</sup>的配位作用。

### References

- Zhang DY (张道勇), Zhao YS (赵勇胜), Pan XL (潘响亮). The role of EPS in removing cadmium in sewage by algae-bacteria biofilm. *Res Environ Sci (环境科学研究)*, 2004, **17** (5): 52~55
- Zhang DY, Wang JL, Pan XL. Cadmium sorption by EPSs produced by anaerobic sludge under sulfate-reducing conditions. *J Hazardous Mat*, 2006, **138**: 589~593
- Kuwaie T, Hosokawa Y. Determination of abundance and biovolume of bacteria in sediments by dual staining with 49, 6-diamidino-2-phenylindole and acridine orange: Relationship to dispersion treatment and sediment characteristics. *Appl & Environ Microbiol*, 1999, **65** (8): 3407~3412
- Liu Y, Lam MC, Fang HHP. Adsorption of heavy metals by EPS of activated sludge. *Water Sci & Technol*, 2001, **43** (6): 59~66
- Guibaud G. Effect of pH on cadmium and lead binding by extracellular polymeric substances (EPS) extracted from environmental bacterial strains. *Colloids & Surfaces B: Biointerfaces*, 2008, **63**: 48~54
- Zhang BT (张波涛), Dong DM (董德明), Yang F (杨帆), Li Y (李鱼), Wu YH (吴雨华). Effect of ionic strength in solution on Pb<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> adsorption to surface coatings. *J Jilin Univ Earth Sci Ed (吉林大学学报地球科学版)*, 2004, **34** (4): 566~570
- Dong DM (董德明), Ji L (纪亮), Hua XY (花修艺), Li Y (李鱼), Zheng N (郑娜). Studies on the characteristics of Co, Ni and Cu and adsorption to natural surface coatings. *Chem J Chin Univ (高等学校化学学报)*, 2004, **25** (2): 247~251
- Zhao JY, Nelson DJ. Fluorescence study of the interaction of Suwannee River fulvic acid with metal ions and Al<sup>3+</sup>-metal ion competition. *J Inorganic Biochem*, 2005, **99**: 383~396
- Kot A, Namiesnik J. The role of speciation in analytical chemistry. *TrAC Trends Anal Chem*, 2000, **19** (2/3), 69~79
- Sheng GP, Zhang ML, Yu HQ. Characterization of adsorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) extracted from sludge. *Colloids & Surfaces B: Biointerfaces*, 2008, **62**: 83~90
- Adav SS, Lee DJ. Extraction of extracellular polymeric substances from aerobic granule with compact interior structure. *J Hazardous Mat*, 2008, **154**: 1120~1126
- Guibaud G, Comte S. Comparison of the complexation potential of extracellular polymeric substances (EPS), extracted from activated sludges and produced by pure bacteria strains, for cadmium, lead and nickel. *Chemosphere*, 2005, **59**: 629~638
- Baker A. Fluorescence properties of some farm wastes: Implications for water quality monitoring. *Water Res*, 2002, **36**: 189~195
- Sheng GP, Yu HQ. Characterization of extracellular polymeric substances of aerobic and anaerobic sludge using three-dimensional and emission matrix fluorescence spectroscopy. *Water Res*, 2006, **40**: 1233~1239
- Wu FC, Midorikawa T, Tanoue E. Fluorescence properties of organic ligands for copper (II) in Lake Biwa and its rivers. *Geochem J*, 2001, **35**: 333~346
- Lamelas C, Benedetti M, Wilkinson KJ, Slaveykova VI. Characterization of H<sup>+</sup> and Cd<sup>2+</sup> binding properties of the bacterial exopolysaccharides. *Chemosphere*, 2006, **65**: 1362~1370
- Fu PQ (傅平青), Liu CQ (刘丛强), Wu FC (吴丰昌). Three-dimensional excitation emission matrix fluorescence spectroscopic characterization of the complexation between mercury (II) and dissolved organic matter. *Environ Sci (环境科学)*, 2004, **25** (6): 140~144
- Joaquim CG, Esteves da Silva. Fluorescence quenching of anthropogenic fulvic acids by Cu (II), Fe (III) and U. *Talanta*, 1998, **45**: 1155~1165
- Lu X, Jaffe R. Interaction between Hg (II) and natural dissolved organic matter: A fluorescence spectroscopy based study. *Water Res*, 2001, **35** (7): 1793~1803
- Pan XL, Wang JL, Zhang DY. Biosorption of Pb (II) by *Pleurotus ostreatus* immobilized in calcium alginate gel. *Proc Biochem*, 2005, **40**: 2799~2803
- Wei GH (韦革宏), Li SJ (李素俭), Xu WL (徐万里), Zhu ME (朱铭莪), Gong BS (龚报森). Characteristics of infrared spectra of pure cultures and exopolysaccharide from rhizobia. *Chin J Appl Environ Biol (应用与环境生物学报)*, 1999, **5** (3): 31~34