

## 研究报告

红球菌 HX-2 所产胞外多糖的特性和对  $\text{Cu}^{2+}$  的吸附

关志国 王晓花 常世辉 赵伟 张琪 罗泽天 胡宇辰 胡鑫 黄磊\*

天津理工大学化学化工学院 天津 300384

**摘要:**【背景】目前,微生物所产胞外多糖(exopolysaccharide, EPS)的理化性质及其在重金属吸附中的应用受到了广泛关注。【目的】研究红球菌 HX-2 所产胞外多糖的理化性质,并探究其对重金属的吸附情况。【方法】使用离子交换和凝胶色谱分离法对胞外多糖粗品进行纯化;利用苯酚硫酸法测胞外多糖中糖含量;用 Bradford 试剂盒检测胞外多糖中蛋白含量;使用甲醇萃取法检测胞外多糖中脂质含量;用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法分析胞外多糖中单糖组成;用扫描电镜(scanning electron microscopy, SEM)法观察多糖表面形态;通过等温吸附模型和动力学模型探究胞外多糖对重金属的吸附效果。【结果】测得胞外多糖主要成分 EPS-G-1 中总糖含量为 78.43%,蛋白含量为 8.31%,脂质含量为 8.22%;纯化后胞外多糖中单糖组成为葡萄糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖醛酸和岩藻糖,质量比为 27.31:26.67:24.83:15.85:4.80;通过等温吸附模型拟合得到 HX-2 所产胞外多糖对  $\text{Cu}^{2+}$  的最大吸附量为 144.93 mg/g。【结论】红球菌 HX-2 所产胞外多糖对水体中  $\text{Cu}^{2+}$  具有良好的吸附作用,可用于工业废水中重金属离子的处理。

关键词:红球菌,胞外多糖,吸附,  $\text{Cu}^{2+}$ 

## Adsorption of $\text{Cu}^{2+}$ by exopolysaccharide from *Rhodococcus* sp. HX-2

GUAN Zhi-Guo WANG Xiao-Hua CHANG Shi-Hui ZHAO Wei ZHANG Qi  
LUO Ze-Tian HU Yu-Chen HU Xin HUANG Lei\*

School of Chemistry and Chemical Engineering, Tianjin University of Technology, Tianjin 300384, China

**Abstract:** [Background] At present, the physicochemical properties of exopolysaccharide (EPS) produced by microorganisms and their application in heavy metal adsorption have been widely concerned. [Objective] The physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Rhodococcus* sp. HX-2 was studied and the adsorption of heavy metals by exopolysaccharide was investigated. [Methods] The crude exopolysaccharide was purified by ion exchange and gel chromatography. Sugar content was

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (21777113); Tianjin Research Program of Application Foundation and Advanced Technology (15JCQNJC08800); Tianjin Undergraduate Training Programs for Innovation and Entrepreneurship (201810060147, 201910060142); Tianjin Training Project of the Innovation Team of Colleges and Universities

\*Corresponding author: Tel: 86-22-60214259; E-mail: huanglei@tjut.edu.cn

Received: 10-12-2019; Accepted: 04-05-2020; Published online: 26-05-2020

基金项目: 国家自然科学基金(21777113); 天津市应用基础及前沿技术研究计划(15JCQNJC08800); 天津市大学生创新创业训练计划(201810060147, 201910060142); 天津市高校创新团队培训项目

\*通信作者: Tel: 022-60214259; E-mail: huanglei@tjut.edu.cn

收稿日期: 2019-12-10; 接受日期: 2020-05-04; 网络首发日期: 2020-05-26

measured by phenol-sulfuric acid method. Protein content was determined by using the Bradford kit. Lipid content was measured by methanol extraction method. Monosaccharide composition was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). The surface morphology was observed by scanning electron microscopy (SEM). The adsorption effect of exopolysaccharide on heavy metals was studied by isothermal adsorption model and kinetic model. **[Results]** The total sugar content, protein content and lipid content of the EPS-G-1 produced by HX-2 were 78.43%, 8.31% and 8.22%, respectively. After purification, the monosaccharide of exopolysaccharide was composed of glucose, mannose, galactose, glucuronic acid and fucose; the mass ratio was 27.31:26.67:24.83:15.85:4.80, respectively. The maximum adsorption capacity of exopolysaccharide produced by HX-2 to  $\text{Cu}^{2+}$  was 144.93 mg/g by isothermal adsorption model fitting. **[Conclusion]** The exopolysaccharide produced by HX-2 has favourable adsorption effect on  $\text{Cu}^{2+}$  in water and can be used for the treatment of heavy metal ions in industrial wastewater.

**Keywords:** *Rhodococcus* sp., Exopolysaccharide, Adsorption,  $\text{Cu}^{2+}$

胞外多糖(exopolysaccharide, EPS)是微生物在生长代谢过程中分泌到细胞外常溶于培养基的糖类化合物。胞外多糖是自然界中一种高分子量、可生物降解的聚合物,具有多种生理功能<sup>[1]</sup>。由于胞外多糖具有无毒性、抗氧化性、抗肿瘤活性、稳定性、乳化性、增稠性和抑菌效果等,已引起研究者的广泛关注<sup>[2-4]</sup>。胞外多糖还可以保护细胞免受抗生素、有毒金属、吞噬作用和其他不利因素的影响<sup>[5-6]</sup>。研究表明,胞外多糖因具有三维空间结构,所以具有较强的结合重金属的能力<sup>[7-9]</sup>,对保护生物物质免受重金属影响起到关键的作用。

重金属污染对环境的危害已成为全球普遍关注的问题,造纸、炼油、石化、钢铁和汽车工业的不断发展产生了大量有毒有害的重金属,这些重金属倘若未经处理直接排放到河流中,会对环境造成严重的危害。根据世界卫生组织统计, $\text{Cu}^{2+}$ 是最受关注的有毒重金属之一,由于其对生态环境具有较大的毒性,所以必须对其进行处理,以降低对环境的危害。由于重金属离子具有无法被生物降解的特性,因此只能采取吸附的手段去除<sup>[6,10-11]</sup>。

截至目前,研究者们已经研究了很多微生物所产胞外多糖的性质<sup>[12]</sup>。不同微生物产生的胞外多糖结构不同,导致其具有不同的生理学特性及功能<sup>[13]</sup>。胞外多糖一般由葡萄糖、半乳糖、岩藻

糖、木糖、阿拉伯糖、鼠李糖、甘露糖、果糖和糖类衍生物组成。Abid 等对 *Bacillus tequilensis* 所产的胞外多糖进行了化学分析,结果表明其由果糖、葡萄糖、甘露糖、半乳糖、半乳糖胺和 N-乙酰氨基葡萄糖组成<sup>[14]</sup>。Upadhyay 等研究表明,从一株 *Bacillus licheniformis* 中提取的胞外多糖能有效地吸附汞,吸附过程符合 Freundlich 等温吸附模型<sup>[15]</sup>。Venkatesh 等发现 *Enterococcus faecalis* 所产的胞外多糖可以高效吸附重金属  $\text{Zn}^{2+}$  (515.78±0.7 mg/g)、 $\text{Pb}^{2+}$  (424.42±0.9 mg/g)、 $\text{Cd}^{2+}$  (334.4±14 mg/g)和  $\text{Cu}^{2+}$  (232.9±0.3 mg/g)<sup>[16]</sup>。Li 等也研究发现, *Athelia rolfsii* 所产的胞外多糖对  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 和  $\text{Zn}^{2+}$ 具有较好的清除效果,吸附过程符合 Langmuir 等温吸附模型<sup>[17]</sup>。

然而,红球菌所产胞外多糖对重金属吸附的研究至今仍未见报道。本研究对红球菌 HX-2 所产胞外多糖 EPS-G 的性质及重金属吸附进行了研究。使用离子交换和凝胶色谱分离法对胞外多糖进行纯化。随后,通过高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)、傅立叶变换红外光谱、扫描电镜(scanning electron microscopy, SEM)对纯化后胞外多糖的化学结构和理化性质进行了表征。随后进一步探究了 EPS-G 对水体中  $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附情况,证实了 EPS-G 在处理工业废水中重金属离子方面的潜在应用价值。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要试剂、仪器及培养基

Bradford 试剂盒, 北京百奥莱博科技有限公司; 瓜尔豆胶、黄原胶、三赞胶, 恒山化工有限公司; 其他化学试剂均为国产分析纯。高效液相色谱仪, 日立(中国)有限公司; 场发射扫描电镜, 北京欧波同光学技术有限公司; Nicolet iS10 傅立叶变换红外光谱, 上海泽权仪器设备有限公司(泽泉国际集团)。

多糖培养基(g/L): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.50, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.48, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4.00, MgSO<sub>4</sub> 0.70, 酵母粉 0.01, NaCl 10.00, 柠檬酸钠 6.00, pH 8.0。

### 1.2 实验菌株

本实验室分离保藏的一株石油污染降解菌 *Rhodococcus* sp. HX-2<sup>[18]</sup>。

### 1.3 HX-2 所产胞外多糖的分离纯化

#### 1.3.1 胞外多糖的提取工艺

依照 Liu 等<sup>[19]</sup>的提取方法稍作修改: 在多糖培养基中按 2% (体积比)接种量接种菌株 HX-2, 25 °C、200 r/min 培养 72 h; 随后将培养基在 90 °C 下加热 15 min 使酶失活, 4 °C、10 000×g 离心 15 min 收集上清; 在上清液中加入 70% (质量体积比)三氯乙酸使其终浓度为 15% (质量体积比), 4 °C 搅拌 12 h, 11 000×g 离心 20 min 移除蛋白; 在上清液中加入 3 倍体积预冷的 95% (体积比)乙醇, 沉淀过夜, 4 °C、10 000×g 离心 20 min 收集多糖沉淀; 将所得沉淀溶于超纯水置于透析袋中(截留分子量 14 000 Da), 4 °C 透析 2 d, 每 8 h 换水一次, 将透析后所得 EPS 冷冻干燥, 得胞外多糖粗品, 命名为 EPS-G。

#### 1.3.2 EPS-G 的纯化

使用 DEAE 纤维素离子交换层析柱(3×12 cm, 0.45 μm)对所得 EPS-G 粗品进行分离纯化, 依次使用 0%、3%、6%、9% NaCl (质量体积比)溶液进行梯度洗脱, 利用苯酚-硫酸法检测含糖试管, 收集、透析并冷冻干燥。

使用 Sephadex G100 凝胶过滤层析柱(1×

60 cm, 0.45 μm)对 EPS-G 进行进一步纯化, 用超纯水洗脱, 将含糖部分收集、透析、冷冻干燥, 得到纯化的 EPS-G。

### 1.4 EPS-G-1 的特性研究

纯化后得到的 EPS-G-1 为胞外多糖的主要成分, 对 EPS-G-1 进行特性研究。

#### 1.4.1 EPS-G-1 中有机物含量的测定

使用苯酚-硫酸法绘制葡萄糖标准曲线, 计算出 EPS-G-1 的总糖含量<sup>[20]</sup>。

使用 Bradford 试剂盒测定进行 EPS-G-1 中蛋白质含量<sup>[21]</sup>。

利用甲醇萃取法含量按公式(1)求出脂质含量<sup>[22]</sup>。

$$\text{脂质含量}(\%) = \frac{M - M_0}{m} \times 100 \quad (1)$$

式中,  $M_0$  为洁净负压瓶的质量,  $M$  为蒸干后带有脂质的负压瓶的质量,  $m$  为 EPS-G-1 的质量。

#### 1.4.2 使用高效液相色谱进行单糖组成分析

依照文献[23]所述, 对纯化后的 EPS-G-1 进行单糖组成测定。选择了鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、果糖、葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸标准品作为参比。

#### 1.4.3 EPS-G-1 的特性黏度及分子量测定

根据张成龙<sup>[24]</sup>的实验方法稍作修改后测定 EPS-G-1 的黏度及分子量。蒸馏水作为溶剂溶解 EPS-G-1, 使用毛细管内径为 0.48 cm 的乌氏黏度计, 在 25 °C 恒温下对 EPS-G-1 的特性黏度进行测定, 与黄原胶、三赞胶和瓜尔豆胶进行对比。测试所得数据使用“一点法”求出特性黏度  $\eta$ 。

$$\eta = [2\{\frac{t}{t_0} - \ln(t/t_0)\}]^{1/2} C \quad (2)$$

式中,  $t$  与  $t_0$  分别为 EPS-G-1 溶液时间和蒸馏水流出时间,  $C$  为配制的 EPS-G-1 溶液的质量浓度, 特性黏度单位为 dL/g。

参考 Mark-Houwink 方程式(3), 利用黏度法测定 EPS-G-1 的分子量。

$$\eta = KM^a \quad (3)$$

式中,  $M$  为分子量,  $K$  和  $a$  是与分子量无关的常

数, 其中  $K$  值为  $5.45 \times 10^4$ ,  $a$  的值为 0.73。

## 1.5 EPS-G 对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附

### 1.5.1 $\text{Cu}^{2+}$ 初始浓度对吸附效果的影响

根据文献[25]报道, 将  $\text{CuCl}_2$  溶于蒸馏水中制备  $\text{Cu}^{2+}$  标准溶液, 在室温下采用透析法探究 EPS-G 对重金属的吸附效果。具体做法如下: 将 20 mL EPS-G 粗品(1 mg/mL)置于截流量为 3 500 Da 的透析袋中, 把透析袋放入盛有 1 L 含有  $\text{Cu}^{2+}$  浓度为 10、20、30、40、50、60 mg/L 溶液(pH 5.5)的烧杯中, 20 °C 吸附 2 h。吸附完成后将透析袋转移至含 1 L 去离子水的烧杯中, 隔夜透析以除去结合松散的金属离子。检测溶液中  $\text{Cu}^{2+}$  的浓度, 计算 EPS-G 对  $\text{Cu}^{2+}$  的吸附能力。所有实验均进行 3 次, EPS-G 对吸附能力的计算公式(4)如下:

$$q = \frac{V_0 C_0 - [V_0 C_1 + (V_1 + V_2) C_2]}{W} \quad (4)$$

其中,  $q$  为重金属的吸附量(mg/g),  $V_0$  为用于吸附的溶液的体积(L),  $V_1$  为透析袋中 EPS-G 溶液的体积(L),  $V_2$  为用于除去结合松散金属离子的去离子水的体积(L),  $C_0$  为初始时重金属离子的浓度(mg/L),  $C_1$  为吸附后溶液中重金属离子的浓度(mg/L),  $C_2$  为去离子水中重金属离子的浓度(mg/L),  $W$  为用于吸附的 EPS-G 的质量(mg)。

### 1.5.2 吸附时间对吸附效果的影响

在截流量为 3 500 Da 的透析袋中装入 20 mL 浓度为 1 mg/mL 的 EPS-G 溶液, 将其置于 1 L 浓度为 30 mg/L、pH 5.5 的  $\text{Cu}^{2+}$  溶液中, 20 °C 下测定吸附时间为 2、5、10、20、40、60、90、120、150、180 min 时溶液中的  $\text{Cu}^{2+}$  浓度。

### 1.5.3 吸附剂用量对吸附效果的影响

在截流量为 3 500 Da 的透析袋中装入 20 mL 浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg/mL 的 EPS-G 溶液, 将其置于 1 L pH 5.5、浓度为 30 mg/L 的  $\text{Cu}^{2+}$  溶液中, 20 °C 下测定吸附 90 min 后溶液中的  $\text{Cu}^{2+}$  浓度。

### 1.5.4 EPS-G 红外光谱分析

通过使用傅立叶变换红外光谱确定 EPS-G 中

参与金属离子吸附的官能团。将吸附  $\text{Cu}^{2+}$  的 EPS-G 经低温冷冻干燥、研磨后, 与 KBr 充分混匀, 压片, 放入样品室进行傅里叶变化红外光谱分析, 选择未吸附  $\text{Cu}^{2+}$  的 EPS-G 作为对照。

### 1.5.5 扫描电镜分析

根据文献[26-27]中的方法, 利用扫描电镜对 EPS-G 的表面形貌和微观结构进行研究。将吸附  $\text{Cu}^{2+}$  的 EPS-G 干燥后经喷金等操作, 利用扫描电镜观察 EPS-G 表面形态的变化。选取未吸附  $\text{Cu}^{2+}$  的 EPS-G 作为对照。

### 1.5.6 吸附动力学模型

考察 EPS-G 对模拟含  $\text{Cu}^{2+}$  废水的吸附动力学, 可以为探究吸附机理与反应途径提供有效的参考。采用准一级动力学模型、准二级动力学模型对所得的数据进行拟合分析。

Lagergren 一级速率方程常用于拟合固体吸附剂的吸附动力学, 拟合方程为式(5):

$$\text{Log}_{10}(q_e - q_t) = \text{Log}_{10}q_e - \frac{k_1}{2.303}t \quad (5)$$

式中:  $q_e$  为平衡吸附时的吸附量(mg/g);  $q_t$  为吸附时间为  $t$  时的吸附量(mg/g);  $k_1$  为准一级吸附速率常数(L/min)。

准二级动力学模型基于假定吸附速率受化学吸附机理的控制, 这种化学吸附涉及到吸附剂与吸附质之间的电子共用或电子转移, 拟合方程见式(6):

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e}t \quad (6)$$

式中:  $k_2$  为准二级吸附速率常数, 单位为  $\text{g}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ 。

### 1.5.7 等温吸附模型

Langmuir 和 Freundlich 吸附等温线模型适合描述吸附剂对不同浓度被吸附物的吸附参数。

Langmuir 模型公式见公式(7):

$$q_e = \frac{Q_{\max} b C_e}{1 + b C_e} \quad (7)$$

式中,  $Q_{\max}$  是最大生物吸附量(mg/g),  $b$  代表生物吸附剂和吸附率之间的关系。方程的倒数形式为

公式(8):

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{Q_{\max}} + \frac{1}{C_e b Q_{\max}} \quad (8)$$

Freundlich 等温线模型公式见公式(9):

$$q_e = K C_e^{1/n} \quad (9)$$

式中,  $K$  和  $n$  是等温线常数。

方程的对数形式见公式(10):

$$\text{Log}_{10} q_e = \text{Log}_{10} K + \frac{1}{n} \text{Log}_{10} C_e \quad (10)$$

## 2 结果与分析

### 2.1 EPS-G 的提取和纯化

通过离心、脱蛋白、醇沉、透析等一系列步骤, 从多糖培养基中获得 EPS-G 粗品。

由图 1A 所示, 将 EPS 粗品经离子交换柱 NaCl 梯度洗脱可获得 3 个洗脱峰, 分别命名为 EPS-G-1、EPS-G-2 和 EPS-G-3, 主峰为 EPS-G-1, 出现在第 23-35 管中, 收集、透析、冻干得到该步骤纯化的产品。

纯化后的 EPS-G-1 进一步通过凝胶色谱柱纯化。如图 1B 所示, EPS-G-1 呈单一峰而且峰形基本对称, 说明得到了 EPS-G-1 的纯品。

### 2.2 EPS-G-1 的特性

#### 2.2.1 EPS-G-1 的化学组成

利用葡萄糖标准曲线、蛋白质标准曲线(图 2)及 1.4.1 中的公式(1)计算出 HX-2 所产胞外多糖主要成分 EPS-G-1 中糖类、蛋白质和脂质含量分别为

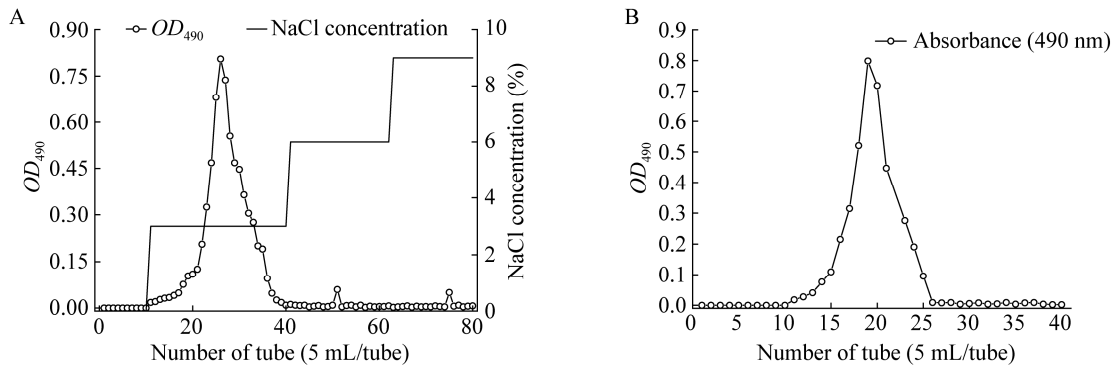


图 1 EPS-G 的纯化

Figure 1 Purification of EPS-G

注: A: EPS-G 的 DEAE-Cellulose column 洗脱图; B: EPS-G-1 的 Sephadex G100 洗脱图.

Note: A: DEAE-Cellulose column elution diagram of EPS-G; B: Sephadex G100 elution diagram of EPS-G-1.

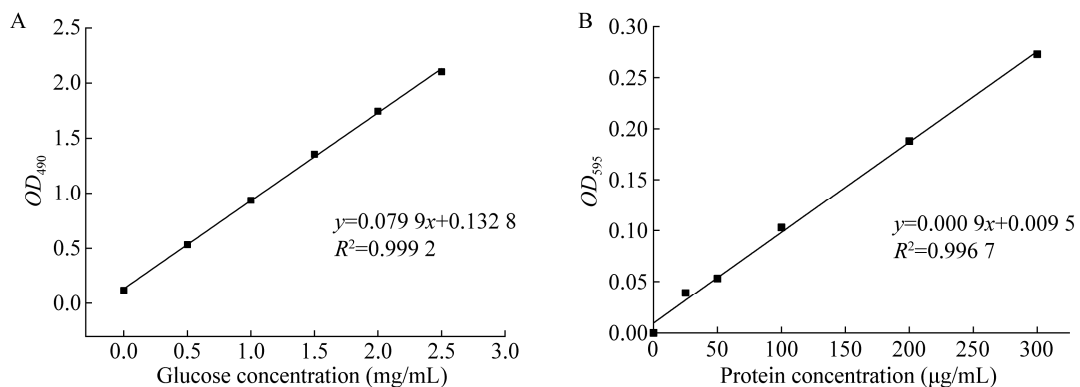


图 2 标准曲线

Figure 2 Standard curve

注: A: 葡萄糖标准曲线; B: 蛋白标准曲线.

Note: A: Glucose standard curve; B: Protein standard curve.

78.43%、8.31%和 8.22%。其中主要成分为糖类，符合胞外多糖的特点；蛋白质及脂类应为少量杂质成分，因两种杂质所占比例很小，不会对后续单糖组成及多糖性质分析造成影响。

### 2.2.2 EPS-G-1 的单糖组成分析

经酸水解后，将 EPS-G-1 中单糖保留时间与单糖标准品保留时间相比较，进行单糖组成分析(图 3)。使用面积归一化法绘制标准曲线，以计算 EPS-G-1 中各单糖成分的含量。如表 1 所示，EPS-G-1 是一种由葡萄糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖醛酸和岩藻糖组成的杂多糖，质量比为 27.31:26.67:24.83:15.85:4.80。

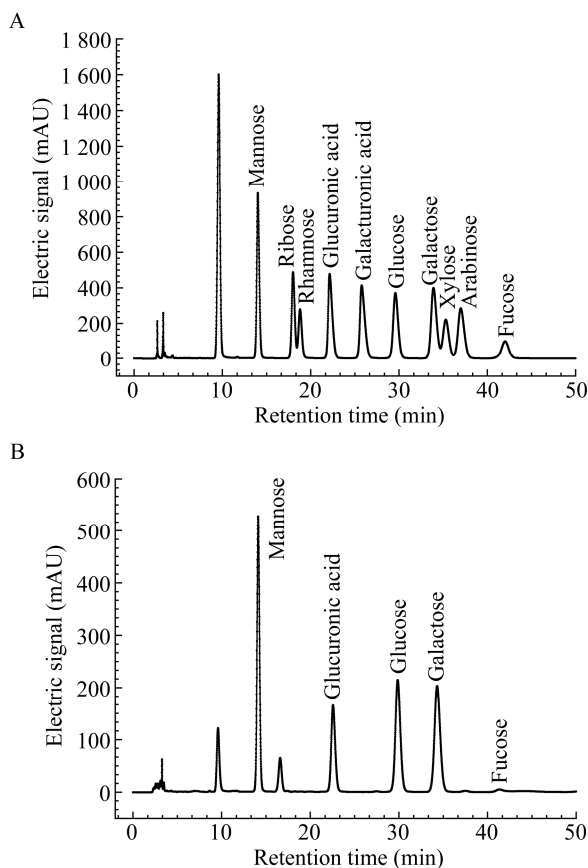


图 3 高效液相色谱分析

Figure 3 HPLC analysis

注：A：标准单糖的液相色谱图；B：EPS-G-1 的液相色谱图。

Note: A: Liquid chromatogram of standard monosaccharide; B: Liquid chromatogram of EPS-G-1.

### 2.2.3 EPS-G-1 的特性黏度和分子量的测定

使用乌氏黏度计法对 EPS-G-1 的特性黏度进行测定，并与黄原胶、三赞胶和瓜尔豆胶的特性黏度作对比。如表 2 所示，EPS-G-1 的特性黏度远大于瓜尔豆胶，但低于黄原胶和三赞胶。

通过 EPS-G-1 的特性黏度值，采用公式(3)计算得到其分子量  $M^{0.73}$  为  $3.47 \times 10^5$  g/dL。

## 2.3 EPS-G 对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附

### 2.3.1 $\text{Cu}^{2+}$ 浓度对吸附效果的影响

不同  $\text{Cu}^{2+}$  浓度会影响 EPS-G 对  $\text{Cu}^{2+}$  的吸附。如图 4 所示，使用 20 mL 1 mg/mL 的 EPS-G 溶液对不同浓度  $\text{Cu}^{2+}$  进行吸附，当  $\text{Cu}^{2+}$  初始浓度在 10–30 mg/L 时，随着  $\text{Cu}^{2+}$  初始浓度的增大，EPS-G 对  $\text{Cu}^{2+}$  的吸附量逐渐增大；当  $\text{Cu}^{2+}$  初始浓度高于 30 mg/L 时 EPS-G 对  $\text{Cu}^{2+}$  的吸附量趋于稳定，这可

表 1 EPS-G-1 的单糖组成

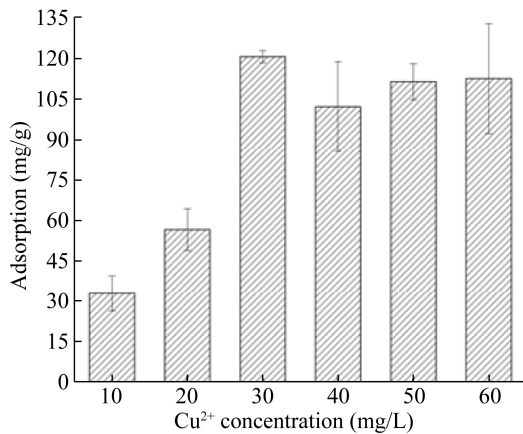
Table 1 Monosaccharide composition of EPS-G-1

编号 No.	单糖 Monosaccharide	保留时间 Retention time (min)	含量 Content (mg/kg)	比例 Proportion (%)
1	Glucose	29.594	130 945.94	27.31
2	Galactose	33.910	119 071.67	24.83
3	Glucuronic acid	22.152	76 002.55	15.85
4	Rhamnose	18.801	506.26	0.11
5	Galacturonic acid	25.782	12.97	<0.01
6	Fucose	42.021	22 998.59	4.80
7	Xylose	35.302	3.56	<0.01
8	Mannose	14.013	127 854.08	26.67
9	Arabinose	37.004	1 771.24	0.37
10	Ribose	18.003	313.49	0.07
Total				99.98

表 2 EPS-G-1、瓜尔豆胶、黄原胶、三赞胶的特性黏度和分子量

Table 2 Molecular weight and the intrinsic viscosity of EPS-G-1, guar gum, xanthan gum and sanzan gum

Name	特性黏度 $\eta$ Intrinsic viscosity (dL/g)	分子量 $M^{0.73}$ Molecular weight ( $\times 10^5$ g/dL)
EPS-G-1	17.21	3.47
Guar gum	1.68	
Xanthan gum	57.37	
Sanzan gum	60.18	

图4 EPS-G 对不同浓度  $\text{Cu}^{2+}$  的吸附效果Figure 4 Adsorption effect of EPS-G on of different  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations

能是因为多糖表面上能结合重金属离子的吸附位点已饱和, EPS-G 对  $\text{Cu}^{2+}$  的吸附量达到了平衡所致。选用 30 mg/L 的  $\text{Cu}^{2+}$  溶液进行后续实验。

### 2.3.2 吸附时间对吸附效果的影响

图 5 为吸附时间对 EPS-G 吸附  $\text{Cu}^{2+}$  的影响, 温度为 20 °C,  $\text{Cu}^{2+}$  初始浓度为 30 mg/L, 溶液 pH 5.5。  $\text{Cu}^{2+}$  吸附过程大致分为快吸附和慢吸附两个阶段。在吸附的前 20 min 内, EPS-G 对  $\text{Cu}^{2+}$  的吸附量快速增加吸附速度较大; 20 min 后, 随着时间的延长, 吸附量缓慢增加直至达到吸附平衡。推测原因为: 在吸附的初始阶段 EPS-G 上对重金属离子的吸附位点充足, 所以吸附速率大, 表现为快速吸附阶段; 之后随着多糖表面重金属离子的增多, 吸附位点逐渐减少, 因此吸附速率逐渐减慢。由图 5 可以看出, 90 min 时, EPS-G 对  $\text{Cu}^{2+}$  的吸附达到平衡。后续实验吸附时间定为 90 min。

### 2.3.3 吸附剂用量对吸附效果的影响

图 6 是 EPS-G 用量对  $\text{Cu}^{2+}$  吸附效果的影响, 温度为 20 °C,  $\text{Cu}^{2+}$  初始浓度为 30 mg/L, 溶液 pH 5.5, 吸附时间为 90 min。随吸附剂用量的增加, EPS-G 对  $\text{Cu}^{2+}$  的平衡吸附量逐渐减少。当 EPS-G 用量为 10 mg/L 时, EPS-G 对  $\text{Cu}^{2+}$  的吸附量为 140.71 mg/g。在一定重金属离子的溶液中, EPS-G 的浓度越高, 吸附量越低, 这与文献[28-29]结果

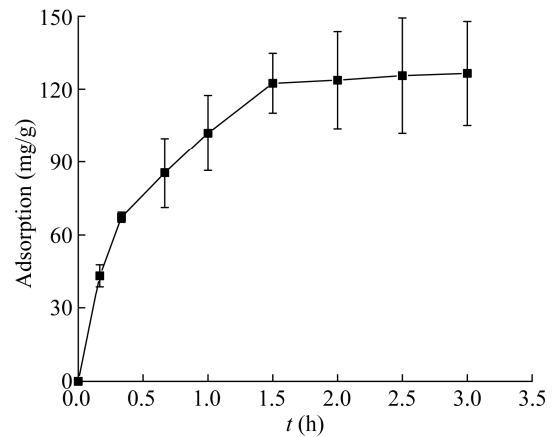


图5 吸附时间对吸附的影响

Figure 5 Effect of adsorption time on adsorption

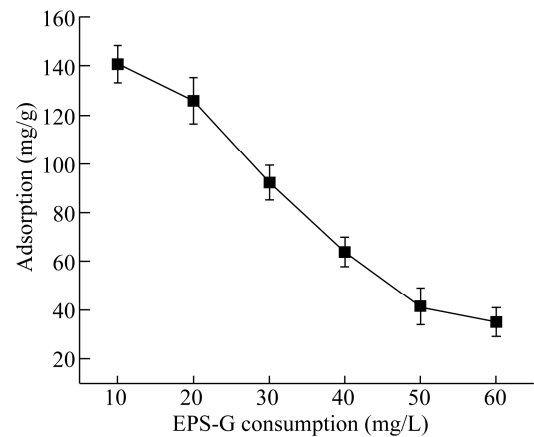


图6 吸附剂用量对吸附的影响

Figure 6 Effect of adsorbent dosage on adsorption

一致, 因为吸附剂用量越多, 颗粒间聚集导致有效吸附位点密度降低, 所以吸附量相应地降低。

### 2.3.4 EPS-G 吸附 $\text{Cu}^{2+}$ 前后的扫描电镜分析

图 7 显示了吸附  $\text{Cu}^{2+}$  前后 EPS-G 的扫描电镜图像和能谱图。如图 7A 所示, 吸附前 EPS-G 表面光滑, 存在细微的孔状结构。如图 7B 所示, 吸附  $\text{Cu}^{2+}$  后 EPS-G 表面有明显网状结构, 且网状周围有颗粒附着。如表 3、4 所示, 经过能谱分析表明这些颗粒为  $\text{Cu}^{2+}$ 。吸附前 EPS-G 中不含有 Cu 元素, 而吸附后的 EPS-G 中 Cu 元素的重量占比为 10.62%、原子数占比为 2.57%, 再一次证实了 EPS-G 对  $\text{Cu}^{2+}$  具有明显的吸附作用。

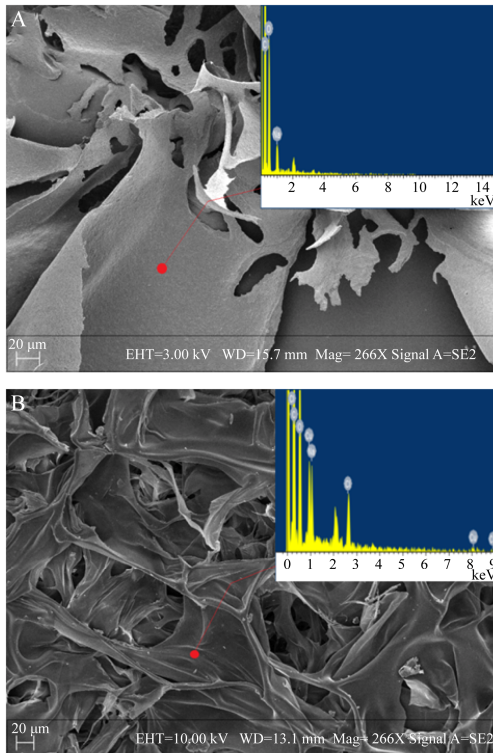


图 7 扫描电镜图像及其能级图分析

Figure 7 SEM image and energy level analysis

注:A:吸附前 EPS-G 的 SEM 图像和能级分析;B:吸附后 EPS-G 的 SEM 图像和能级分析。

Note: A: SEM image and energy level analysis of EPS-G before adsorption; B: SEM image and energy level analysis of EPS-G after adsorption.

表 3 吸附前 EPS-G 的能级分析

元素	线性	重量占比	原子数占比
Element	Linear	Weight ratio (%)	Atomic ratio (%)
C	K	56.79	64.24
O	K	39.58	33.61
Na	K	3.63	2.14
Total		100.00	100.00

表 4 吸附后 EPS-G 的能级分析

元素	线性	重量占比	原子数占比
Element	Linear	Weight ratio (%)	Atomic ratio (%)
C	K	50.04	64.04
O	K	29.31	28.15
Na	K	3.80	2.54
Cl	K	6.23	2.70
Cu	L	10.62	2.57
Total		100.00	100.00

### 2.3.5 红外光谱分析

红外光谱技术被广泛用作定性工具,用于表征有机物表面的化学基团<sup>[30]</sup>。吸附  $\text{Cu}^{2+}$  前后 EPS-G 的红外光谱如图 8 所示。根据文献[31-32]报道, EPS-G 红外吸收带和特征官能团在  $3\ 292\ \text{cm}^{-1}$  有一个吸收峰,为 O-H 的伸缩振动,  $1\ 618\ \text{cm}^{-1}$  处出现酰胺(O=C-N) I 带,是 C=O 伸缩振动;  $1\ 409\ \text{cm}^{-1}$  处为 H-C-H 的伸缩振动吸收峰,  $1\ 082\ \text{cm}^{-1}$  处为 C-O-C 的伸缩振动吸收峰。EPS-G 吸附  $\text{Cu}^{2+}$  后,  $3\ 292$ 、 $618$ 、 $1\ 409$ 、 $1\ 082\ \text{cm}^{-1}$  处的吸收峰变强,显示这些基团的变化可能与 EPS-G 对  $\text{Cu}^{2+}$  的吸附效果有关,其中  $3\ 292\ \text{cm}^{-1}$  处的吸收峰变化最大,说明羟基在吸附  $\text{Cu}^{2+}$  过程中占主导地位。

### 2.3.6 吸附动力学分析

动力学模型可以用来探索吸附剂的行为<sup>[33-34]</sup>,根据不同吸附时间的吸附数据进行吸附动力学研究,采用准一级动力学模型和准二级动力学模型对实验数据进行拟合。如图 9 所示,结果表明,准二级动力学模型对 EPS-G 吸附  $\text{Cu}^{2+}$  过程的拟合效果比准一级动力学模型更好,即准二级动力学模型的  $R^2$  ( $0.976\ 2$ ) 大于准一级动力学模型  $R^2$  ( $0.932\ 3$ ),拟合结果  $q_e$  也更接近实验结果,  $q_e$  值为  $135.135\ \text{mg/g}$ ,因此 EPS-G 的吸附动力学遵循准二级模型。

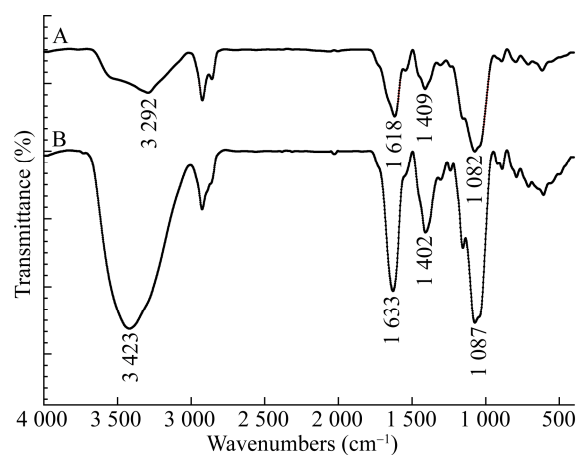


图 8 EPS-G 在吸附前(A)和吸附后(B)的红外光谱图  
Figure 8 Infrared spectrum of EPS-G before (A) and after (B) adsorption



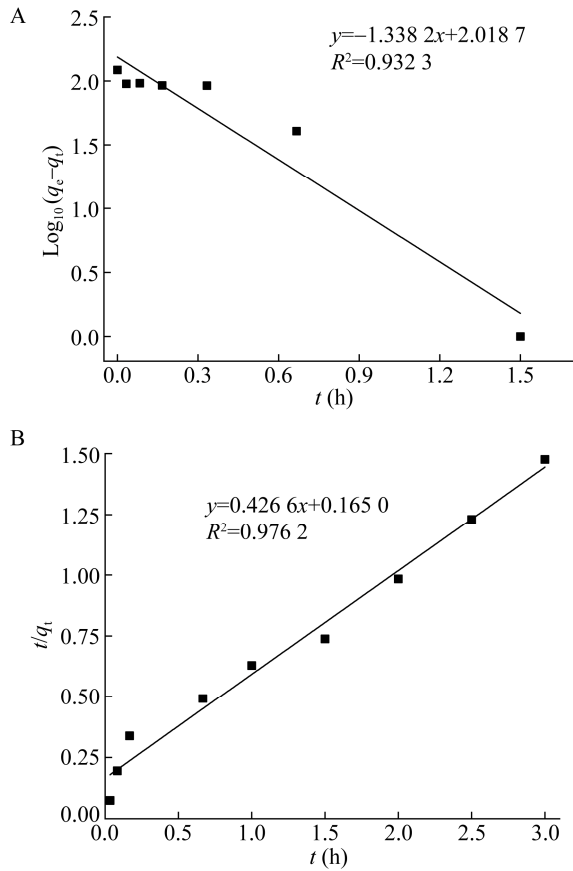


图 9 吸附动力学模型

Figure 9 Adsorption kinetics model

注: A: 准一级动力学模型; B: 准二级动力学模型.

Note: A: Quasi first order kinetic model; B: Quasi second order kinetic model.

2.3.7 等温吸附模型

如图 10 所示, Langmuir 模型相关系数较大, 能更好地描述 EPS-G 对 Cu<sup>2+</sup>的吸附行为, 所以 EPS-G 对 Cu<sup>2+</sup>的吸附过程符合 Langmuir 等温吸附模型。拟合得到的最大吸附量为 144.93 mg/g, 吸附速率常数 *b* 为 0.082 9, 0 < *b* < 1, 表明 EPS-G 对 Cu<sup>2+</sup>具有较高的亲和力, 易于吸附。

3 讨论与结论

近年来, 对微生物所产胞外多糖已有一些报道。王坤等的研究表明乳酸菌胞外多糖是一种天然的抗肿瘤及提高机体免疫力的物质, 可广泛应用于功能性食品以及药品领域<sup>[35]</sup>; 姜云芸等的研

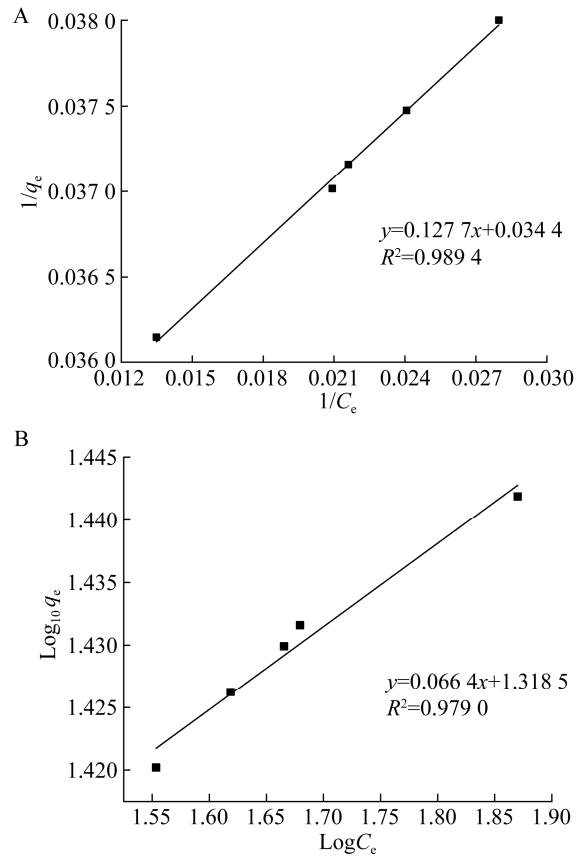


图 10 EPS-G 吸附 Cu<sup>2+</sup>的等温吸附模型

Figure 10 Adsorption isotherms for Cu<sup>2+</sup> adsorption using EPS-G

注: A: Langmuir 模型; B: Freundlich 模型.

Note: A: Langmuir model; B: Freundlich model.

究表明植物杆菌 K25 所产的胞外多糖具有作为天然食品稳定剂的应用潜力<sup>[36]</sup>; Liu 等测得 *Lactobacillus plantarum* HY 所产的胞外多糖由甘露糖、半乳糖、葡萄糖醛酸和葡萄糖组成, 质量分数分别为 72.99%、17.27%、6.99%和 2.75%<sup>[19]</sup>; Saravanan 等测得 *Leuconostoc lactis* KC117496 所产的胞外多糖是由葡萄糖组成的葡聚糖<sup>[37]</sup>。然而, 对红球菌胞外多糖的报道相对较少。Neu 等的研究表明 *Rhodococcus* No. 33 胞外多糖由鼠李糖、半乳糖、葡萄糖和葡萄糖醛酸组成, 摩尔比为 2:1:1:1<sup>[38]</sup>; Rapp 等测得 *Rhodococcus erythropolis* 胞外多糖主要由葡萄糖和甘露糖组成, 其摩尔比为 1:1<sup>[39]</sup>。本研究采用高效液相色谱法分析发现, 红球菌 HX-2 所

产胞外多糖 EPS-G-1 是由葡萄糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖醛酸和岩藻糖等组成的杂多糖,其质量比为 27.31:26.67:24.83:15.85:4.80,为红球菌胞外多糖的性质研究提供了可靠数据。

根据兰祥光的研究,由瓜尔豆胶为原料制成的一种新型配合物可用于蛋糕和焙烤食品的制作<sup>[40]</sup>,使用乌氏黏度计测得 EPS-G-1 与瓜尔豆胶相比具有更高的特性黏度值,说明 EPS-G-1 可能在工业和食品行业具有潜在的价值;Peng 等对 *Ganoderma tsugae* 菌丝体中提取出的胞外多糖进行研究表明高分子量的 EPS 具有较高的抗肿瘤活性<sup>[41]</sup>。本研究提取的胞外多糖的分子量为  $3.47 \times 10^5$  g/dL,说明其可能具有一定的抗肿瘤活性,后续将进行抗肿瘤活性研究。Li 等的实验表明 *Bacillus vallismortis* sp. 产生的胞外多糖中存在的-SH、C=O、N-H 在吸附  $\text{Cu}^{2+}$  的过程中起主要作用<sup>[42]</sup>; Czemińska 等的研究表明胞外多糖中-OH、Ac-和-COOH 的存在有助于其对重金属的吸附<sup>[43]</sup>。本研究采用红外光谱分析表明, EPS-G-1 对  $\text{Cu}^{2+}$  吸附前后-OH、C=O 等吸收峰发生了明显变化,说明这些基团可能在吸附  $\text{Cu}^{2+}$  的过程中起主要作用。

使用微生物所产的胞外多糖进行重金属吸附已有一些相关报道。Krishnamurthy 等研究表明蜡状芽胞杆菌 KMS3-1 对于重金属具有较高的耐受性,并且其所产胞外多糖存在吸附重金属的潜力<sup>[44]</sup>。Grinev 等研究了 *Paenibacillus polymyxa* 92 所产胞外多糖对  $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$  和  $\text{Cu}^{2+}$  的吸附,其中对于  $\text{Cu}^{2+}$  的最大吸附量为 481 mg/g<sup>[45]</sup>; Li 等的研究表明 *Athelia rolfsii* 所产胞外多糖对  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  的最大吸附量分别为 116.28、103.09 和 153.85 mg/g<sup>[17]</sup>; Zhang 等的研究表明海洋菌 *Alteromonas* sp. JL2810 产生的胞外多糖在 pH 5.0 时对  $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Ni}^{2+}$  的最大生物吸附容量为  $140.8 \pm 8.2$  mg/g 和  $226.3 \pm 3.3$  mg/g<sup>[46]</sup>; 刘秋兰的研究表明 *Sorangium cellulosum* NUST06 所产胞外多糖对  $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Pb}^{2+}$  的最大吸附量分别为 74.82 mg/g 和

139.73 mg/g<sup>[47]</sup>; 张美萍的研究表明 *Arthrobacter ps-5* 所产胞外多糖对  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$  和  $\text{Cr}^{6+}$  的最大吸附量分别为 139.75、163.50、56.69 mg/g<sup>[48]</sup>。相比之下,本文报道的红球菌 HX-2 所产胞外多糖对  $\text{Cu}^{2+}$  的最大吸附量为 144.93 mg/g,在相关文献报道中处于较高水平。本研究对于水体中重金属离子的生物吸附处理具有一定的参考价值。

## REFERENCES

- [1] Saadat YR, Khosroushahi AY, Gargari BP. A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 217: 79-89
- [2] Shofia SI, Jayakumar K, Mukherjee A, et al. Efficiency of brown seaweed (*Sargassum longifolium*) polysaccharides encapsulated in nanoemulsion and nanostructured lipid carrier against colon cancer cell lines HCT 116[J]. RSC Advances, 2018, 8(29): 15973-15984
- [3] Chen YC, Wu YJ, Hu CY. Monosaccharide composition influence and immunomodulatory effects of probiotic exopolysaccharides[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 133: 575-582
- [4] Lakra AK, Domdi L, Tilwani YM, et al. Physicochemical and functional characterization of mannan exopolysaccharide from *Weissella confusa* MD1 with bioactivities[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 143: 797-805
- [5] Kanmani P, Kumar RS, Yuvaraj N, et al. Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium *Streptococcus phocae* PI80 and its functional characteristics activity *in vitro*[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(7): 4827-4833
- [6] Gupta P, Diwan B. Bacterial exopolysaccharide mediated heavy metal removal: a review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies[J]. Biotechnology Reports, 2017, 13: 58-71
- [7] Raj KK, Sardar UR, Bhargavi E, et al. Advances in exopolysaccharides based bioremediation of heavy metals in soil and water: a critical review[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 199: 353-364
- [8] Mohite BV, Koli SH, Narkhede CP, et al. Prospective of microbial exopolysaccharide for heavy metal exclusion[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2017, 183(2): 582-600
- [9] Gryta A, Frac M, Oszust K. The application of the Biolog EcoPlate approach in ecotoxicological evaluation of dairy sewage sludge[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 174(4): 1434-1443
- [10] Bhunia B, Uday USP, Oinam G, et al. Characterization,

- genetic regulation and production of cyanobacterial exopolysaccharides and its applicability for heavy metal removal[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 179: 228-243
- [11] Ye SH, Zhang MP, Yang H, et al. Biosorption of  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Cr}^{6+}$  by a novel exopolysaccharide from *Arthrobacter ps-5*[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 101: 50-56
- [12] Schmid J. Recent insights in microbial exopolysaccharide biosynthesis and engineering strategies[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2018, 53: 130-136
- [13] Gopinath V, Saravanan S, Al-Maleki AR, et al. A review of natural polysaccharides for drug delivery applications: special focus on cellulose, starch and glycogen[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 107: 96-108
- [14] Abid Y, Azabou S, Joulak I, et al. Potential biotechnological properties of an exopolysaccharide produced by newly isolated *Bacillus tequilensis*-GM from spontaneously fermented goat milk[J]. LWT, 2019, 105: 135-141
- [15] Upadhyay KH, Vaishnav AM, Tipre DR, et al. Kinetics and mechanisms of mercury biosorption by an exopolysaccharide producing marine isolate *Bacillus licheniformis*[J]. 3 Biotech, 2017, 7(5): 313
- [16] Venkatesh P, Balraj M, Ayyanna R, et al. Physicochemical and biosorption properties of novel exopolysaccharide produced by *Enterococcus faecalis*[J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 68: 606-614
- [17] Li HM, Wei M, Min WH, et al. Removal of heavy metal ions in aqueous solution by exopolysaccharides from *Athelia rolfsii*[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2016, 6: 28-32
- [18] Hu X, Li DH, Huang JY, et al. Isolation, identification and salinity tolerance of a novel hydrocarbon-degrading strain, *Rhodococcus* sp. HX-2[J]. Science Technology and Engineering, 2019, 19(25): 364-373 (in Chinese)  
胡鑫, 李大卉, 黄锦玉, 等. 一株烃降解菌的分离鉴定及耐盐机制[J]. 科学技术与工程, 2019, 19(25): 364-373
- [19] Liu T, Zhou K, Yin S, et al. Purification and characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* HY isolated from home-made Sichuan Pickle[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 134: 516-526
- [20] Ruijssenaars HJ, Stingle F, Hartmans S. Biodegradability of food-associated extracellular polysaccharides[J]. Current Microbiology, 2000, 40(3): 194-199
- [21] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254
- [22] Zhang XL, Yan S, Tyagi RD, et al. Wastewater sludge as raw material for microbial oils production[J]. Applied Energy, 2014, 135: 192-201
- [23] Sran KS, Sundharam SS, Krishnamurthi S, et al. Production, characterization and bio-emulsifying activity of a novel thermostable exopolysaccharide produced by a marine strain of *Rhodobacter johrii* CDR-SL 7Cii[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 127: 240-249
- [24] Zhang CL. Synthesis of bio-based polyesters and properties of PBS blends[D]. Changchun: Master's Thesis of Changchun University of Technology, 2019 (in Chinese)  
张成龙. 生物基聚酯的合成及 PBS 共混体系的性能研究[D]. 长春: 长春工业大学硕士学位论文, 2019
- [25] Wei LL, Li Y, Noguera DR, et al. Adsorption of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  by Extracellular Polymeric Substances (EPS) in different sludges: effect of EPS fractional polarity on binding mechanism[J]. Journal of Hazardous Materials, 2017, 321: 473-483
- [26] Zhang JZ, Liu L, Ren YY, et al. Characterization of exopolysaccharides produced by microalgae with antitumor activity on human colon cancer cells[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 128: 761-767
- [27] Zhao D, Jiang J, Du RP, et al. Purification and characterization of an exopolysaccharide from *Leuconostoc lactis* L2[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 139: 1224-1231
- [28] Fourest E, Roux JC. Heavy metal biosorption by fungal mycelial by-products: mechanisms and influence of pH[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1992, 37(3): 399-403
- [29] Wang J. Heavy metals and organic compound biosorption by a novel exopolysaccharide from the deep-sea mesophilic bacterium *Wangia profunda* (SM-A87)[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong University, 2009 (in Chinese)  
王敬. 新型深海中温菌 *Wangia profunda* (SM-A87)胞外多糖对重金属和有机物的吸附性能研究[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2009
- [30] El Fels L, Zamama M, El Asli A, et al. Assessment of biotransformation of organic matter during co-composting of sewage sludge-lignocellulosic waste by chemical, FTIR analyses, and phytotoxicity tests[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2014, 87: 128-137
- [31] Li XW, Dai XH, Takahashi J, et al. New insight into chemical changes of dissolved organic matter during anaerobic digestion of dewatered sewage sludge using EEM-PARAFAC and two-dimensional FTIR correlation spectroscopy[J]. Bioresource Technology, 2014, 159: 412-420
- [32] Wei LL, Wang K, Zhao QL, et al. Kinetics and equilibrium of adsorption of dissolved organic matter fractions from secondary effluent by fly ash[J]. Journal of Environmental Sciences, 2011, 23(7): 1057-1065
- [33] Simonin JP. On the comparison of pseudo-first order and pseudo-second order rate laws in the modeling of adsorption kinetics[J]. Chemical Engineering Journal, 2016, 300: 254-263
- [34] Russo V, Tesser R, Masiello D, et al. Further verification of Adsorption Dynamic Intraparticle Model (ADIM) for

- fluid-solid adsorption kinetics in batch reactors[J]. Chemical Engineering Journal, 2016, 283: 1197-1202
- [35] Wang K, Niu MM, Zhao J. Research on immunoregulation and anti-tumor characteristics of exopolysaccharides from lactic acid bacteria[J]. Journal of Heilongjiang August First Land Reclamation University, 2019, 31(3): 51-55 (in Chinese)  
王坤, 牛萌萌, 赵婧. 乳酸菌胞外多糖的免疫调节及抗肿瘤特性的研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2019, 31(3): 51-55
- [36] Jiang YY, Cai M, Shao SJ, et al. Factors affecting of *Lactobacillus plantarum* K25 fermentation to produce exopolysaccharide and its application[J]. Journal of Food Science and Technology, 2018, 36(1): 25-34 (in Chinese)  
姜云芸, 蔡森, 邵淑娟, 等. 植物乳杆菌 K25 发酵产胞外多糖的影响因素及其应用[J]. 食品科学技术学报, 2018, 36(1): 25-34
- [37] Saravanan C, Shetty PKH. Isolation and characterization of exopolysaccharide from *Leuconostoc lactis* KC117496 isolated from idli batter[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 90: 100-106
- [38] Neu TR, Dengler T, Jann B, et al. Structural studies of an emulsion-stabilizing exopolysaccharide produced by an adhesive, hydrophobic *Rhodococcus strain*[J]. Microbiology, 1992, 138(12): 2531-2537
- [39] Rapp P, Beck CH, Wagner F. Formation of exopolysaccharides by *Rhodococcus erythropolis* and partial characterization of a heteropolysaccharide of high molecular weight[J]. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 1979, 7(1): 67-78
- [40] Lan XG. A substitute for cake shortening[J]. Grain Processing, 1990(1): 31-34 (in Chinese)  
兰祥光. 蛋糕起酥油的替换物[J]. 粮食加工, 1990(1): 31-34
- [41] Peng YF, Zhang LN, Zeng FB, et al. Structure and antitumor activities of the water-soluble polysaccharides from *Ganoderma tsugae* mycelium[J]. Carbohydrate Polymers, 2004, 59(3): 385-392
- [42] Li QH, Song WF, Sun MG, et al. Response of *Bacillus vallismortis* sp. EPS to exogenous sulfur stress/induction and its adsorption performance on Cu(II)[J]. Chemosphere, 2020, 251: 126343
- [43] Czemińska M, Szcześ A, Pawlik A, et al. Production and characterisation of exopolymer from *Rhodococcus opacus*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2016, 112: 143-152
- [44] Krishnamurthy M, Jayaraman Uthaya C, Thangavel M, et al. Optimization, compositional analysis, and characterization of exopolysaccharides produced by multi-metal resistant *Bacillus cereus* KMS3-1[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 227: 115369
- [45] Grinev VS, Tregubova KV, Anis'kov AA, et al. Isolation, structure, and potential biotechnological applications of the exopolysaccharide from *Paenibacillus polymyxa* 92[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 232: 115780
- [46] Zhang ZL, Cai RH, Zhang WH, et al. A novel exopolysaccharide with metal adsorption capacity produced by a marine bacterium *Alteromonas* sp. JL2810[J]. Marine Drugs, 2017, 15(6): 175
- [47] Liu QL. Adsorption characteristics of heavy metal ions by extracellular polysaccharide of *Sorangium cellulosum* NUST06[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing University of Science and Technology, 2004 (in Chinese)  
刘秋兰. *Sorangium cellulosum* NUST06 纤维堆囊菌胞外多糖对重金属离子的吸附特性[D]. 南京: 南京理工大学硕士学位论文, 2004
- [48] Zhang MP. Flocculating activity and adsorption performance to the metal ions of exopolysaccharides extracted from *Arthrobacter ps-5*[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian Polytechnic University, 2012 (in Chinese)  
张美萍. 节杆菌 *Arthrobacter ps-5* 胞外多糖的生物絮凝和吸附金属离子性能的研究[D]. 大连: 大连工业大学硕士学位论文, 2012