

三维荧光光谱结合化学分析评价胞外多聚物的提取方法*

高景峰** 郭建秋 陈冉妮 苏 凯 彭永臻

(北京工业大学环境与能源工程学院, 北京, 100124)

摘 要 采用高速离心法、EDTA法、阳离子交换树脂法(CER)、甲醛法和甲醛+NaOH法提取普通活性污泥和好氧颗粒污泥的胞外多聚物(EPS),结合三维荧光光谱对五种方法进行评价,并对EPS中的成分进行分析。结果表明,5个EPS的三维荧光光谱峰值中,2个是类蛋白峰,2个是类富里酸峰,1个是类腐殖酸峰。匀浆对好氧颗粒污泥EPS的提取必不可少。甲醛严重干扰核酸的化学测定。透析前后的EPS提取液均应作为分析对象。单纯高速离心法无法有效提取EPS。CER法不容易造成细胞破壁,是一种比较有效的方法。虽然甲醛+NaOH法对EPS的提取量最大,但对细胞的破壁程度也最大。EDTA会导致溶胞,并严重污染EPS。甲醛+NaOH法和EDTA法都会严重干扰胞外蛋白的三维荧光光谱分析。

关键词 胞外多聚物, 三维荧光光谱, 提取, 污泥。

对胞外多聚物(EPS)通常以EPS中核酸的相对含量作为检验细胞破坏程度的标准。EPS包含大量芳香族结构和带有不同官能团的不饱和脂肪酸^[1],这些官能团具有荧光性。它们特有的荧光性质能够为EPS成分的结构、官能团和种类提供信息。三维荧光光谱已经成功用于分析不同来源的溶解性有机物^[2-4],Esparza-Soto和Yu曾采用三维荧光光谱仪分析活性污泥中易提取的溶解性EPS^[5,6]。

本试验采用高速离心法、EDTA法、阳离子交换树脂法(CER)、甲醛法、甲醛+NaOH法5种常见的EPS提取方法,以普通活性污泥和好氧颗粒污泥为研究对象,提取测定EPS中蛋白质、多糖和DNA的含量,结合三维荧光光谱,对EPS组分进行定性和定量分析,评价不同方法的提取效果。

1 EPS的提取和测定

以处理实际生活污水的普通活性污泥和好氧颗粒污泥为研究对象:普通活性污泥取自A/O脱氮中试装置,好氧颗粒污泥是在SBR反应器中培养所得,表1为五种常用的EPS提取方法。

采用日立F-4500三维荧光光谱仪对不同方法提取到的EPS进行定性和定量分析。本试验中,三维荧光光谱以0.5nm为增量从激发波长200nm扫描到450nm,以10nm为增量从发射波长250nm扫描到550nm,扫描速度为1200nm·min⁻¹。数据用Matlab7.0处理。

表 1 五种 EPS 提取方法的操作步骤

Table 1 Procedures for five EPS extraction methods

步骤	离心法 ^[7]	EDTA法 ^[7]	CER法 ^[7-9]	甲醛法 ^[7]	甲醛+NaOH法 ^[7]
1	15ml ×2	15ml ×2	15ml ×2	15ml ×2	15ml ×2
2	用1×PBS缓冲液清洗,弃去上清液。好氧颗粒污泥需要匀浆 ^[9] (980r·min ⁻¹ ,4min),其中,CER法分别采用匀浆和不匀浆两种处理进行对比,其它方法均只采用匀浆处理;普通活性污泥的五种方法均不需要匀浆。				
3	—	15ml 2% EDTA, 4, 3h	CER (70g·g ⁻¹ VSS,4) 避光, 600r·min ⁻¹ ,4h	0.06ml 36.5% 甲醛, 4, 1h	0.06ml 36.5% 甲醛, 4, 1h
4	—	—	—	—	6ml 1mol·l ⁻¹ NaOH, 4, 3h
5	4, 20000G离心, 20min				
6	0.2μm水析滤膜, 真空抽滤, 25				
7	4, 3500Dalton透析膜, 透析 24h; PBS缓冲液每 3h更换一次; 透析前后的样品均作为分析对象。				

注: 15ml ×2表示 1个样品 15ml, 每种方法作两组平行样。

2007年12月20日收稿。

*国家自然科学基金项目(50508001);北京市自然科学基金项目(8082007);北京市教育委员会科技发展计划面上项目(KM200510005020);北京市科技新星计划项目A类(2006A10)。**责任作者, E-mail: gao.jingfeng@bjut.edu.cn; 电话: 13651234794

2 依据化学测定结果评价不同 EPS提取方法

采用考马斯亮蓝法测定胞外蛋白质，以牛血清蛋白作为标准液；采用苯酚 硫酸法测定胞外多糖，以葡萄糖为标准液；采用二苯胺比色法测定核酸，以脱氧核糖核酸为标准液。

每种方法做两组平行。普通活性污泥和好氧颗粒污泥的胞外蛋白、多糖和核酸含量平均值见表 2

表 2 单位质量污泥 EPS组分含量 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{VSS}$)

Table 2 Constituents of EPS in each gram of sludge

提取方法	蛋白质		多糖		核酸		
	透析前	透析后	透析前	透析后	透析前	透析后	
普通活性 污泥	离心	8.45	8.14	2.08	1.35	0.01	0.01
	EDTA	13.71	11.57	20.49	15.39	0.81	0.04
	CER	21.00	20.57	5.39	2.69	0.11	0.06
	甲醛	16.46	15.19	15.60	14.81	0.12	0.01
	甲醛 +NaOH	30.73	21.09	23.07	18.57	0.91	0.17
好氧颗粒 污泥	离心	6.84	6.44	1.99	1.24	0.03	0.03
	EDTA	122.21	99.35	22.11	13.10	0.68	0.10
	CER, 匀浆	151.20	149.70	19.98	15.45	0.13	0.13
	CER, 不匀浆	14.00	12.00	14.60	13.29	0.12	0.06
	甲醛	77.68	70.37	18.56	17.14	0.05	0.03
	甲醛 +NaOH	209.60	171.70	92.10	65.11	0.58	0.41

2.1 基本操作步骤对 EPS提取的影响

匀浆的目的是使微生物聚集体能够充分分散，以利于 EPS的充分提取。在本实验中，只对好氧颗粒污泥采用匀浆。因为普通活性污泥已经很分散，具有较大的比表面积，能够充分与药剂和树脂等接触，如果进行匀浆，反而容易破坏絮体细胞。而好氧颗粒污泥的比表面积相对较小，颗粒的大小直接影响微生物与药剂和树脂的接触。采用 CER法分别对匀浆和不匀浆进行对比，匀浆后提取到的蛋白质和多糖均高于不匀浆所得(表 2)。

Frolund^[8]和 McSwain^[9]在 EPS提取过程中均没有采用透析，而 Liu^[7]在六种提取方法中都采用了透析。本试验中五种提取方法均采用透析，透析的主要目的是去除甲醛等提取剂，以避免其对 EPS组分的测定产生影响。但透析会使样品浓度发生少许的变化。由表 2可以看出：透析后较透析前 EPS组分的含量有所减小。对于 EDTA法、甲醛法和甲醛 +NaOH法，透析后核酸含量大幅度减小，说明甲醛和 EDTA分子严重干扰核酸的化学测定。

2.2 各提取方法的优劣

高速离心在 EPS的提取中是必不可少的一步。对比普通活性污泥和好氧颗粒污泥的 EPS数据可以看出，离心法对普通活性污泥 EPS的提取有一定效果，而对好氧颗粒污泥 EPS的提取效果不好。由此推断，普通活性污泥 EPS结合较为松散，容易脱落，而好氧颗粒污泥 EPS的结合紧密，不容易被提取，EPS对污泥好氧颗粒化起到很大作用。由表 2可以看出，与离心法相比，其它方法对两种污泥 EPS的提取量都很低，单纯采用高速离心法不能够有效地提取 EPS，需要进一步对样品进行化学或物理处理，破坏 EPS与细胞的结合。

EDTA法对 EPS的提取能力比高速离心法高，透析前核酸的含量远高于透析后，次于甲醛 +NaOH法。这主要是由于 EDTA可以去除细胞膜上的阳离子，导致溶胞从而使得核酸的含量较高^[11]。

CER法对细胞的破壁程度较小。从提取到的蛋白质和多糖含量可以看出，CER法对 EPS有一定的提取效果，较甲醛 +NaOH法略小。

甲醛法和甲醛 +NaOH法的区别在于是否加 NaOH，但提取结果却有很大的不同。由表 2可知，甲醛法透析前后核酸含量变化较大，说明甲醛严重干扰二苯胺法测定核酸。

甲醛 +NaOH法是在样品中加入适量的 NaOH，使 pH值升高，导致 EPS酸性基团裂解，并与 EPS

的阴离子基团互相排斥, 因此, EPS水溶性增加提取量也更多^[1]. 从表 2可以看出, 无论是普通活性污泥还是好氧颗粒污泥, 甲醛 +NaOH法提取到的 EPS含量相对于其它方法要高, 但是较高的核酸含量说明 NaOH对细胞的破壁作用较大.

3 依据三维荧光光谱分析结果评价不同 EPS提取方法

一般而言, 天然环境中各种溶解有机质激发/发射(Ex/Em)荧光峰的位置可以归纳为: (1) Peak A: Ex/Em = 225—240/340—350nm; (2) Peak B: Ex/Em = 240—270/370—440nm; (3) Peak C: Ex/Em = 260—290/300—350nm; (4) Peak D: Ex/Em = 310—360/370—450nm; (5) Peak E: Ex/Em = 350—440/430—510nm. 其中, (1)和(3)为类蛋白荧光峰, (2)和(4)为类富里酸荧光峰, (5)为类腐殖酸荧光峰^[2,6,10-13]. 三维荧光光谱图中最主要的峰点归纳为表 3和表 4. 图 1和图 2分别为普通活性污泥和好氧颗粒污泥用不同方法提取的 EPS的三维荧光光谱图.

表 3 普通活性污泥 EPS三维荧光光谱分析结果

Table 3 Fluorescence spectra parameters of normal activated sludge EPS samples

普通活性 污泥	Peak A		Peak C		Peak D		H _A /VSS	H _C /VSS	H _D /VSS
	Ex/Em	H _A	Ex/Em	H _C	Ex/Em	H _D			
离心 ^{a)}	240.0/353.0	217.9	280.0/355.0	244.8	330.0/413.0	246.9	4.27	4.80	4.84
离心透析	230.0/341.0	196.6	280.0/341.0	97.5	—	—	3.86	1.91	—
EDTA	—	—	280.0/446.0	170.4	360.0/446.0	297.2	—	3.34	5.83
EDTA透析 ^{b)}	230.0/343.0	222.6	280.0/340.0	117.5	—	—	4.36	2.30	—
CER	230.0/341.0	281.7	280.0/348.0	184.3	300.0/408.0	177	18.4	12.0	11.6
CER透析	230.0/340.0	203.4	280.0/338.0	117.2	—	—	13.3	7.66	—
甲醛 ^{c)}	240.0/361.0	299.8	280.0/352.0	476.2	330.0/406.0	280.8	5.88	9.34	5.50
甲醛透析	230.0/339.0	211.3	280.0/339.0	115.1	—	—	4.14	2.26	—
甲醛 +NaOH ^{d)}	—	—	—	—	320.0/388.0	1955	—	—	38.3
甲醛 +NaOH透析	230.0/347.0	980.4	280.0/344.0	1768	—	—	19.2	34.7	—

注: a) 离心法在透析前还有 Peak B 250.0/435.0, 284.7; b) EDTA法透析后还有 Peak B 240.0/413.0, 90.64; c) 甲醛法在透析前还有 Peak B 250.0/444.0, 303.7; d) 甲醛 +NaOH法在透析前还有 Peak B 240.0/379.0, 97.58和 Peak E 410.0/470.0, 237.3.

表 4 好氧颗粒污泥三维荧光光谱分析结果

Table 4 Fluorescence spectra parameters of aerobic granular sludge EPS samples

好氧颗粒 污泥	Peak A		Peak C		Peak D		H _A /VSS	H _C /VSS	H _D /VSS
	Ex/Em	H _A	Ex/Em	H _C	Ex/Em	H _D			
离心	230.0/347.0	200.7	280.0/351.0	363.9	340.0/445.0	112.9	7.84	14.2	4.41
离心透析	230.0/338.0	118.8	280.0/333.0	143.1	—	—	4.64	5.59	—
EDTA ^{a)}	—	—	—	—	—	—	—	—	—
EDTA透析 ^{b)}	230.0/335.0	163.4	280.0/333.0	160.3	—	—	6.38	6.26	—
CER不匀浆 ^{c)}	230.0/326.0	174.1	280.0/342.0	217.9	340.0/416.0	121.7	22.6	28.3	15.8
CER不匀浆透析	230.0/292.0	186.6	280.0/338.0	130.4	—	—	24.3	16.9	—
CER匀浆 ^{d)}	230.0/333.0	232.5	280.0/342.0	263.3	340.0/418.0	118.2	30.2	34.2	15.4
CER匀浆, 透析	230.0/295.0	269.7	280.0/335.0	171.0	—	—	35.0	22.2	—
甲醛	230.0/345.0	346.4	280.0/351.0	589.5	340.0/438.0	96.85	13.5	23.0	3.78
甲醛透析	230.0/332.0	213.3	280.0/338.0	169.4	—	—	8.33	6.62	—
甲醛 +NaOH ^{e)}	—	—	—	—	320.0/390.0	1609	—	—	62.9
甲醛 +NaOH透析	240.0/347.0	363.6	290.0/345.0	1682	—	—	14.2	65.7	—

注: a) EDTA法透析前只有 Peak E 370.0/452.0, 190.2; b) EDTA法在透析后还有 Peak B 240.0/418.0, 95.35; c) CER法(不匀浆)在透析前还有 Peak B 240.0/441.0, 87.28; d) CER法(匀浆)在透析前还有 Peak B 240.0/439.0, 88.17; e) 甲醛 +NaOH法在透析前还在 Peak E 420.0/468.0, 330.8.

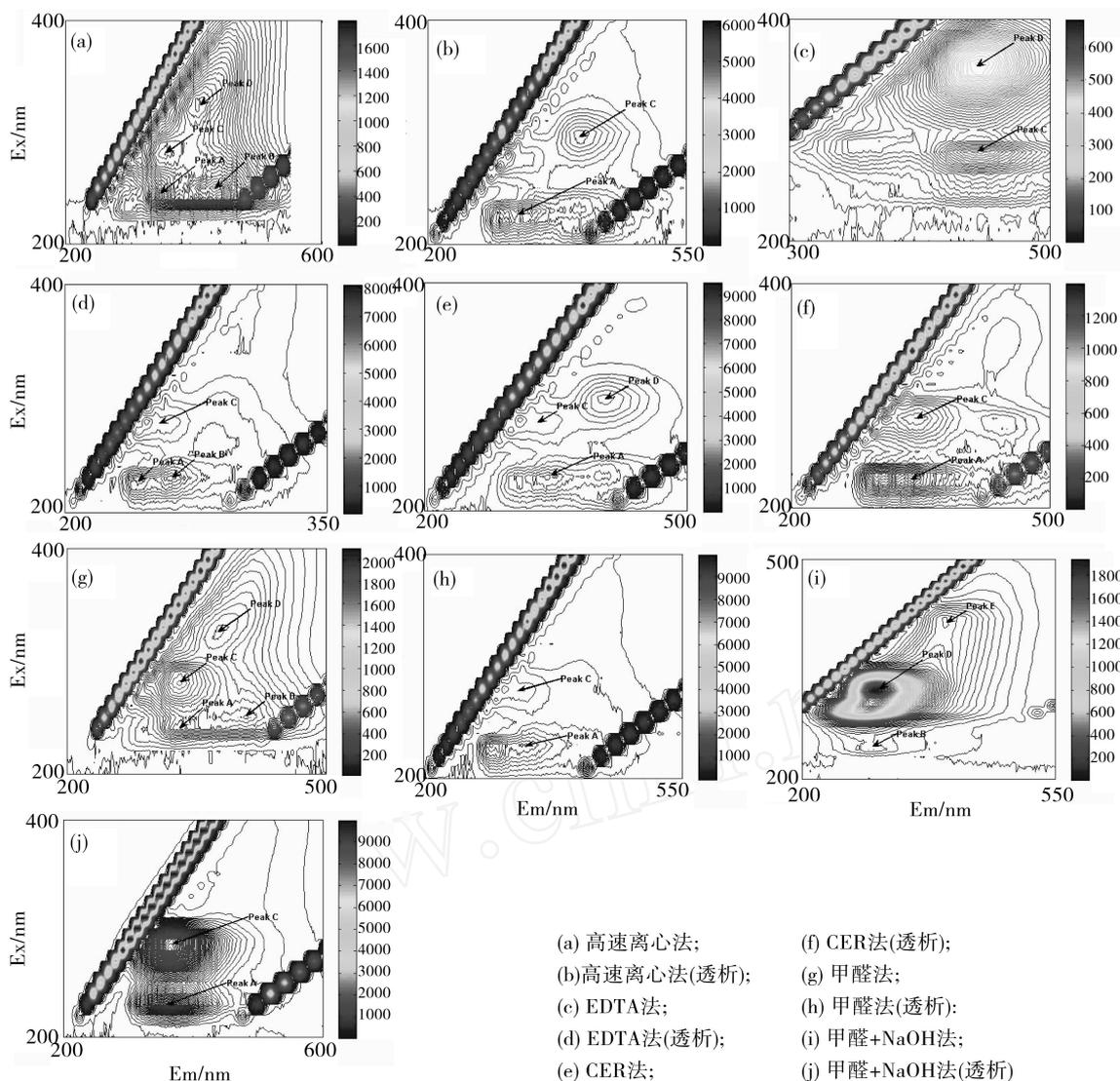


图 1 不同方法提取普通活性污泥 EPS 的三维荧光光谱图

Fig. 1 EEM fluorescence spectra of normal activated sludge EPS for the different extraction methods

透析对三维荧光光谱有较大的影响，对于不同的方法其影响不同。表 5 归纳了五种提取方法透析前后三维荧光光谱峰点的位置变化。

由表 5 可见，无论是普通活性污泥还是好氧颗粒污泥（EDTA 法除外，透析前 EPS 三维荧光光谱的峰点除了类蛋白质峰 Peak A 和 Peak C 外，还出现了 Peak B，Peak D 和 Peak E，分别为类富里酸峰和类腐殖酸峰）。透析后峰点种类发生了变化，Peak B，Peak D 和 Peak E 消失，只出现 Peak A 和 Peak C，这是由于在透析过程中，分子量相对较小的富里酸和腐殖酸发生了转移。

高速离心法为物理法，不干扰三维荧光光谱；CER 法和甲醛法均不干扰胞外蛋白的测定，适合采用三维荧光光谱分析。

对于 EDTA 法，透析前普通活性污泥的三维荧光光谱图中只有 Peak C 和 Peak D，好氧颗粒污泥的三维荧光光谱图中只有 Peak E；透析后两种污泥的三维荧光光谱图中均含有 Peak A，Peak B 和 Peak C。说明 EDTA 对胞外蛋白的三维荧光光谱分析有干扰。

Comte 通过化学分析结合红外光谱分析表明，EDTA 会对提取到的 EPS 造成污染^[14]，从而造成 EPS 中类腐殖酸和类富里酸物质分析困难。实际上是 EDTA^[7]、类腐殖酸和类富里酸^[15]都会与金属离子形成稳定的复杂化合物，从而无法进行有效透析，造成三维荧光光谱在透析前后的规律与其它方法不同。三维荧光光谱结合化学分析表明，不提倡使用 EDTA 法。

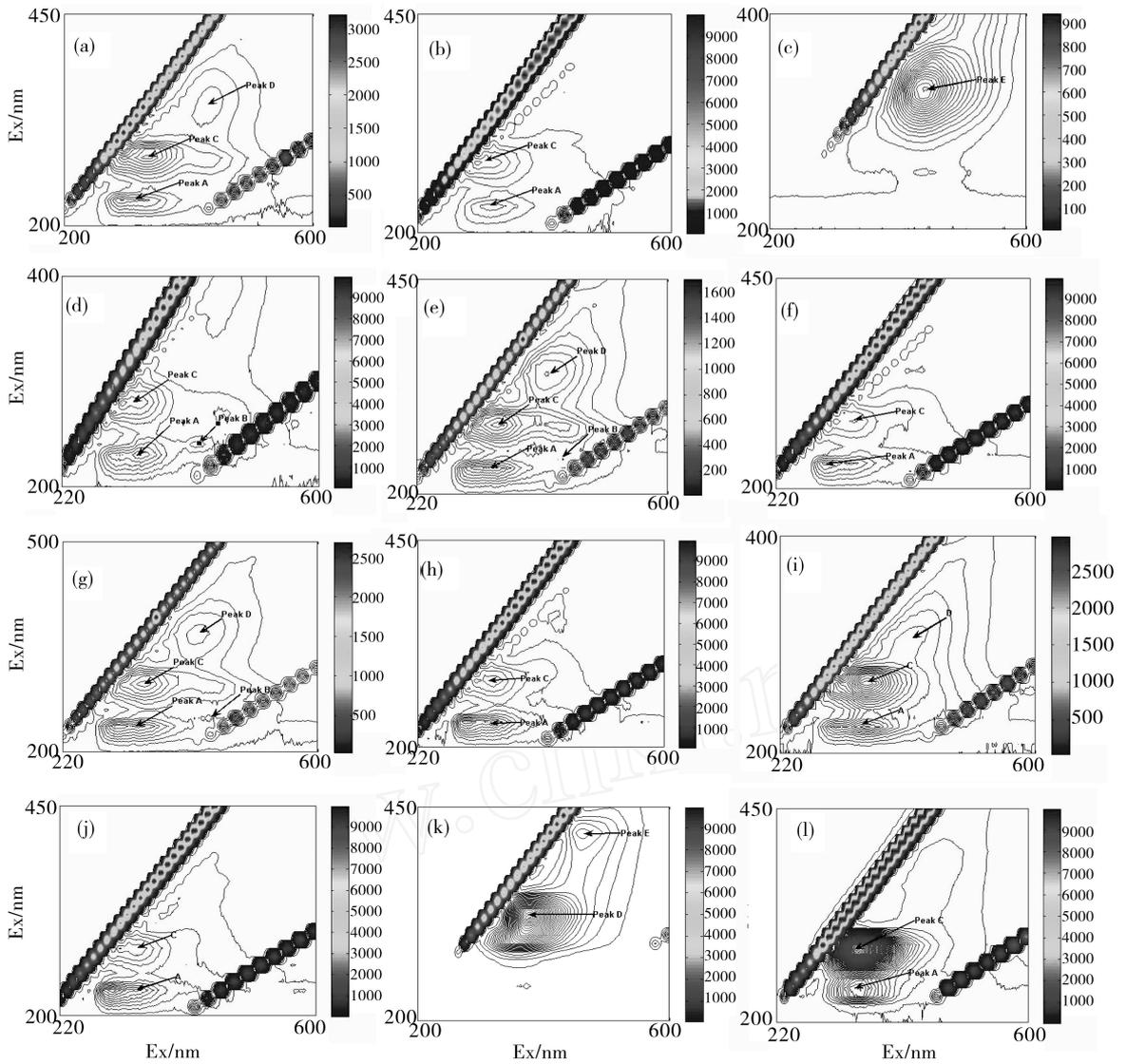


图 2 不同方法提取好氧颗粒污泥 EPS的三维荧光光谱图

(a) 高速离心法; (b) 高速离心法 (透析); (c) EDTA法; (d) EDTA法 (透析); (e) CER法 (不匀浆);
 (f) CER法 (不匀浆+透析); (g) CER法 (匀浆); (h) CER法 (匀浆+透析); (i) 甲醛法; (j) 甲醛法 (透析);
 (k) 甲醛+NaOH法; (l) 甲醛+NaOH法 (透析)

Fig. 2 EEM fluorescence spectra of aerobic granular sludge EPS for the different extraction methods

表 5 透析前后三维荧光光谱峰点位置变化

Table 5 The change of the peak location of EEM fluorescence spectra

污泥类型	提取方法	透析前	透析后
普通活性污泥	高速离心法	Peak A, Peak B, Peak C, Peak D	Peak A, Peak C
	EDTA法	Peak C, Peak D	Peak A, Peak B, Peak C
	CER法	Peak A, Peak C, Peak D	Peak A, Peak C
	甲醛法	Peak A, Peak B, Peak C, Peak D	Peak A, Peak C
	甲醛+NaOH法	Peak B, Peak D, Peak E	Peak A, Peak C
好氧颗粒污泥	高速离心法	Peak A, Peak C, Peak D	Peak A, Peak C
	EDTA法	Peak E	Peak A, Peak B, Peak C
	CER法 (不匀浆)	Peak A, Peak B, Peak C, Peak D	Peak A, Peak C
	CER法 (匀浆)	Peak A, Peak B, Peak C, Peak D	Peak A, Peak C
	甲醛法	Peak A, Peak C, Peak D	Peak A, Peak C
	甲醛+NaOH法	Peak D, Peak E	Peak A, Peak C

相对于甲醛法, 甲醛 + NaOH法的三维荧光光谱中, Peak A和 Peak C只在透析后出现, 而甲醛法在透析前后的三维荧光光谱图中, 均出现了 Peak A和 Peak C, 说明 NaOH对 EPS胞外蛋白的三维荧光光谱分析有干扰. 因此, 甲醛 + NaOH法不适合结合三维荧光光谱使用.

三维荧光光谱结果表明, EPS组分中除了含有蛋白质、多糖和核酸外, 还存在一定量的富里酸和腐殖酸; 透析前后的样品均应作为分析对象, 以确定所选提取方法是否存在干扰三维荧光光谱分析的物质, 从而导致特征峰透析前后不同; 由表 3和表 4也可以看出, 三维荧光光谱的峰值在透析后均有所减小, 这是由于透析造成 EPS成分流失, 因此, 透析前的样品更能说明 EPS的组分和含量.

由于 EPS中所含蛋白质的种类和含量不同, 各种蛋白质所含有的氨基酸基团也不同, 同一种蛋白质可能含有不同发光基团和不发光基团, EPS中腐殖酸和富里酸的种类和含量亦不同, 不同提取方法还存在各自的干扰, 三维荧光光谱无法表征胞外多糖, 因此, 无法对表 3和表 4中三维荧光光谱的分析结果与表 2中化学分析的结果进行绝对定量分析比较. 但是三维荧光光谱可以作为半定量手段进行相对分析. 在不考虑 EDTA法和甲醛 + NaOH法的前提下, 通过对表 3和表 4中的单位污泥量的峰值取和进行比较分析发现, 不论透析前后, 按 EPS提取量大小排序均为: CER法、甲醛法和高速离心法; 好氧颗粒污泥 EPS大于普通活性污泥的 EPS; 经过匀浆的好氧颗粒污泥 EPS类蛋白质峰值较不匀浆的有明显增加, 富里酸和腐殖酸峰值变化不大, 对结构比较紧密的好氧颗粒污泥而言匀浆必不可少. 相对于化学分析, 该法对 EPS成分和含量的确定具有操作简单、结果稳定直观、相对误差小等明显优点.

综上所述, 不同 EPS提取方法中, 单纯高速离心无法有效提取 EPS 匀浆对于 EPS同细胞结合紧密的污泥 (如好氧颗粒污泥) 是非常必要的一步. 甲醛会严重干扰核酸的测定. 透析旨在消除甲醛和 EDTA等提取剂对 EPS测定及其对三维荧光光谱的干扰, 但在透析后富里酸和腐殖酸流失, 透析前的样品更能说明 EPS的组分和含量, 以透析前后的 EPS样品均作为分析对象, 可以确定所采用的方法是否适合结合三维荧光光谱使用. CER法对细胞壁的破坏作用相对较小, 并且对三维荧光光谱没有干扰. 甲醛 + NaOH法是五种方法中对 EPS提取量最高的一种方法, 但 NaOH对细胞破壁严重; 在 NaOH的干扰下, 透析前无类蛋白峰, 只有类富里酸峰和类腐殖酸峰, 透析后只有 2个类蛋白峰, 其它峰部分或全部消失. EDTA会导致溶胞, 污染 EPS, 干扰化学测定; 在 EDTA的干扰下, 不同污泥透析前峰值类型混乱; 透析后出现 2个类蛋白峰和 1个类腐殖酸峰. 高速离心法、CER法和甲醛法适合结合三维荧光光谱法分析; 而 EDTA法和甲醛 + NaOH法不适合. 由此可见, 化学分析结合三维荧光光谱分析, 不论透析前后, 按 EPS提取量大小排序均为: CER法、甲醛法、高速离心法; 好氧颗粒污泥 EPS大于普通活性污泥的 EPS; 因此, 三维荧光光谱对 EPS成分和含量的确定具有操作简单、结果稳定直观、相对误差小等明显优点.

参 考 文 献

- [1] Wingender J, Neu TR, Flemming H C, Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structures and Function [M]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1999
- [2] Coble P G, Characterization of Marine and Terrestrial DOM in Seawater Using Excitation Emission Matrix Spectroscopy [J]. *Marine Chemistry*, 1996, 51 (4) 325—346
- [3] Reynolds D M, The differentiation of Biodegradable and Non-biodegradable Dissolved Organic Matter in Waste Waters Using Fluorescence Spectroscopy [J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2002, 77 (8) 965—972
- [4] Her N, Amy G, McKnight D et al, Characterization of DOM as a Function of MW by Fluorescence EEM and HPLC-SEC Using UVA, DOC, and Fluorescence Detection [J]. *Water Research*, 2003, 37 (17) 4295—4303
- [5] Esparza-Soto M, Westerhoff P K, Fluorescence Spectroscopy and Molecular Weight Distribution of Extracellular Polymers from Full-scale Activated Sludge Biomass [J]. *Water Science & Technology*, 2001, 43 (6) 87—95
- [6] Sheng G P, Yu H Q, Characterization of Extracellular Polymeric Substances of Aerobic and Anaerobic Sludge Using Three-Dimensional Excitation and Emission Matrix Fluorescence Spectroscopy [J]. *Water Research*, 2006, 40 (6) 1233—1239
- [7] Liu H, Fang H P, Extraction of Extracellular Polymeric Substances (EPS) of Sludges [J]. *Journal of Biotechnology*, 2002, 95 (3) 249—256
- [8] Frølund B, Palmgren R, Keiding K et al, Extraction of Extracellular Polymers from Activated Sludge Using a Cation Exchange Resin [J]. *Water Research*, 1996, 30 (8) 1749—1758

- [9] McSwain B S, Irvine R L, Hausner M et al , Composition and Distribution of Extracellular Polymeric Substances in Aerobic Flocs and Granular Sludge [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2005, **71** (2) 1051—1057
- [10] Wu F C, Tanoue E, Molecular Mass Distributions and Fluorescence Characteristics of Organic Ligands for Copper() in Lake Biwa, Japan [J]. *Organic Geochemistry*, 2001, **32** (1) 11—20
- [11] Wu F C, Tanoue E, Isolation and Partial Characterization of Dissolved Copper-Complexing Ligands in Streamwaters [J]. *Environmental Science & Technology*, 2001, **35** (18) 3646—3652
- [12] Baker A, Fluorescence Properties of Some Farm Wasters: Implications for Water Quality Monitoring [J]. *Water Research*, 2002, **36** (1) 189—195
- [13] Leenheer J A, Crou J P, Characterizing Aquatic Dissolved Organic Matter [J]. *Environmental Science & Technology*, 2003, **37** (1) 19—26
- [14] Comte S, Guibaud G, Baudu M, Relations between Extraction Protocols for Activated Sludge Extracellular Polymeric Substances (EPS) and EPS Complexation Properties Part I Comparison of the Efficiency of Eight EPS Extraction Methods [J]. *Enzyme & Microbial Technology*, 2006, **38** (1—2) 237—245
- [15] Van den Bergh J, Jakubowski B et al , Investigations on the Conditional Kinetic and Thermodynamic Stability of Aquatic Humic Substance Metal Complexes by Means of EDTA Exchange, Ultrafiltration and Atomic Spectrometry [J]. *Talanta*, 2001, **55** (3) 587—593

COMPARISON OF THE EFFICIENCY OF FIVE EXTRACELLULAR POLYMERIC SUBSTANCES (EPS) EXTRACTION METHODS USING THREE DIMENSIONAL EXCITATION AND EMISSION MATRIX (EEM) FLUORESCENCE SPECTROSCOPY TOGETHER WITH CHEMICAL ANALYSIS

GAO Jing-feng GUO Jian-qiu CHEN Ran-ni SU Kai PENG Yong-zhen
(College of Environmental and Energy Engineering, Beijing University of Technology, Beijing, 100124, China)

ABSTRACT

The efficiency of five extracellular polymeric substances (EPS) extraction methods was compared on normal activated sludge and aerobic granular sludge using three-dimensional excitation and emission matrix (EEM) fluorescence spectroscopy. Three chemical methods (EDTA, formaldehyde, formaldehyde plus NaOH), one physical method (cation exchange resin) and a control method (high speed centrifugation) were tested. Five fluorescence peaks were identified in EEM fluorescence spectra of the EPS samples. Two peaks were attributed to the protein-like fluorophores, two peaks were attributed to the fulvic-like fluorophores and one peak to the humic-like substance. Homogenization is absolutely necessary for the extraction of EPS from aerobic granular sludge. Formaldehyde interfered with DNA content determination. Extract residues should be removed from EPS by dialysis membrane filtration to avoid EPS contamination. Compared with the other four methods, the extraction ability of high speed centrifugation was relatively ineffective; the CER method was a correspondingly effective method which was gentler and did not cause cell lysis; although the formaldehyde plus NaOH method was most effective in extracting EPS, the quantity of DNA was the highest. EPS contamination due to NaOH and EDTA was pointed out by EEM fluorescence spectroscopy analysis.

Keywords: extracellular polymeric substances (EPS), three-dimensional excitation and emission matrix (EEM) fluorescence spectroscopy, extraction, sludge