

doi: 10.13866/j.azr.2018.01.30

新疆奎屯排碱渠生物膜胞外聚合物与 As(Ⅲ)的络合作用^①

林青华^{1,2}, 张道勇^{1,3}

(1. 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 贵州 贵阳 550081;

2. 中国科学院大学 北京 100049; 3. 浙江工业大学环境学院 浙江 杭州 310014)

摘要:新疆奎屯地区是地质背景高砷区,排碱渠水体砷(As)污染严重,排碱渠中普遍发育的生物膜胞外聚合物(EPS)与As之间的络合会影响砷的迁移扩散,进而影响到砷的生物毒性和生态风险。目前,排碱渠中普遍发育的生物膜EPS对水中As的迁移转化及行为归宿的影响还完全不清楚。本文结合荧光猝灭滴定技术和等温微量热滴定技术研究了该地区普遍发育的藻生物膜EPS与As(Ⅲ)之间的相互作用。荧光猝灭实验表明:排碱渠生物膜EPS有3个荧光峰:峰A属于含芳环基团的蛋白质Ⅱ;峰B属于溶解性的微生物类蛋白质;峰C属于类腐殖酸。峰A和峰B统称为类蛋白质物质,其中峰B被确定为类色氨酸物质。类蛋白质物质与As(Ⅲ)具有较强的络合作用,而类腐殖酸物质与As(Ⅲ)几乎没有结合能力。EPS与As(Ⅲ)荧光猝灭作用属于静态猝灭和动态碰撞猝灭,同时存在的复合猝灭机制。EPS中含芳环基团的蛋白质Ⅱ和类色氨酸物质与As(Ⅲ)的结合常数lgK_b分别为3.82和2.22,说明As(Ⅲ)与前者结合强度比后者大一个数量级,前者与As(Ⅲ)形成络合物的稳定性稍微大于后者。As(Ⅲ)可以与含芳环基团的蛋白质Ⅱ的多类位点结合,且在多类结合位点之间存在拮抗竞争作用,而类色氨酸物质中只有一类位点参与As的络合。等温微量热滴定实验结果经过Independent模型拟合,求得了EPS和As(Ⅲ)络合反应的热力学参数:ΔH、ΔG、ΔS。负的焓变ΔH和负的吉布斯自由能ΔG证明EPS与As(Ⅲ)间的络合反应是一个自发进行的放热反应。随着络合反应进行,反应体系的无序度增加,反应为熵驱动。排碱渠生物膜EPS中的类蛋白质在As(Ⅲ)的迁移转化及其生态风险中起着重要作用,而EPS中的类腐殖酸物质不会对As(Ⅲ)的环境行为产生显著影响。

关键词:排碱渠;砷污染;生物膜;胞外聚合物;荧光猝灭;等温微量热滴定;奎屯;新疆

新疆奎屯垦区属于温带大陆性气候,土壤原生盐碱化和次生盐碱化问题均很严重,为了解决盐碱化问题,大力修建了田间排碱渠⁽¹⁻²⁾。由于土壤中砷含量平均值为20.21 mg·kg⁻¹⁽³⁻⁴⁾,砷在盐碱水体中高度迁移,排碱渠水中的砷含量往往也较高,存在较高的水生生态系统风险。同时,排碱渠中由于富含农田土壤淋洗出来的N、P等养分,排碱渠中蓝藻、绿藻等浮游生物生长旺盛,并形成大片的生物膜。生物膜则主要由微生物细胞及其分泌的胞外聚合物(EPS)组成。EPS主要由多糖、蛋白质、糖羧酸、腐殖质物质和脂质等物质构成,在生物膜中有大约90%的有机质都是由EPS构成⁽⁵⁾。由于具有羟基、羧基、氨基、磷酸基、酰胺基等官能团,EPS与各种重金属阳离子具有一定的络合能

力⁽⁵⁻⁶⁾。EPS与重金属之间的络合会影响重金属在水环境中的迁移扩散、水—沉积物界面的分配、重金属对微生物、植物和动物的毒性,进而影响到重金属的生物毒性和生态风险⁽⁷⁾。砷作为类金属,主要以5价或3价的络阴离子存在,其与EPS之间相互作用的性质与强度与重金属阳离子必然存在差异,然而EPS与砷的络合作用的信息还非常有限,尤其是EPS与砷相互作用的热力学行为完全不清楚。因此,非常有必要研究EPS与砷之间的相互作用,获取相互作用常数,对于科学评估砷在排碱渠水体中的环境行为归宿和生态风险具有重要意义。

EPS组成复杂,含有大量荧光官能团,如芳香结构和饱和脂肪酸链等,因而,可以用三维荧光激发发射光谱(3D-EEM)对其结构进行表征,具有快速、

① 收稿日期:2017-04-01; 修订日期:2017-05-26

基金项目:新疆维吾尔自治区重点实验室开放课题(2015KL025);国家自然科学基金项目(U1403181)资助

作者简介:林青华(1991-),女,硕士研究生,研究方向为污染环境的生物处理技术。E-mail:1551544845@qq.com

灵敏、对荧光物质有高选择性的特点。借助 3D-EEM, 可以获得 EPS 的官能团、结构、构型信息, 在 EPS 与目标离子络合过程中, 荧光光谱特征峰峰值的变化信息会实时传递出来, 可以获得络合的动力学信息和结合强度。如果重金属与 EPS 中的荧光官能团结合, 其荧光强度会随着结合的重金属离子数量的增加而逐渐降低, 也就是发生荧光猝灭。通过荧光猝灭曲线可以获取 EPS 与重金属离子结合的稳定常数等重要参数。目前, 3D-EEM 技术已经被许多学者成功的用于研究 EPS 和其与金属离子的结合能力⁽⁸⁾。

目前, 等温滴定量热法 (ITC) 已经成为快速测量配体-大分子亲和性的首选方法之一, 可以用来描述物理、化学、生物过程的热量变化, 准确获得 EPS 和重金属络合过程中的热力学信息, 如焓变、焓变、吉布斯自由能等。本文将结合 3D-EEM 技术与 ITC 技术来研究新疆奎屯排碱渠生物膜 EPS 与砷的相互作用, 以深入了解排碱渠中生物膜对砷的迁移转化及其生态风险的影响。

1 材料与方法

1.1 胞外聚合物 (EPS) 的提取与表征

本实验中 EPS 从生物膜中提取, 生物膜样品采自新疆奎屯 123 团排碱渠中。将生物膜用去离子水 (阻抗 18.2 M Ω) 彻底清洗干净, 至少洗 10 遍。立即将 EPS 用高速离心法提取, 这个方法不会导致细胞溶菌作用。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下, 离心速度 12 300 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心 20 min。离心后得到的上清液用 0.22 μm 的醋酸纤维素膜抽滤, 然后经透析袋透析 24 h。制备好的 EPS 经冻干后, 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下保存备用⁽⁵⁾。

EPS 浓度用总有机碳 (TOC) 含量表示, 采用湿法非色散红外线吸收测定 (TOC-4100, 日本岛津); EPS 中多糖含量采用 Lowry 法⁽⁹⁾ 测定, 蛋白质含量采用苯酚硫酸法测定⁽¹⁰⁾; EPS 的荧光性质用三维荧光光谱仪 (F-7000, 日本日立) 测定。测得的荧光强度均去除去离子水空白。

1.2 EPS 荧光猝灭滴定实验

荧光猝灭滴定实验在盐度 15‰, pH = 8, 25 $^{\circ}\text{C}$ 下进行, EPS 的 TOC 值为 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 将 3 mL EPS 溶液装入到 1 cm 石英比色皿中, 用 66.7 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ As(III) 溶液滴定, 每次滴定 5 μL , 磁力搅拌器搅拌 15 min, 使反应达到平衡后测定荧光特征峰荧

光强度, 再进行下次滴定, 直到荧光强度基本不变为止。测得的荧光强度均去除去离子水的荧光空白, 实验重复进行 3 次。荧光光谱图使用 Sigma Plot 10.0 绘制。

1.3 ITC 实验

ITC (TA 仪器, 美国) 实验在盐度 15‰, pH = 8, 25 $^{\circ}\text{C}$ 下进行, EPS 为 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 将 1.25 mL 经脱气处理的 EPS 溶液注入到样品池中, 用 22.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ As(III) 溶液 (脱气处理) 滴定, 滴定次数为 25 次, 每次滴定体积为 10 μL , 滴定时间间隔设为 300 s, 参比池中放入 1.25 mL 脱气处理去离子水。测得的反应热均扣除 EPS 滴定 15‰ 盐水的空白。实验设 3 次平行。生成热数据用 Launch Nano Analyze 软件分析, 以 Independent model 进行拟合。

2 结果与讨论

2.1 EPS 组成特征

EPS 中蛋白质含量为 300.15 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 多糖含量为 528.30 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。从图 1a 可以看出, EPS 含有 3 个荧光峰, 峰 A ~ 峰 C 的激发波长/发射波长分别为 225/332 ~ 334 nm, 275 ~ 280/333 ~ 334 nm 和 260/448 ~ 450 nm。分析各峰的位置可知: 峰 A 位于 I 区 (含芳环基团的蛋白质 II); 峰 B 位于 V 区 (溶解性的微生物类蛋白质); 峰 C 位于 IV 区 (类腐殖酸)⁽¹¹⁾。峰 A 和峰 B 统称为类蛋白峰物质, 峰 B 可进一步确定为类色氨酸物质⁽⁵⁾。

2.2 荧光猝灭机制和猝灭常数计算

从图 1 和图 2a 可以看出, 当加入一定浓度的 As(III) 时, 峰 A 和峰 B 猝灭效果明显。当 As(III) 浓度达到 2.67 $\times 10^{-3}$ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 峰 A 和峰 B 的荧光强度分别下降了 75.43% 和 32.71%, 这说明 As(III) 与峰 A 络合作用较强, 而与峰 B 络合作用较弱。峰 C 的荧光强度没有因为 As(III) 的滴定而下降, 说明类腐殖酸物质与 As(III) 之间几乎没有发生吸附、络合等反应。

为获取峰 A、峰 B 的类蛋白质物质与 As(III) 之间的络合作用常数, 应用 Stern-Volmer 模型、修正型 Stern-Volmer 模型及 Hill 方程对荧光猝灭数据进行了拟合。

荧光猝灭机制分为动态猝灭和静态猝灭, 为了明确 EPS 和各离子猝灭的猝灭机制及猝灭常数, 荧光强度数据一般用 Stern-Volmer 方程 (1) 进行拟合⁽¹²⁾。

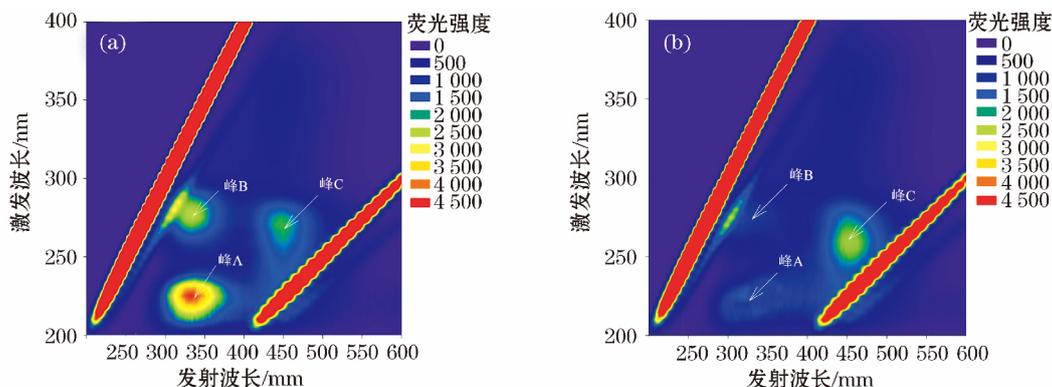


图1 藻 EPS 加入 As(III) 前 (a) 和加入后 (b) 的激发 - 发射矩阵荧光光谱

Fig. 1 The EEM fluorescence spectra of EPS before (a) and after (b) adding As (III)

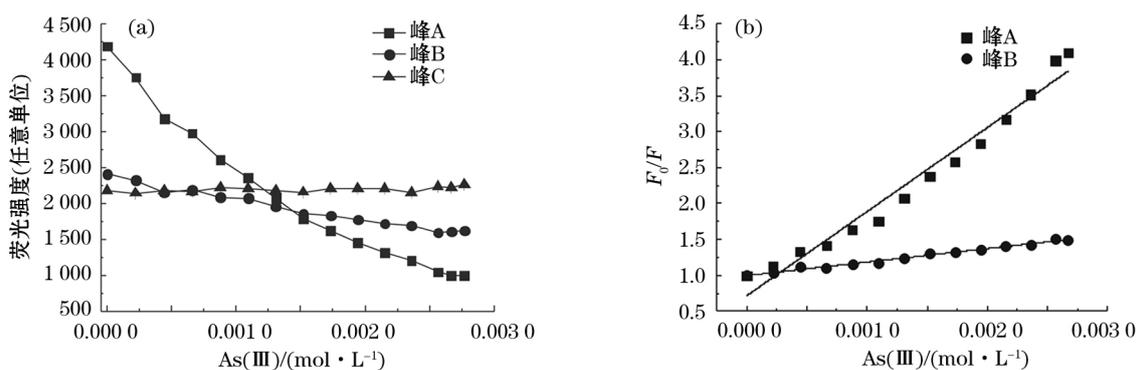


图2 EPS 和 As(III) 络合作用的荧光峰荧光强度变化 (a) 和 Stern-Volmer 方程拟合 (b)

Fig. 2 Change of fluorescence intensity of the peaks of EPS titrated with As (III) (a) and fitting plots using the Stern-Volmer equation (b)

表1 EPS 与 As(III) 反应的 Stern-Volmer 方程及修正型 Stern-Volmer 方程参数

Tab. 1 The parameters for Stern-Volmer and the modified Stern-Volmer models for the interaction between EPS and As (III)

EPS	Stern-Volmer 模型			修正型 Stern-Volmer 模型		
	$K_{sv} (10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$K_q (10^{11} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	R^2	$\lg K_a$	f	R^2
峰 A	1.18	1.18 ± 0.09	0.970	2.43 ± 0.16	1.84	0.985
峰 B	0.19	0.19 ± 0.018	0.986	2.23 ± 0.33	1.08	0.962

$$F_0/F = K_{sv} [\text{As(III)}] + 1 = K_q \tau_0 + 1 \quad (1)$$

式中: F_0 和 F 分别为淬灭剂加入前后, EPS 各峰的荧光强度; K_{sv} 为荧光淬灭常 ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$); K_q 为生物分子淬灭速率常数 ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$); $[\text{As(III)}]$ 为 As(III) 浓度 ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); τ_0 为生物大分子的荧光寿命, 取值 $1.0 \times 10^{-8} \text{ s}$ 。

如图 2b 所示, As(III) 滴定 EPS 峰 A、B 的荧光淬灭数据可以用 Stern-Volmer 方程很好地拟合 (R^2 为 0.951 ~ 0.986)。随着 As(III) 的加入, 只有峰 A 的 F_0/F 值增长较为明显, 峰 B 的 F_0/F 值增长幅度较小。这说明 EPS 中的峰 A 与 As(III) 有较强的络合作用, 而峰 B 与 As(III) 络合相对较弱。结合表 1

列出了相关 Stern-Volmer 方程的拟合参数, 可以看出在 EPS 与 As(III) 络合中, 峰 A 的 K_q 值比 2.0×10^{10} 大一个数量级, 峰 B 的 K_q 值小于 2.0×10^{10} , 这说明 EPS 与 As(III) 荧光淬灭作用属于静态淬灭和动态碰撞淬灭同时存在的复合淬灭机制^[12]。

为了定量衡量 EPS 与各离子络合形成的络合物的稳定性, 荧光淬灭数据进一步用修正型 Stern-Volmer 方程 (2) 拟合,

$$F_0/(F_0 - F) = 1/f K_a [\text{As(III)}] + 1/f \quad (2)$$

式中: f 为 EPS 荧光峰被淬灭剂配位的荧光基团比例; K_a 为条件稳定常数。

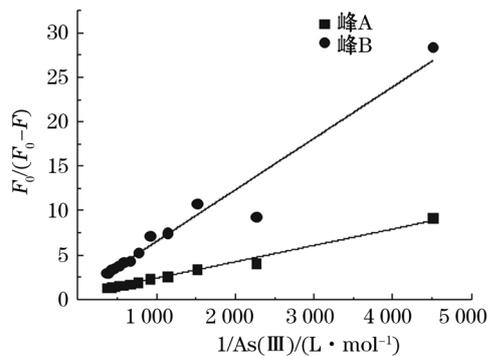


图3 EPS和As(III)络合作用的修正型 Stern-Volmer 方程拟合

Fig.3 The fitting plots for the fluorescence quenching data of EPS titrated with As(III) using the modified Stern-Volmer equation

图3为 $F_0/(F_0 - F)$ 与 $1/As(III)$ 的线性拟合结果,具有较好的线性关系(R^2 为0.962~0.985)。峰A、峰B与As作用的 lgK_a 值为2.43和2.23,明显小于与阳离子结合的条件稳定常数,这是由于EPS上大多数带负电的官能团更易于通过静电相互作用与阳离子稳定结合。朱江鹏等^[13]通过荧光淬灭滴定法研究As的有机物洛克沙肿与腐殖酸的相互作用,腐殖酸中的类富里酸荧光峰与洛克沙肿发生静态淬灭作用,55℃时, lgK_a 为2.65。这与本实验有相似的结论。但EPS与As(III)的条件稳定常数相对于EPS与重金属阳离子间的条件稳定常数要低很多。枯草芽孢杆菌的EPS与Cd(II)络合的 lgK_a 值为4.5~10.3^[14];集胞藻EPS中的类蛋白质与Cu(II)络合的 lgK_a 值为6.4~9.24^[15];pH=8.0时,嗜酸性氧化亚铁硫杆菌(ATCC23270)EPS和Hg(II)络合的 lgK_a 值为5.12~5.36^[16];pH为8时,中国科学院地球化学研究所生物膜中提取的EPS

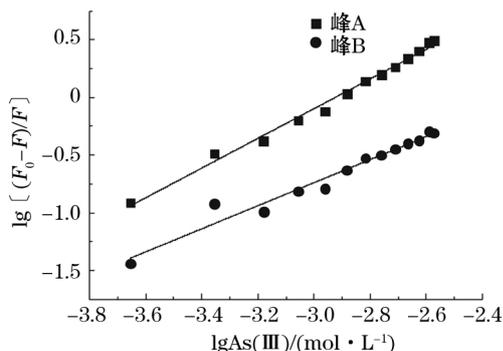


图4 EPS和As(III)络合作用的修正型 Hill 方程拟合

Fig.4 The fitting plots for the fluorescence quenching data of EPS titrated with As(III) using the modified Hill equation

与Hg(II)络合的 lgK_a 值为3.98~4.28^[5]。EPS与As(III)的淬灭常数均比EPS与其他重金属离子络合的要小,EPS与As(III)的相互作用较弱。

2.3 结合常数和结合位点数计算

为了定量衡量EPS与各离子的结合常数(K_b)和结合位点数(n),荧光淬灭数据用修正型的Hill方程(3)拟合^[17]:

$$\lg \left[\frac{F_0 - F}{F} \right] = \lg K_b + n \lg [As(III)] \quad (3)$$

式中: K_b 为结合常数; n 为结合位点数。如图4所示, $\lg \left[\frac{F_0 - F}{F} \right]$ 与 $\lg As(III)$ 有很好的线性关系($R^2 > 0.96$),As与峰A的结合位点数 n 大于1,为1.31,说明As可以与含芳环基团的蛋白质的多类位点结合,且在多类结合位点之间存在拮抗竞争作用^[15];峰B的结合位点数接近1,为0.98,说明类色氨酸物质中只有一类位点参与As(III)的络合。峰A、B相对应的荧光基团与As的结合常数 lgK_b 分别为3.82和2.22,说明As与含芳环基团的蛋白质II的结合能力比与类色氨酸物质的结合能力大一个数量级。

2.4 EPS与As(III)相互作用的热力学

图5a和5b分别为As(III)滴定EPS溶液生成的热随时间变化曲线及其Independent model拟合曲线。拟合得到的热力学参数如下:结合系数 K_a , $(1.274 \pm 0.34) \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$;焓变(ΔH)为 $-1.828 \pm 0.087 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$;熵变(ΔS)为 $80.7 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$;吉布斯自由能(ΔG)为 $-25.89 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。熵变 ΔS 为正值,说明反应体系的无序度增加。由于 $|\Delta H| \ll |T\Delta S|$ (T 为热力学温度298.15 K),说明络合反应主要为熵驱动。Sheng等^[18]研究EPS与Cu(II)络合的热力学信息表明,活性污泥EPS和Cu(II)的结合系数 K_a 值为 $(1.274 \pm 0.34) \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$,这再次说明了EPS与As(III)的络合能力要小于其与重金属阳离子的络合。Nancollas等^[19]研究Cu(II)吸附在EPS和EPS-矿物复合物的 $T\Delta S$ 值超过 $-\Delta G$ 的值,表明Cu(II)与EPS形成了内层表面络合物。Cd(II)和2个羧基和2个磷酸基配体的典型的内层络合作用的熵变为 $70 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ 和 $130 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ^[20]。本研究中,EPS-As(III)的熵变 ΔS 为 $80.7 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$,推测EPS某些羧基和磷酸基及As(III)作用可能也有内层络合物产生。负的焓变和吉布斯自由能说明EPS与As(III)相互反应是一个自发的放热反应。

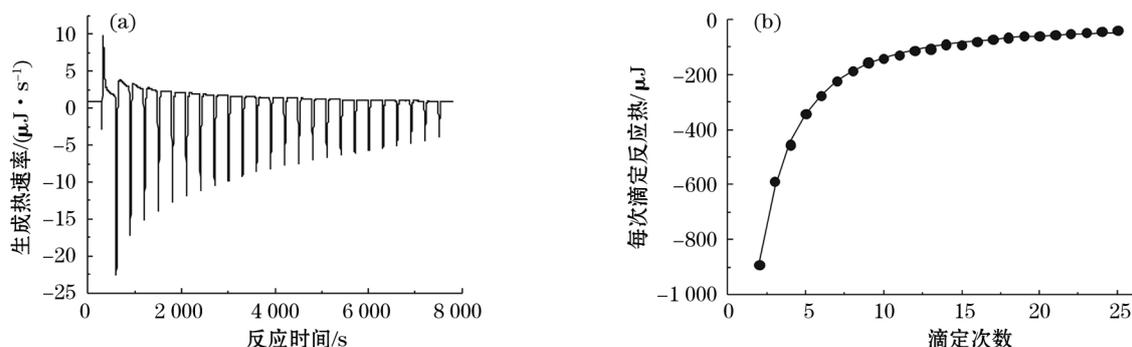


图 5 As(III) 滴定 EPS 溶液的生成热速率 - 时间曲线(a) 及 Independent 模型拟合曲线(b)

Fig. 5 The generating heat rate-time curves for the titration of As (III) into EPS solution (a) and Independent model fitting curve (b)

3 结论

排碱渠生物膜 EPS 的荧光组分主要为类蛋白质和类腐殖酸物质。EPS 与 As(III) 间的反应是一个自发的放热反应。类蛋白质与 As(III) 具有较强的结合作用, 而类腐殖酸物质与 As(III) 几乎没有结合能力。EPS 中含芳环基团的蛋白质 II 比类色氨酸物质与 As(III) 的结合能力大一个数量级, 前者与 As(III) 形成络合物的稳定性稍微大于后者。As(III) 可以与含芳环基团的蛋白质 II 的多类位点结合, 且在多类结合位点之间存在拮抗竞争关系, 而类色氨酸物质中只有一类位点参与 As 的络合。排碱渠生物膜 EPS 中的类蛋白质在 As(III) 的迁移转化及其生态风险中起着重要作用, 而 EPS 中的类腐殖酸类物质不会对 As(III) 的环境行为产生显著的影响。

参考文献(References):

- (1) 张丙乾. 新疆土壤盐碱化及其防治(J). 干旱区研究, 1993, 10(1): 55 - 61. (Zhang Bingqian. Soil salinization and its prevention in Xinjiang(J). Arid Zone Research, 1993, 10(1): 55 - 61.)
- (2) 龚子同, 陈鸿昭, 杨帆, 等. 中亚干旱区土壤地球化学和环境(J). 干旱区研究, 2017, 34(1): 1 - 9. (Gong Zitong, Chen Hongzhao, Yang Fan, et al. Pedogeochemistry and environment of arid-ol regions in Central Asia(J). Arid Zone Research, 2017, 34(1): 1 - 9.)
- (3) 林年丰, 汤洁. 我国砷中毒病区的环境特征研究(J). 地理科学, 1999, 19(2): 135 - 139. (Lin Nianfeng, Tang Jie. The study on environmental characteristics in arseniasis areas in China(J). Scientia Geographica Sinica, 1999, 19(2): 135 - 139.)
- (4) 余艳华, 蒋平安, 罗艳丽, 等. 新疆奎屯垦区土壤砷污染现状评价(J). 土壤通报, 2008, 39(6): 1 445 - 1 448. (Yu Yanhua, Jiang Ping'an, Luo Yanli, et al. Evaluation of arsenic pollution of soil in Kuitun reclamation area of Xinjiang(J). Chinese Journal of Soil Science, 2008, 39(6): 1 445 - 1 448.)
- (5) Zhang D Y, Pan X L, Mostofa K M G, et al. Complexation between Hg(II) and biofilm extracellular polymeric substances: An application of fluorescence spectroscopy(J). Journal of Hazardous Materials, 2010, 175: 359 - 365.
- (6) Aquino S F, Stuckey D C. Soluble microbial products formation in anaerobic chemostats in the presence of toxic compounds(J). Water Research, 2004, 38: 255 - 266.
- (7) Zhang D Y, Lee D J, Pan X L. Desorption of Hg(II) and Sb(V) on extracellular polymeric Substances: Effects of pH, EDTA, Ca(II) and temperature shocks(J). Bioresource Technology, 2013, 128: 711 - 715.
- (8) Sparza-Soto M, Westerhoff P K. Fluorescence spectroscopy and molecular weight distribution of extracellular polymers from full-scale activated sludge biomass(J). Water Science and Technology, 2001, 43(6): 87 - 95.
- (9) Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent(J). Journal of Biological Chemistry, 1951, 193(1): 265 - 275.
- (10) Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colori-metric method for determination of sugars and related substances(J). Analytical Chemistry, 1956, 28: 350 - 356.
- (11) Chen W, Westerhoff P K, Leenheer J A, et al. Fluorescence excitation-Emission matrix regional integration to quantify spectrafor dissolved organic matter(J). Environmental Science & Technology, 2003, 37(24): 5 701 - 5 710.
- (12) Lakowicz J R. Principles of Fluorescence Spectroscopy(M). New York: Springer-Verlag, 2006: 108 - 135.
- (13) 朱江鹏, 梅婷, 彭云, 等. 荧光猝灭法研究洛克沙肿与腐殖酸的相互作用(J). 环境科学, 2014, 35(7): 2 620 - 2 626. (Zhu Jiangpeng, Mei Ting, Peng Yun, et al. Characterizing the interaction between roxarsone and humic acid by fluorescence quenching experiment(J). Environmental Science, 2014, 35(7): 2 620 - 2 626.)
- (14) Wei X, Fang L C, Cai P, et al. Influence of extracellular polymeric substances (EPS) on Cd adsorption by bacteria(J). Environmental Pollution, 2011, 159(5): 1 369 - 1 374.

- (15) Pan X L, Liu L, Song W J, et al. Biosorption of Cu(II) to extracellular polymeric substances (EPS) from *Synechocystis* sp. : A fluorescence quenching study (J). *Frontiers of Environmental Science & Engineering* 2012 6(4) : 493 – 497.
- (16) Song W J, Deng C N, Pan X L, et al. Effects of pH shock on Hg(II) complexation by exopolymers from *Acidithiobacillus ferrooxidans* (J). *Geomicrobiology Journal* 2015 33(3/4) : 325 – 331.
- (17) Hill T L. *Cooperativity: Theory in Biochemistry* (M). New York: Springer-Verlag, 1985: 68 – 82.
- (18) Sheng G P, Xu J, Luo H W, et al. Thermodynamic analysis on the binding of heavy metals onto extracellular polymeric substances (EPS) of activated sludge (J). *Water Research* 2013 47(2) : 607 – 614.
- (19) Nancollas, George H. *Interactions in Electrolyte Solutions: Metal Complex and Ion-pair Formation in Solution* (M). New York: Amsterdam, Elsevier, 1966: 60 – 80.
- (20) Gorman L D, Fein J B, Jensen M P. Enthalpies and entropies of proton and cadmium adsorption onto *Bacillus subtilis* bacterial cells from calorimetric measurements (J). *Geochimica et Cosmochimica Acta* 2006 70: 4 862 – 4 873.

Complexation of As (III) with Extracellular Polymeric Substance from Biofilm in the Salt-discharging Channel in Kuytun, Xinjiang

LIN Qing-hua^{1, 2}, ZHANG Dao-yong^{1, 3}

(1. State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, Guizhou, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. College of Environment, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China)

Abstract: There is a heavy arsenic pollution in the salt-discharging channel due to the geological background in Kuytun, Xinjiang. The complexation between extracellular polymeric substance of the algal biofilm and As (III) influences the transportation and diffusion of arsenic and further affects the biological toxicity and the ecological risk of arsenic. At present, the effects of the widespread biofilm on the transport and fate of arsenic in channel are completely unknown. In this study, the interaction of extracellular polymeric substance of the algal biofilm and As (III) was investigated by fluorescence quenching test and isothermal titration calorimetry. The results of fluorescence quenching test showed that the fluorescent components of extracellular polymeric substance were composed of three fluorescence peaks: Peak A belonged to aromatic protein-like, Peak B belonged to soluble microbial by-product-like, and Peak C belonged to humic acid-like. Peak A and B were collectively referred to protein-like substance, and peak B was further intended to be tryptophan-like substance. There was a strong complexation between the protein-like substance and As (III), while the interaction between As (III) and the humic-like substance was ignorable. Both static quenching and dynamic collision were involved in fluorescence quenching of extracellular polymeric substance by As (III). The binding constant $\lg K_b$ for interaction of As (III) with the aromatic protein-like substance and tryptophan-like substance were 3.82 and 2.22 respectively, indicating the binding affinity of As (III) to the former is one order of magnitude greater than the latter. Multiple sites were involved in competition for binding As (III) in the aromatic protein-like substance, and only one class of binding sites were taken part in tryptophan-like substance for their complexation with As (III). The data obtained from isothermal titration calorimetry test were fitted by independent model, and the thermal dynamic parameters ΔH , ΔG and ΔS of complexation reaction were acquired. Negative enthalpy change ΔH and negative Gibbs free energy ΔG proved that the complexation between extracellular polymeric substance and the As (III) is a spontaneous exothermic reaction. The degree of disorder in the complexing reaction increases, and the reaction is driven by entropy. The protein-like substance in the biofilm in salt-discharging channel may have significant effects on environmental fate and risk of arsenic, while the role of humic acid-like substance in extracellular polymeric substance is ignorable.

Key words: salt-discharging channel; arsenic pollution; biofilm; EPS; fluorescence quenching; isothermal titration calorimetry; Kuytun; Xinjiang