



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research
Environmental Engineering—Article

氯化水与地表水导致的膜污染对比解析——生物污染特性和微生物探究

张莉^{a,b}, 徐磊^{a,*}, Nigel Graham^c, 俞文正^{a,*}

^a State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

^b University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

^c Department of Civil and Environmental Engineering, Imperial College London, South Kensington Campus, London SW7 2AZ, UK

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 October 2020

Revised 1 December 2020

Accepted 5 March 2021

Available online 6 May 2021

关键词

膜污染

生物膜

GDM过滤技术

超滤

耐氯细菌

亲水性

摘要

氯在城市水处理过程中通常被用于灭活病原体 and 预防水媒疾病,但是目前尚不清楚其作为一种预处理技术是否能够有效地缓解超滤过程中产生的膜污染。在本研究中,我们探究了自来水在重力驱动膜过滤系统中对生物膜的形成及生物污染的影响。同时,对未处理的地表水(湖水)所形成的生物膜/生物污染也进行了对比研究。研究表明,自来水过滤系统产生了比湖水更严重的膜污染,而且多糖和eDNA的含量更高。其生物膜形态致密,但是湖水形成的生物膜是多孔、类似蜘蛛网状的结构,猜测可能与生物膜中的细菌有关。16S rRNA 测序结果表明,*Xanthobacter*在自来水形成的生物膜中占据优势地位。此外,研究发现膜的亲、疏水性对膜污染特性和微生物群落的影响较小。本研究揭示了耐氯细菌在膜污染形成中的重要作用,更深入地认识了膜污染,可为寻求有效的膜污染控制方法提供帮助。

© 2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

在世界上,特别是发展中国家的偏远地区,安全而充足的饮用水供应越来越缺乏[1]。距离远、社区分散和交通基础设施落后,使得人们难以提供和保证足够的安全供水。在这些偏远地区,包括河流和湖泊在内的地表水受到的污染较轻,因此,可以通过较简单的方法将其处理后作为饮用水的水源。膜过滤技术,特别是超滤膜过滤技术[2],是一种成熟的、通用的水质净化和饮用水生产方法[3]。由于超滤膜的孔径(大约 100 kDa)小于悬浮的固体、胶体和细菌,因此其可通过尺寸排阻效应将它们截留[4]。此外,水可以在较低的跨膜压力下通过超滤膜,这

可以通过重力驱动装置实现[5–6]。

重力驱动膜滤技术因具有低能耗、无需反洗和通量稳定等优点,已被广泛地应用于处理灰水[7–8]、废水[9]、雨水[10]和海水预处理[11]等过程中。累积的生物膜在重力驱动膜滤系统的调控中起着重要的作用。首先,可渗透的生物污染层可以作为二级膜[6],保持稳定的通量[5]。其次,它可以降解有机物[8,12]。为揭示生物膜的特性并有效控制其累积,人们探究了其相关的影响因素,如给水[5]、曝气剪切应力[13]、生物控制[14]和营养盐限制[15]等,并解析了生物膜形态与过滤性能之间的关系[2]。在进水的影响中,溶解性有机物浓度起着重要的作用,而且其与膜滤系统的渗透通量呈负相关[5]。然而,该方面仍

* Corresponding authors.

E-mail addresses: leixu@rcees.ac.cn (L. Xu), wzyu@rcees.ac.cn (W. Yu).

2095-8099/© 2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

英文原文: *Engineering* 2022, 15(8): 154–164

引用本文: Li Zhang, Lei Xu, Nigel Graham, Wenzheng Yu. Unraveling Membrane Fouling Induced by Chlorinated Water Versus Surface Water: Biofouling Properties and Microbiological Investigation. *Engineering*, <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.03.016>

需进一步的探究。

微生物产物和缓慢生物降解产物[13,15–16]是生物膜基质的主要成分[17]。微生物在生物污染中起着关键性的作用，因此，通过控制微生物的生长可能会减缓生物污染。氯在世界范围内被广泛应用于饮用水和废水的处理，以灭活病原体和预防水媒疾病[18–21]。然而，对于氯是否能够显著缓解膜污染尚不清楚。由于存在的微生物较少，猜测会引起较轻的膜污染。但是，有些微生物是耐氯的，关于这部分细菌对膜污染的贡献尚不清楚。此外，膜的亲、疏水性是关系到膜的应用和性能的关键参数[22]，它会影响到膜滤过程中有机物的分离性能和选择渗透性[23]。由于截留有机物的亲、疏水性差异，不同的细菌群落会存活下来并形成不同的生物膜，从而影响过滤性能。然而，尽管其很重要，但相关的研究却很缺乏。

此外，据 Flemming 和 Wingender [24]报道，生物膜是微生物的聚集体。细胞通常被埋入在其自产的胞外聚合物基质中，这表明探究细菌是识别和调控生物污染的必要条件。即使在同一反渗透膜水质净化装置中，各反应池的微生物群落和膜污染情况也是不同的[25]。Wu 等[26]研究发现，当给水相同时，不同的过滤装置也会形成不同的微生物群落。以上研究表明，生物膜中的细菌群落是动态的、复杂的，需要在生物污染的研究中予以重视。

在本研究中，我们从实际出发，选择了自来水[典型的氯化水；低溶解性有机物浓度为 $(2.920 \pm 0.011) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$]和湖水[未经预处理的常见地表水；高溶解性有机物浓度为 $(6.440 \pm 0.039) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$]作为进水。对于生活在城市的人们来讲，自来水是饮用水；对于生活在偏远地区的人们来讲，地表水，如湖水，是可利用的水源。本研究还对比了两种超滤膜，即聚偏氟乙烯膜和聚醚砜膜，探究膜的亲、疏水性是否会影响所形成生物膜的性能。为揭示过滤系统中生物膜的生物污染特性，我们深入探究了生物膜的性质，包括形态、官能团和基质成分等。同时，特别关注了生物膜中的细菌群落结构和多样性，以及它们的生物污染机制。

2. 材料与方法

2.1. 反应器的构建与运行

本研究分析了两种类型的水体（已去除余氯的自来水和湖水），其中，自来水取自自来水水龙头，湖水取自北京奥林匹克公园。自来水的源头是北京市第九自来水厂，在排出之前，使用浓度为 $1.2 \sim 1.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的液氯消毒5 h，使得水龙头水中的余氯浓度为 $0.07 \sim 0.08 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。将自来水静置24 h（以便去除余氯），再进行实验。每隔一天取

一次水样，储存在2 L的容器中。关于该两种水体的水质参数可见于附录A中的表S1，其中，自来水的有机物浓度较低，而湖水的有机物浓度较高。此外，本实验采用了两种超滤膜（北京赛普瑞特设备有限公司），分别为聚偏氟乙烯膜和聚醚砜膜，其过滤面积为 25 cm^2 ，切割分子量为100 kDa，相当于7~8 nm。三个重力流驱动膜滤系统同时以死端过滤的方式运行32天，过滤压力为40 mbar水压（ $1 \text{ bar} = 10^5 \text{ Pa}$ ；见附录A中的图S1）。将以上系统命名为 tap water-PVDF、lake water-PVDF 和 lake water-PES。在过滤过程中，每天记录渗透通量，并按照附录A中的方法进行计算。运行结束后，取出三个平行过滤系统中的生物膜，并按照如下步骤进行分析。

2.2. 进、出水及生物膜中有机物分子量的测定

应用高效尺寸排阻色谱技术确定有机物的分子量分布。高效尺寸排阻色谱技术采用高效液相色谱泵（Waters 1525，美国）进行，包括BioSep-SEC-S3000柱（ $7.8 \text{ mm} \times 300 \text{ mm}$ ；Phenomenex，美国）、固定于内径为4 mm的圆盘（GFC-3000）的保护柱、200泵、在254 nm波长下工作的光电二极管阵列检测器（Waters 2998，美国）以及自动进样器（Waters 2707，美国）。以 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的乙酸钠溶液（Sigma-Aldrich，美国）为流动相，设置流速为 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ，注射体积为 $100 \mu\text{L}$ 。在上样之前，设置流速为 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ，净化色谱柱。待基线稳定后，对样品进行测定，并根据标准溶液获得的谱图进行校准。所有的样品均经过 $0.22 \mu\text{m}$ 的滤头过滤。

为测定生物膜中的有机物，将生物膜切割为 0.25 cm^2 ，并用2 mL 1%的磷酸盐缓冲液溶解在5 mL的离心管中。涡旋混合2 h后，置于 $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 的水浴锅中加热20 min。之后，将1.5 mL混合液转移至新的2 mL无菌离心管中，并于 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速下离心2 min。将上清液进行收集，用于下一步的测定。每个生物膜均选取面积相同的三个样本进行测定。

2.3. 进、出水及生物膜中有机物的荧光特征解析

应用荧光光谱仪（F-4600, Hitachi, 日本）分析进、出水及生物膜中的类蛋白或类腐殖酸类物质。设置激发波长的范围为200~450 nm，发射波长的范围为250~550 nm，带通均为5 nm。为降低离子的干扰，所有水样均经过 $0.45 \mu\text{m}$ 的针头过滤器过滤。此外，利用MATLAB软件进行平行因子分析。

2.4. 滤液中亲、疏水性有机物特征解析

利用 Superlite DAX-8（Supelco，美国）和 Amberlite

XAD-4 (Rohm and Hass, 美国) 树脂, 将滤液中的亲、疏水性有机物分为三类: 强疏水性物质 (被 DAX-8 树脂吸附)、弱疏水性 (或反亲水性) 物质 (被 XAD-4 树脂吸附) 和亲水性物质 (通过 DAX-8 和 XAD-4 树脂)。分析之前, 将树脂用甲醇和去离子水洗涤几次, 以确保其不含有有机物, 并用溶解性有机物浓度进行表征。将水样的 pH 调整为 2.0, 设置通过 DAX-8 树脂的流速为 $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 通过 XAD-4 树脂的流速为 $15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。根据通过 DAX-8 和 XAD-4 树脂前后测定的溶解性有机物浓度, 确定三类有机物的浓度。溶解性有机物的浓度应用总有机碳分析仪 (TOC-V, Shimadzu, 日本) 测定。

2.5. 生物膜 ζ 电位和接触角的测定

应用电固体表面分析仪 (SurPASS 3, Anton Paar, 奥地利) 测定生物膜的 ζ 电位, 利用接触角仪 (Dataphysics, 德国) 测量生物膜的接触角。对于接触角, 随机选取 5 个位置进行测定, 并连续 200 s 记录数值。

2.6. 生物膜的扫描电子显微镜和原子力显微镜图像

通过冷冻干燥和表面喷金制备生物膜和膜样品, 进行扫描电镜 (S-4800, Hitachi, 日本) 的拍摄。为呈现生物膜的三维结构, 分别从表面和横截面拍摄图像。

为探究生物膜的粗糙度及成分的分布, 应用原子力显微镜进行分析。具体来说, 应用 Bruker Dimension Icon ScanAsyst 在 PeakForce Tapping 的模式下使用 ScanAsyst Air tip (FASTSCANBIO, Bruker, 德国) 拍摄三个生物膜的原子力显微图像。图像 ($10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$) 的扫描速率为 $0.1 \sim 0.3 \text{ Hz}$, 峰值力设定的范围为 $8 \sim 15 \text{ nN}$ 。在数据不确定的情况下, 对图像进行来回扫描。使用 NanoScope Analysis 1.8 软件对图像进行平滑, 以去除扫描缺陷。同时, 应用该软件进行颗粒分析, 并使用 Origin 2018 软件 (Electronic Arts Inc., 美国) 绘制拟合曲线。

2.7. 生物膜的傅里叶变换红外光谱测定

为识别生物膜中的特定官能团, 对生物膜进行傅里叶变换红外光谱 (Spectrum Two, PerkinElmer, 美国) 分析。同时, 为直观显示生物膜中物质的分布, 进行傅里叶变换红外显微成像 (Spotlight 400, PerkinElmer, 美国) 分析。生物膜样品的扫描长度和宽度均为 $500 \mu\text{m}$, 空间分辨率为 $6.25 \mu\text{m} \times 6.25 \mu\text{m}$ 。为更全面地反映生物膜中物质的分布, 每个生物膜至少捕获三张图像。

2.8. 生物膜的激光共聚焦显微图像测定

将带有膜的生物膜样品从过滤系统中取出, 立即用

2.5% 的甲醛固定, 并用双面胶粘在载玻片上。在黑暗的环境下, 用 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 FITC (Sigma-Aldrich, 美国) 染蛋白 [27–28], $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 ConA (Sigma-Aldrich, 美国) 结合 α -甘露吡喃糖基和 α -吡喃糖基糖残基 [29] 以及 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DAPI (Sigma-Aldrich, 美国) 染生物膜上的 eDNA [30]。对每个生物膜进行间歇染色和冲洗, 每个步骤间隔 30 min, 再用磷酸盐缓冲液冲洗, 如此重复几次。通过激光共聚焦显微镜观察载玻片上的蛋白质、多糖以及 eDNA [31–34], 采用的通道对应的激发波长和发射波长分别为 FITC ($488 \text{ nm}/520 \text{ nm}$)、ConA ($543 \text{ nm}/560 \text{ nm}$) 和 DAPI ($371 \text{ nm}/397 \text{ nm}$)。应用 Image J 软件对激光共聚焦显微镜获得的 z 轴的图像进行处理。

2.9. 分子实验和生物信息学分析

通过高通量测序技术解析生物膜中的细菌群落, 由于 16S rRNA V4 区在结构域和门水平上具有最大的生物多样性 [35], 故选取该区域为扩增片段。应用蛋白酶 K 和十二烷基硫酸钠裂解液 [36] 从面积约为 6.25 cm^2 的生物膜中提取 DNA, 并依据制造商的方法使用 DNA Clean and Concentrator-25 试剂盒 (Zymo Research, 美国) 进行纯化。应用 NanoDrop-1000 分光光度计 (NanoDrop Technologies, 美国) 检测 DNA 在波长为 230 nm 、 260 nm 和 280 nm 处的吸光度 (吸光度比值: $260 \text{ nm}/280 \text{ nm}$, 约 1.8; $260 \text{ nm}/230 \text{ nm}$, 大于 1.8), 并通过 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。最后, 将 DNA 保存于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 的环境中, 直到进行聚合酶链反应。

采用通用引物扩增 16S rRNA V4 区, 分别为正向引物 515F ($5' \text{-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3'}$) 和反向引物 806R ($5' \text{-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'}$) [35]。为区分不同的样品, 对每个样品添加条形码, 并应用 Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer (New England Biolabs, 美国) 进行扩增。通过一系列反应 [37] 获得扩增产物后, 将三个 PCR 产物合并在一起, 并用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。同时, 应用 GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific, 美国) 纯化及 Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, 美国) 定量, 并等摩尔浓度混合。采用 Ion Plus Fragment Library Kit 48 rxns (Ion Torrent, 美国) 制备样品库, 并委托北京诺禾致源科技股份有限公司采用 Ion S5™ XL 测序仪 (Thermo Scientific, 美国) 进行单端测序。基于条形码, 将正向和反向的 reads 结合并分配到不同的样本中, 并将位于每条 read 末端的引物序列和条形码删除。删除碱基不明确、长度小于 100 bp 或平均质量得分小于 20 的序列。通过与参考数据集

(Greengenes database[†]) [38]进行比对, 删除干净序列中的嵌合体序列, 只保留有效序列进行下一步的分析。应用UPARSE pipeline [39]在97%的相似度下, 将序列聚类为可操作分类单元 (OTU), 并使用 Ribosomal Database Project classifier [40]在0.8的置信阈值下对每个OTU的代表性序列进行分类, 其中代表性序列指的是出现频率最高的序列。由于 Greengenes database 可将物种分类到种水平, 因此采用其进行分类。将每个样本的序列数归一化到同一深度 (每个样本 70 301 条序列), 以便进行后续分析。原始序列已提交至 National Center of Biotechnology Information 的 Sequence Read Archive 数据库, 序列号为 PRJ-NA692793。

应用 MEGA 6.0 [41]软件, 采用邻接法基于每个 OTU 的代表性序列构建系统发育树, 其中采用 Kimura two-parameter 距离模型测量 OTU 间遗传差异, 并进行数千次的 bootstrap 试验。更多的信息, 比如 OTU 的数量、每个 OTU 的 reads 数、每个分类单元的分布以及每个分类单元中 OTU 的比例等, 均使用 interactive tree of life online tool [42]进行了补充 (附录 A)。应用 R v3.5.2 绘制反映物种丰富度和丰度的韦恩图和圆形图, 应用 Origin 2018 绘制反映门水平的细菌相对丰度和生物多样性指数 (如 Shannon 指数、Chao1 指数和 ACE 指数) 的条形图。

3. 结果

3.1. 重力驱动膜滤系统中生物膜的理化性质

tap water-PVDF 系统的初始渗透通量高于其他两个系统 [图 1 (a)]。对于湖水过滤系统来讲, 两个系统的初始通量非常接近, 其中, lake water-PES 系统略高。对于所有系统来讲, 通量均随时间呈现出下降的趋势, 并在第 20 天达到接近稳定的状态, 这与其他在恒压下进行的实验结果一致 [5,11]。在稳定条件下, lake water-PVDF ($1.23 \text{ L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) 和 lake water-PES ($1.24 \text{ L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) 系统的通量略高于 tap water-PVDF ($1.10 \text{ L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$), 与运行初期的变化趋势相反。由此看来, 膜的通量与膜的亲、疏水性关系不大, 可能受到原水的影响, 并且氯化水的通量低于地表水。

然而, 从接触角的结果 [图 1 (b)] 可以看出, 累积的生物膜均是强疏水性的, 与水处理的过程无关, 这说明了生物膜的通性。同时, 可以发现所有生物膜中有机物的分子量范围为 1~100 kDa [图 1 (c)], 氯化水所形成生物膜

(tap water-PVDF) 的有机物浓度高于湖水所形成的生物膜 (lake water-PVDF 和 lake water-PES), 也就是说, 氯化水形成的生物膜中含有更多的有机物。从膜孔一样但是自来水中有机物的含量低可以看出, 微生物所具有的很强的胞外聚合物分泌能力是导致氯化水形成的生物膜中有机物浓度高的原因。

此外, 自来水所形成的生物膜的 ζ 电位 [$(-24.50 \pm 2.89) \text{ mV}$] 较湖水所形成的生物膜 [$(-29.83 \pm 2.78) \text{ mV}$ 和 $(-29.27 \pm 2.44) \text{ mV}$] 更负, 说明自来水所形成的生物膜上的物质更易接触 (静电斥力更低), 这可能是自来水形成的生物膜有机物浓度高的原因。对于在不同膜上所形成的湖水生物膜来讲, 其 ζ 电位非常接近。膜后的滤液中有超过 50% 的有机物是强疏水性的 [图 1 (e)], 但是对于长期运行的系统来讲, 两个湖水系统并没有在亲、疏水有机物方面呈现出明显的差异, 这也正说明了膜的亲、疏水性影响的有限性。

3.2. 生物污染层的形态结构

tap water-PVDF 过滤系统所形成的生物膜结构致密, 物质聚集在一起, 空隙较小 [图 2 (a)]。相比之下, 如图 2 (b)、(c) 所示, 湖水所形成的生物膜结构与自来水明显不同, 其呈现出多孔的“蜘蛛网”结构。tap water-PVDF 过滤系统所形成的生物膜 ($12.8 \mu\text{m}$) 比其他两种生物膜厚 [$5.8 \mu\text{m}$, lake water-PVDF 系统; $8.8 \mu\text{m}$, lake water-PES 系统; 图 2 (d) ~ (f)]。这为氯化水影响膜污染提供了直接有力的证据, 即过滤自来水导致了更严重的膜污染, 说明原水中的有机物可能不是影响膜污染的关键因素 (自来水的有机物浓度低而湖水的有机物浓度高), 而被膜截留的细菌起着重要的作用, 特别是那些未被氯去除的耐氯菌。此外, 从自来水和湖水所形成生物膜的结构差异可知, 被膜截留的细菌会影响其形成的生物膜结构。

3.3. 生物膜的颗粒及官能团分析

过滤自来水所形成的生物膜, 其颗粒较钝, 而过滤湖水所形成的生物膜中颗粒较尖锐 (图 3)。自来水所形成的生物膜的颗粒分布范围较广, 为 140~350 nm (频率大于 0.2) (附录 A 中的图 S2), 而 lake water-PVDF 和 lake water-PES 系统对应的范围分别为 85~210 nm 和 80~160 nm。tap water-PVDF 生物膜的粗糙度为 $(71.7 \pm 1.3) \text{ nm}$, 而 lake water-PVDF 和 lake water-PES 生物膜的粗糙度为 $(54.2 \pm 1.2) \text{ nm}$ 和 $(32.2 \pm 0.9) \text{ nm}$ (附录 A 中的表 S2)。这

[†] <http://greengenes.secondgenome.com>

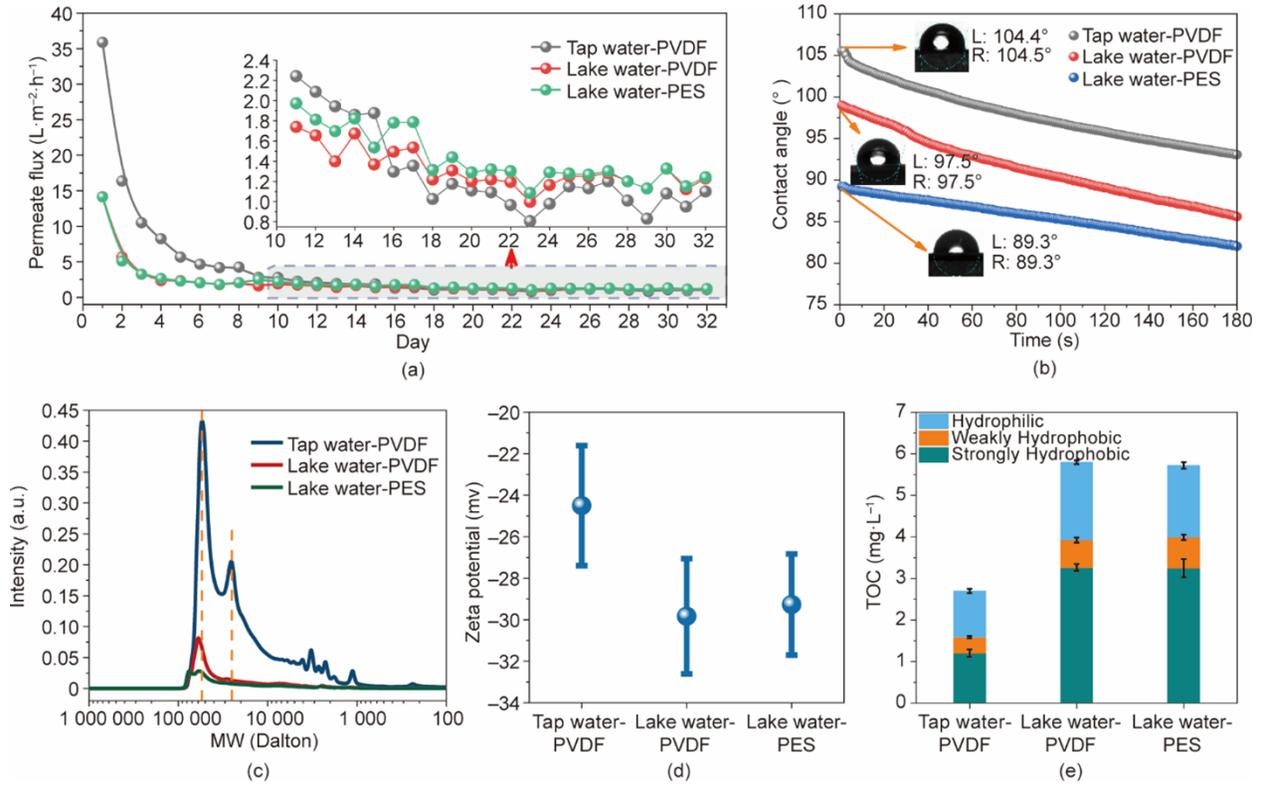


图1. 系统过滤性能及生物膜的物理化学性质。(a) 运行期间(32天)渗透通量的变化;(b) 接触角在180 s内的变化;(c) 氢氧化钠处理后各生物膜中有机物的分子量分布;(d) 生物膜的表面 ζ 电位;(e) 总有机碳表示的滤液中有有机物的亲、疏水组分。(b)~(e)中显示的结果是基于实验结束时的样品。a.u.: 任意单位。

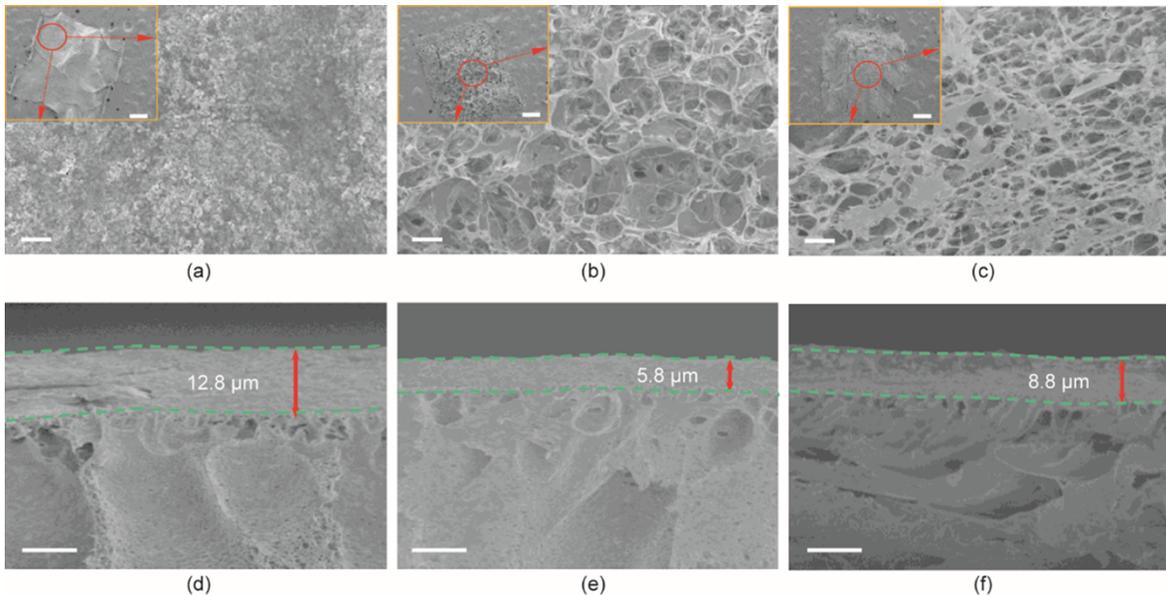


图2. 不同重力驱动过滤系统中生物膜的扫描电镜图像。(a)~(c)为生物膜(tap water-PVDF、lake water-PVDF和lake water-PES)的表面显微图像。插图为每个生物膜的初始图片, 比例尺为500 μm; 外部为红色方框的放大图像, 比例尺从(a)到(c)分别为1 μm、100 μm和100 μm。(d)~(f)为生物膜(tap water-PVDF、lake water-PVDF和lake water-PES)的横断面显微图像, 比例尺为10 μm。

些结果进一步揭示了生物膜中物质的尺寸和形态, 说明预氯化会对膜污染产生不利的影响, 这是因为自来水所形成的生物膜中的物质颗粒更大更钝, 更容易导致严重的生物污染。

根据傅里叶变换红外光谱显微图像[图3 (c)、(g)和(k)]和对应的谱图[图3 (d)、(h)、(l)]可知, 每个生物膜均存在三种主要成分, 并以不同的颜色显示。据不同颜色的出现频率可知, 物质1是主要成分, 其次是物质2和

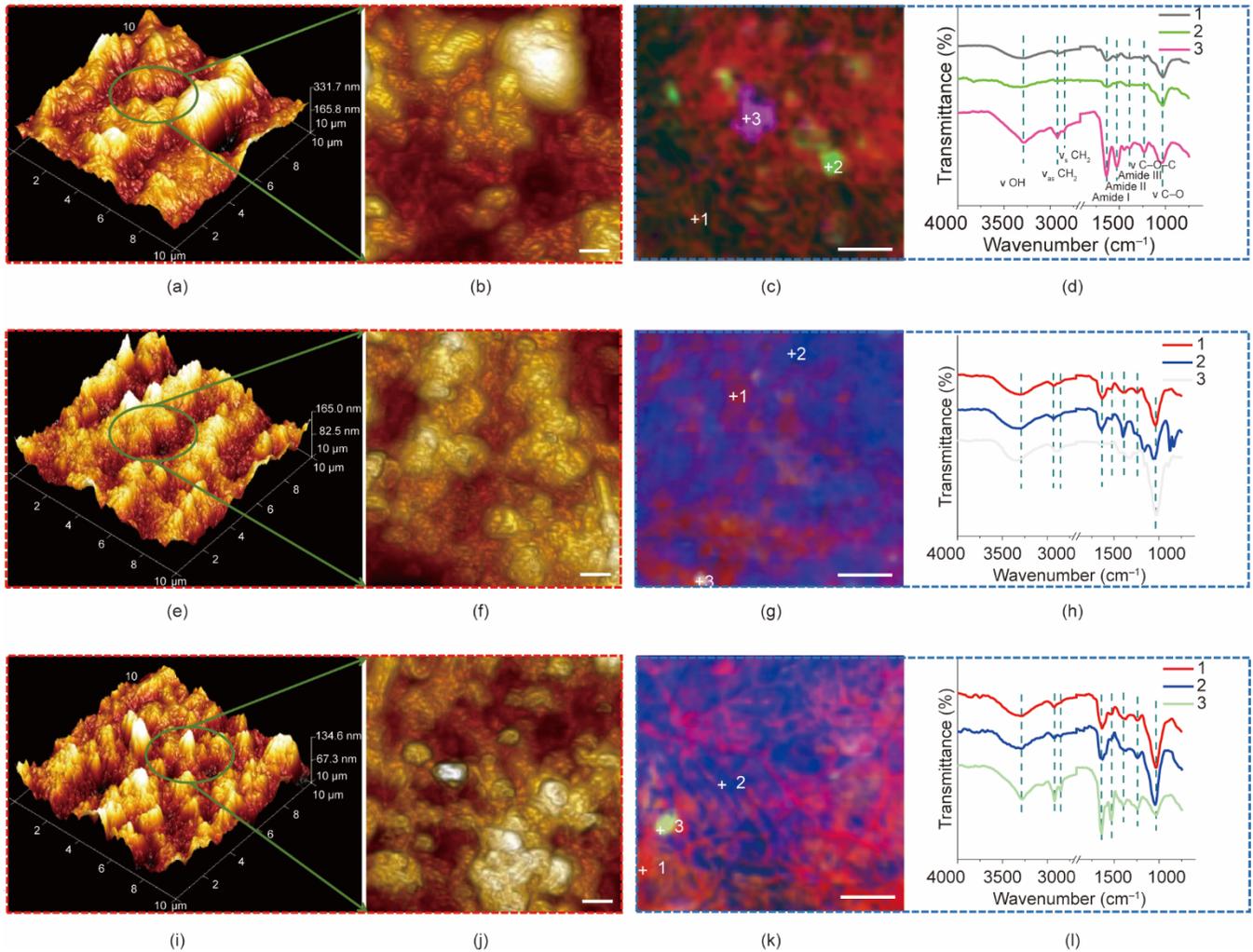


图3. 过滤自来水和湖水形成的生物膜的原子力显微图像和红外光谱图。(a)、(e)和(i)为各生物膜的原子力显微图像的三维结构；(b)、(f)和(j)为生物膜的表面形态，比例尺为 $1\ \mu\text{m}$ ；(c)、(g)和(k)为生物膜的原位显微图像，比例尺为 $100\ \mu\text{m}$ ；(d)、(h)和(l)为(c)、(g)和(k)中十字标记对应的红外光谱。上、中和下层分别对应tap water-PVDF、lake water-PVDF和lake water-PES样品。

物质3。物质1在lake water-PVDF和lake water-PES生物膜上的谱图较为相似，说明类似的物质被保留或被微生物分泌。在所有的生物膜中均可以观察到酰胺I ($1640\ \text{cm}^{-1}$)、酰胺II ($1528\ \text{cm}^{-1}$)和酰胺III ($1392\ \text{cm}^{-1}$) [43–47]的吸收带，这表明蛋白质分布广泛。因为这些谱带是蛋白质的特征峰，而且是形成蛋白质的重要成分[46]。此外，位于 $1052\ \text{cm}^{-1}$ 的C—O峰表明生物膜中存在多糖[43]。

当对比聚偏氟乙烯膜和聚醚砜膜在污染前后的谱图(附录A中的图S3)时，发现有几条吸收带存在显著的变化。由于酰胺I的伸缩振动，污染后的聚偏氟乙烯膜均在 $1651\ \text{cm}^{-1}$ 处出现吸收峰，说明膜中存在蛋白质。对于聚醚砜膜，未经污染的膜在O—H(伸缩振动)和 $-\text{CH}_2-$ 的吸收明显强于污染后的膜，说明附着在膜上的物质覆盖了膜的吸收峰，而被截留或分泌的物质决定了官能团的类型。

3.4. 生物膜基质组分的分布形态

根据每种颜色的荧光强度可知，在三个生物膜中，多糖(红色)比蛋白质(绿色)和eDNA(蓝色)更丰富[图4(a)~(c); 附录A中的动画S1~S3]。与其他两个生物膜相比，tap water-PVDF生物膜中存在大量的多糖和eDNA，而且它们的分布范围较广。但是，蛋白质较少，这可能与细菌的种类有关(分泌的蛋白质较少)。如前所述，湖水系统所形成的生物膜结构疏松。结合扫描电子显微图像的结果可知，自来水所形成的生物膜较厚的主要原因是其多糖含量较高，这是影响膜滤性能的重要因素。此外，我们发现蛋白质主要位于生物膜的下部，而多糖和eDNA主要位于生物膜的上部[图4(d)~(f)]。这些组分的空间分布结果表明，蛋白质直接与膜表层联系，这与膜的傅里叶变换红外光谱的结果一致。

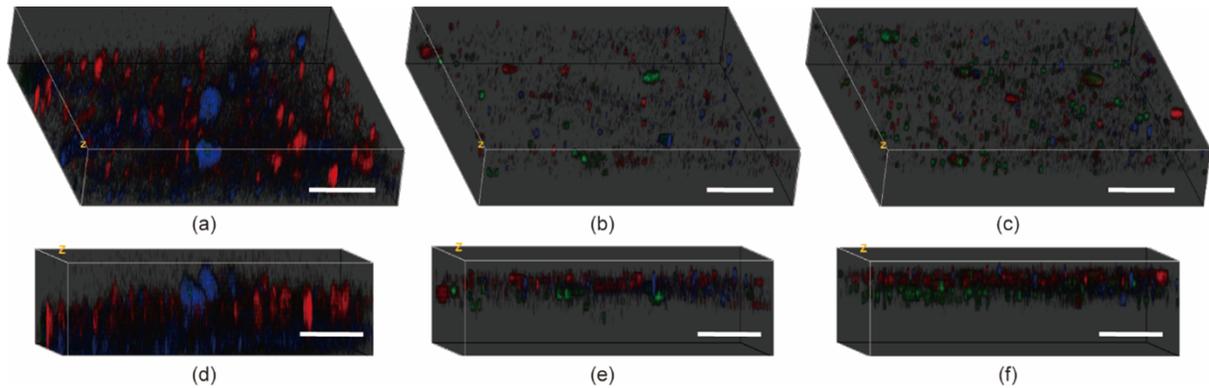


图4. 生物膜的激光共聚焦显微图像[FITC 染色蛋白 (绿色)、ConA 染色多糖 (红色)、DAPI 染色 eDNA (蓝色)]。(a) ~ (c) 为生物膜 tap water-PVDF、lake water-PVDF 和 lake water-PES 的俯视图；(d) ~ (f) 为生物膜 tap water-PVDF、lake water-PVDF 和 lake water-PES 的正视图。每张图都是在 z 轴上扫描生物膜获得的一系列显微照片的堆叠。代表 10 个记录位置。比例尺为 50 μm 。

3.5. 解析生物膜中细菌群落

根据基于 OTU 代表性序列构建的系统发育树[图 5 (a)]可知, 三个生物膜在门水平上共获得 20 个类群。OTU 数量最多的是 Proteobacteria (红色分支), 其次是 Bacteroidetes (青色分支) 和 Planctomycetes (蓝色分支)。在相对丰度方面[图 5 (b)], 条形图显示 Proteobacteria、Bacteroidetes 和 Planctomycetes 在三个生物膜中均是主要成分。Proteobacteria 的占比超过 50%, 说明其在生物膜中是非常重要的。Proteobacteria 和 Bacteroidetes 在自来水所形成的生物膜中的比例显著高于湖水所形成的生物膜。而对于两个湖水所形成的生物膜来讲, 由 Proteobacteria (48.54%, lake water-PVDF; 48.19%, lake water-PES)、Bacteroidetes (8.90%, 8.06%)、Planctomycetes (25.87%, 30.26%)、Actinobacteria (5.15%, 4.76%) 和 Chlamydiae (3.18%, 3.12%) 相似的相对丰度可见, 其细菌群落在门水平上较为相似。此外, 根据韦恩图[图 5 (c)]可知, 在三个生物膜中共有 251 个 OTU, 其中在两个湖水生物膜中共存的 OTU 达到 641 个, 这也证实了膜的亲、疏水性对细菌群落的影响是有限的。更详细的有关 Proteobacteria、Bacteroidetes 和 Planctomycetes 的信息, 见附录 A 中的图 S4、图 S5 及补充材料和方法。

基于以上分析, 对 20 个丰度最高的属在 OTU 和 reads 水平上进行了更小分类单元 (属) 的分析。在 OTU 水平上[图 6 (a)], *Gemmata*、*Planctomyces* 和 *Prostheco bacter* 的丰富度最高, 而 *Rhodoplanes*、*Rhodobacter* 和 *Pseudomonas* 的丰富度最低。对于同一属, 在不同的生物膜中, 其丰富度也存在差异。比如, *Aquicella* 在湖水所形成的生物膜中 OTU 数目最高, 而在自来水所形成的生物膜中数目较少。

如图 6 (b) 所示, 物种的丰度从 1 [如 *Kaistia* 和 *Poly nucleobacter* (tap water-PVDF)] 变化到 20 133 [如 *Xantho-*

bacter (tap water-PVDF)]。 *Xanthobacter* 能产生大量的黏液[48], 也被称为胞外聚合物。因此, 在自来水过滤系统中形成较厚的生物污染层的原因也就清晰了。 *Xanthobacter* 可以利用卤代烷烃作为其唯一的碳源, 对氯代脂肪族和氯代芳香族化合物进行脱卤[48]。由此, *Xanthobacter* 在细菌群落中占主导地位的原因也就明晰了。对于湖水所形成的生物膜, 在上述属中可以发现一致的变化。这可能是由于生物膜随着时间不断累积, 而对膜的选择性产生了不利的影响。此外, Shannon 指数[49]、Chao1 指数[50]和 ACE 指数[51] (附录 A 中的图 S6) 均表明, 自来水所形成生物膜的细菌群落的多样性低于湖水所形成的生物膜。

3.6. 过滤系统中有机物的去除效果

为进一步探究生物膜的差异及其在过滤系统中的作用, 对有机物的去除效果进行了研究。三维荧光光谱显示, 在原水及出水中主要存在两个峰, 分别位于 $\lambda_{\text{Ex/Em}} = 220\sim 250 \text{ nm}/280\sim 330 \text{ nm}$ 和 $\lambda_{\text{Ex/Em}} = 250\sim 290 \text{ nm}/280\sim 330 \text{ nm}$ [图 7 (a) ~ (c)]。依据传统的“峰匹配”技术[52]可知, 该峰是类酪氨酸类物质。将同一过滤系统的荧光光谱图进行比较时, 可以清楚地发现, 膜及附着的生物膜显著降低了类酪氨酸类物质的强度, 与进水和所用的膜无关。

此外, 利用平行因子分析法, 将有机物的荧光信号分解为潜在的单个荧光图谱[53–54], 以量化和追踪那些在化学上独立但是光谱重叠的有机成分的变化[55]。结果表明, tap water-PVDF 系统中原水和出水的荧光物质均不能进一步分解, 说明类酪氨酸类物质是独立的, 不受其他组分的光谱影响。但是, 对于湖水系统的有机物来讲, 其均被分解为类酪氨酸、类富里酸和类腐殖酸类物质 (附录 A 中的图 S7 和图 S8)。这些物质是通过检索包含大量已发表

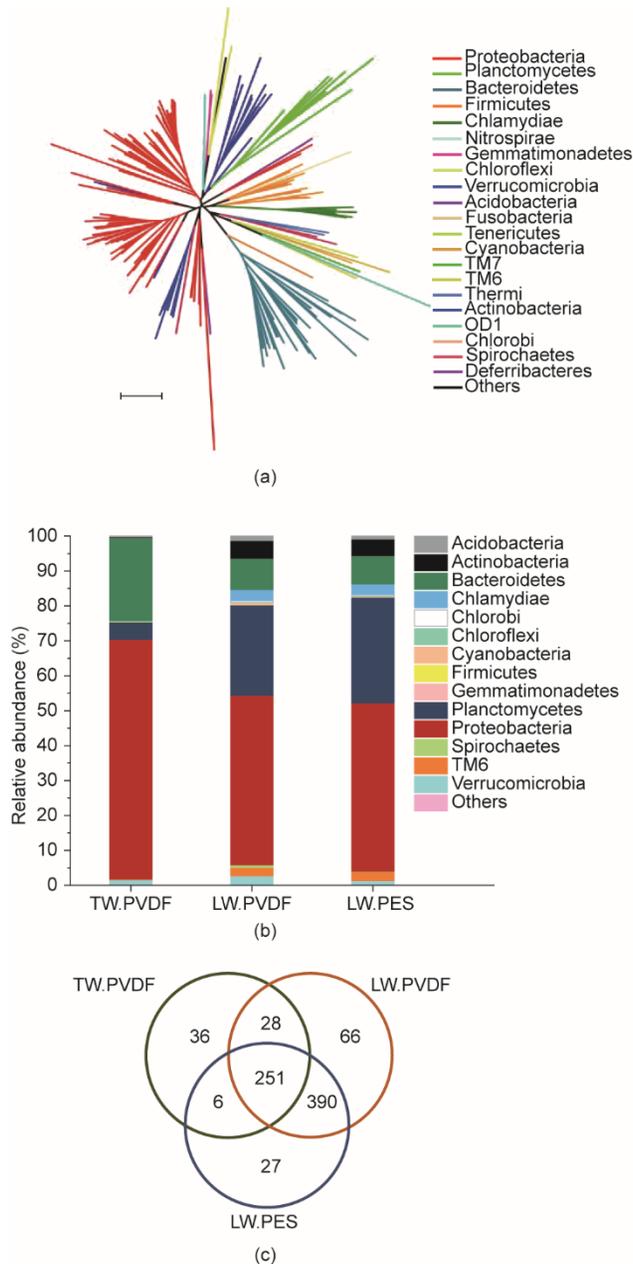


图5. 基于测序数据构建的进化树和不同生物膜中微生物的相对丰度。(a) 以所有分类中的代表性序列构建的进化树。距离为根据K_P方法测量的碱基替换数。比例尺表示0.1。(b) 在门水平上不同生物膜的细菌相对丰度。(c) 三种生物膜共有的OTU韦恩图。TW.PVDF表示tap water-PVDF, LW.PVDF表示lake water-PVDF, LW.PES表示lake water-PES。

的平行因子分析结果的数据库（即 OpenFluor database[‡]）确定的。虽然荧光强度发生了改变，但是过滤系统并没有改变水体中荧光物质的种类。与进水相比，出水中的类酪氨酸类物质明显减少，而其他两种组分几乎没变，说明被去除的荧光物质是类酪氨酸类物质。同时，根据高效尺寸排阻色谱的谱图[图7(d)~(f)]可知，所有过滤系统去

除的有机物的分子量范围为20~100 kDa，与“生物聚合物”的出现区域非常吻合[56–58]，验证了细菌在形成这些有机物中发挥了关键的作用。

4. 讨论

在本研究中，探讨了常见水体（氯化水和湖水）对膜污染的影响，膜的亲、疏水性在生物污染形成中的作用以及相关的关键微生物，主要包括应用重力驱动膜滤技术进行小型试验，分析生物膜的形态、理化性质、基质（胞外聚合物）及细菌群落。研究发现，自来水和湖水所形成的生物膜迥异。自来水过滤系统形成了更严重的膜污染，这表现为渗透通量较低，生物膜较厚。在以往的研究中发现[5]，溶解性有机物浓度对渗透通量稳定水平有重要的影响，表现为溶解性有机物浓度越高，渗透通量越低。然而，在本研究中，我们发现了相反的结果，这就意味着除了溶解性有机物浓度之外，其他重要因素（如细菌）可能参与其中。

自来水所形成的生物膜结构密实，这与添加叠氮化钠抑制生物活性的研究结果一致[5]，表明虽然大部分细菌已被杀死，但残余的细菌可能会分泌更多的胞外聚合物，从而形成更密实的结构和更严重的膜污染。然而，湖水所形成的生物膜是多孔的，类似蜘蛛网。这种迥异的结果可以解释为以下两点：首先，每种微生物分泌的胞外聚合物不同，产生的膜污染不同。不同的微生物群落可能会形成不同结构的生物膜。Akhondi等[11]研究表明，不同的微生物会显著影响生物污染层的形态。Bac等[59]也强调了细菌在生物膜形成中的重要作用。其次，胞外聚合物的分布模式会改变生物膜的结构。尽管从傅里叶变换红外光谱上可以看出，蛋白质、多糖和eDNA是主要的成分，但是其不同的分布模式可能会导致不同的生物膜形态。从激光共聚焦显微图像上可以看出，自来水和湖水所形成的生物膜中主要组分的形状和尺寸均存在显著差异，从而形成不同的生物污染层。Desmond等[15]也提出胞外聚合物的组成与生物膜的结构有关，表现为低浓度的多糖和eDNAs所形成的生物膜结构异质性更大，本研究中扫描电镜的结果也证实了这一点。

激光共聚焦显微图像显示，多糖和eDNAs主要位于生物膜的上部，而蛋白质主要位于底部，这与进水的类型及所用的膜无关。本研究首次提出了三种主要的胞外分泌物的空间分布信息，这将有助于了解它们在生物膜中所发

[‡] <https://openfluor.lablicate.com/>

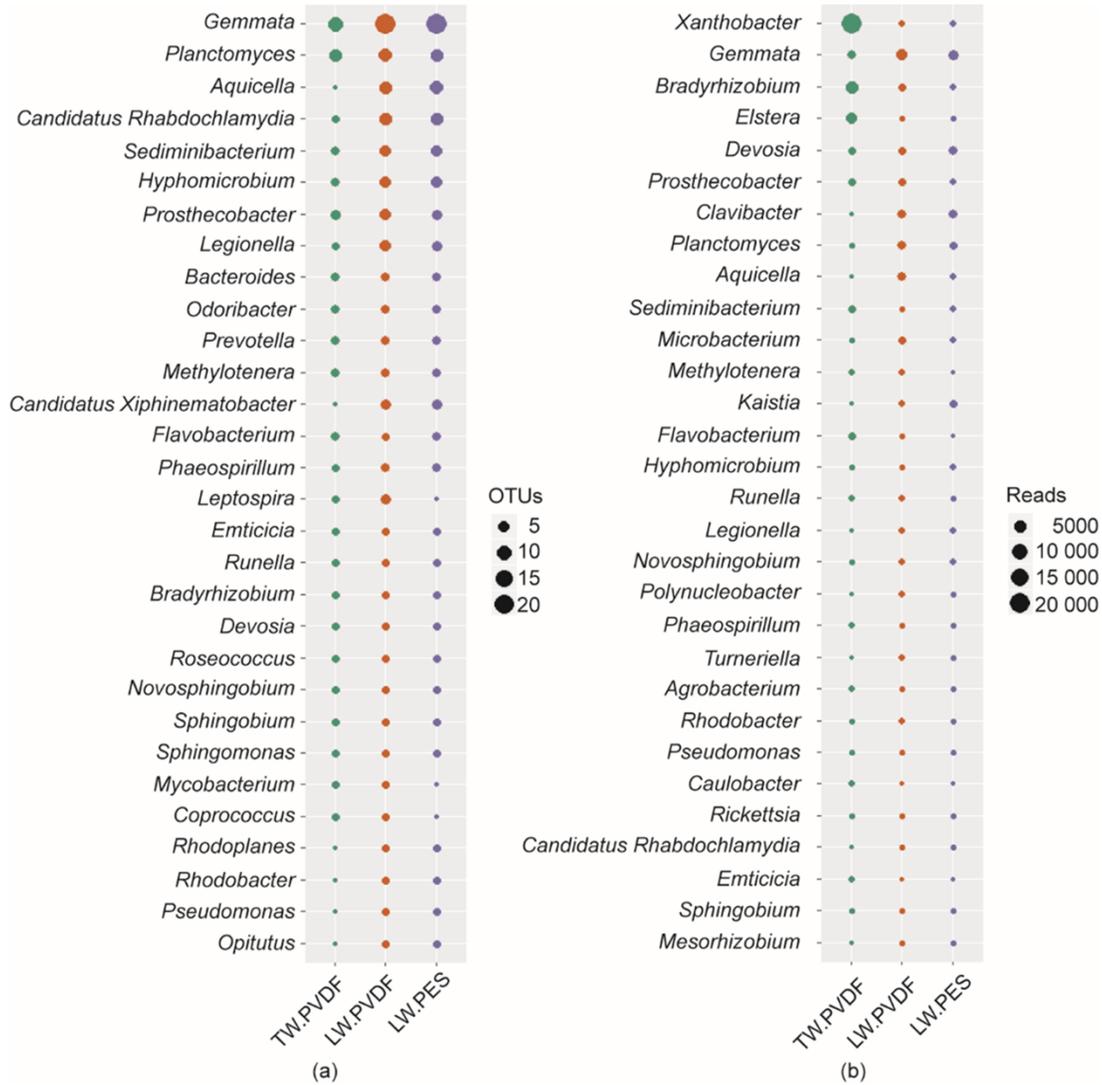


图6. 生物膜中微生物前20属的丰富度 (a) 和丰度 (b)。圆圈的大小表示各参数的数值，不同的颜色表示不同的生物膜。TW.PVDF表示 tap water-PVDF，LW.PVDF表示 lake water-PVDF，LW.PES表示 lake water-PES。

挥的作用。多糖和 eDNAs 可以保护细菌免受外界不利因素的干扰。而蛋白质由于具有丰富的官能团，可以与膜的活性层紧密结合，从而促进细菌在膜表面的生长，形成生物膜。

当分析生物膜菌落时，研究发现自来水所形成生物膜的优势类群为 *Xanthobacter*，其可以分泌大量的黏液（胞外聚合物）[48]。据报道，*Xanthobacter* 以卤代烷烃和卤代羧酸为食[60–61]，可以产生卤代烷烃脱卤酶，并从卤代物质中释放氯[61]。因此，*Xanthobacter* 在自来水所形成的生物膜中丰度极高也就不难理解。此外，这些未被氯去除的细菌在生物污染的形成中作用巨大，需要重视。然而，由于自来水的水源不同（地表水或地下水）、测序技术不同（Illumina [62]或454焦磷酸测序技术[63]）以及最小分类单元不同（门[63]、科[64]或属[65]），因此有关自

来水中 *Xanthobacter* 的信息比较缺乏。此外，由于本研究中测序样本数量有限，未分组进行统计学分析。但是，根据细菌组成分析的结果可以看出，本研究已揭示了不同生物膜中的关键类群。

根据扫描电子显微图像、 ζ 电位、官能团及激光共聚焦显微图像的结果可以看出，膜的亲、疏水性对生物污染层性能的影响较小。这是因为累积的生物膜覆盖在膜的活性层上，从而降低了它的重要性。随着生物膜的成熟，其性质逐渐由进水决定。

综上所述，本研究揭示了氯化水对膜污染的影响以及所导致的生物污染层的性质，并提出了细菌驱动的生物膜累积机制；深化了耐氯菌在生物污染形成中的认识，必将有助于更好地控制膜污染。

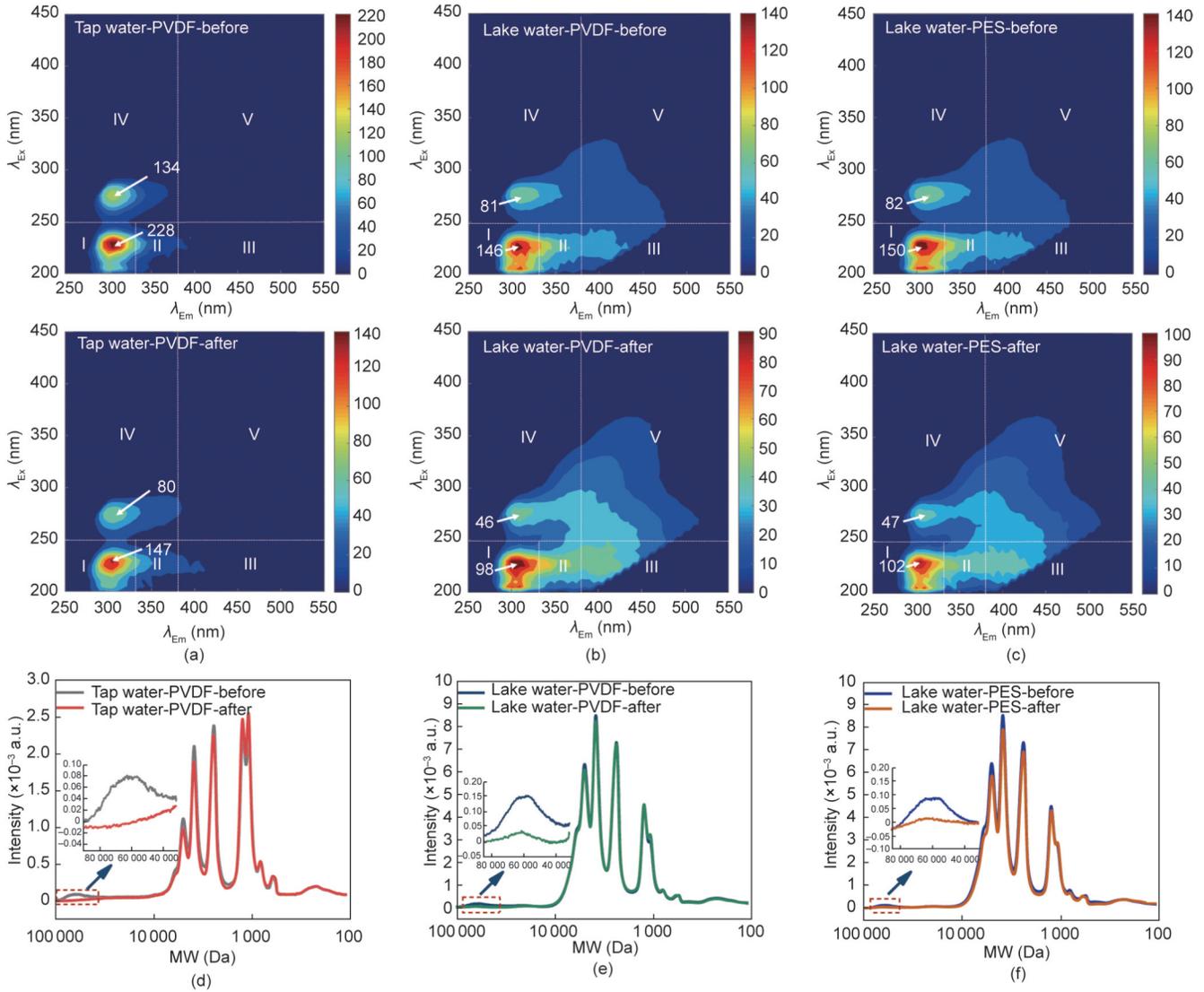


图7. 不同过滤系统中 (tap water-PVDF、lake water-PVDF 和 lake water-PES) 进、出水的有机物特征。(a)~(c) 为三维荧光光谱图, (d)~(f) 为分子量分布图。I~V 区分别表示类酪氨酸、类色氨酸、类富里酸、类可溶性微生物副产物和类腐殖酸物质。所有的分析都是在实验结束时进行的。“-before”和“-after”后缀分别表示进水和出水。

5. 结论

在本研究中, 我们发现氯化水 (自来水) 在过滤过程中比未经处理的地表水 (湖水) 产生了更严重的膜污染, 这表现为更低的渗透通量和更厚的生物膜。对于自来水形成的生物膜来讲, 其呈现出密实的形态, 而湖水所形成的生物膜是多孔的, 类似于蜘蛛网; 这与微生物的群落结构密切相关。16S rRNA 测序结果表明, *Xanthobacter* 是自来水所形成生物膜的优势类群。自来水所形成的生物膜中多糖和 eDNA 的含量高于湖水所形成的生物膜, 这表明多糖和 eDNA 在膜污染中起着关键性的作用。同时, 我们发现膜的亲、疏水性对膜污染特性和微生物群落的影响很小。此外, 本研究首次揭示了基质的主要成分在垂直方向上的

分布规律, 蛋白质主要位于生物膜的下部, 多糖和 eDNA 位于生物膜的上部, 这对于探究它们在生物膜中所发挥的作用具有重要的意义。

致谢

本研究得到了科技部重点研发计划(2019YFD1100104 和 2019YFC1906501)的资助。

Compliance with ethics guidelines

Li Zhang, Lei Xu, Nigel Graham, and Wenzheng Yu declare that they have no conflict of interest or financial

conflicts to disclose.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.03.016>.

References

- [1] Mekonnen MM, Hoekstra AY. Four billion people facing severe water scarcity. *Sci Adv* 2016;2(2):e1500323.
- [2] Desmond P, Morgenroth E, Derlon N. Physical structure determines compression of membrane biofilms during gravity driven membrane (GDM) ultrafiltration. *Water Res* 2018;143:539–49.
- [3] Chawla C, Zwijnenburg A, Kemperman AJB, Nijmeijer K. Fouling in gravity driven point-of-use drinking water treatment systems. *Chem Eng J* 2017;319: 89–97.
- [4] Gao W, Liang H, Ma J, Han M, Chen ZL, Han ZS, et al. Membrane fouling control in ultrafiltration technology for drinking water production: a review. *Desalination* 2011;272(1–3):1–8.
- [5] Peter-Varbanets M, Hammes F, Vital M, Pronk W. Stabilization of flux during dead-end ultra-low pressure ultrafiltration. *Water Res* 2010;44(12):3607–16.
- [6] Peter-Varbanets M, Margot J, Traber J, Pronk W. Mechanisms of membrane fouling during ultra low pressure ultrafiltration. *J Membr Sci* 2011;377(1–2): 42–53.
- [7] Ding An, Wang J, Lin D, Tang X, Cheng X, Li G, et al. *In situ* coagulation versus pre-coagulation for gravity-driven membrane bioreactor during decentralized sewage treatment: permeability stabilization, fouling layer formation and biological activity. *Water Res* 2017;126:197–207.
- [8] Ding An, Liang H, Li G, Szivak I, Traber J, Pronk W. A low energy gravity-driven membrane bioreactor system for grey water treatment: permeability and removal performance of organics. *J Membr Sci* 2017;542:408–17.
- [9] Wang Y, Fortunato L, Jeong S, Leiknes T. Gravity-driven membrane system for secondary wastewater effluent treatment: filtration performance and fouling characterization. *Sep Purif Technol* 2017;184:26–33.
- [10] Ding A, Wang J, Lin D, Cheng X, Wang H, Bai L, et al. Effect of PAC particle layer on the performance of gravity-driven membrane filtration (GDM) system during rainwater treatment. *Environ Sci Water Res Technol* 2018;4:48–57.
- [11] Akhondi E, Wu B, Sun S, Marxer B, Lim W, Gu J, et al. Gravity-driven membrane filtration as pretreatment for seawater reverse osmosis: linking biofouling layer morphology with flux stabilization. *Water Res* 2015;70:158–73.
- [12] Derlon N, Mimoso J, Klein T, Koetzsch S, Morgenroth E. Presence of biofilms on ultrafiltration membrane surfaces increases the quality of permeate produced during ultra-low pressure gravity-driven membrane filtration. *Water Res* 2014; 60:164–73.
- [13] Ding An, Liang H, Li G, Derlon N, Szivak I, Morgenroth E, et al. Impact of aeration shear stress on permeate flux and fouling layer properties in a low pressure membrane bioreactor for the treatment of grey water. *J Membr Sci* 2016;510:382–90.
- [14] Klein T, Zihlmann D, Derlon N, Isaacson C, Szivak I, Weissbrodt DG, et al. Biological control of biofilms on membranes by metazoans. *Water Res* 2016;88: 20–9.
- [15] Desmond P, Best JP, Morgenroth E, Derlon N. Linking composition of extracellular polymeric substances (EPS) to the physical structure and hydraulic resistance of membrane biofilms. *Water Res* 2018;132:211–21.
- [16] Chomiak A, Traber J, Morgenroth E, Derlon N. Biofilm increases permeate quality by organic carbon degradation in low pressure ultrafiltration. *Water Res* 2015;85:512–20.
- [17] Pronk W, Ding An, Morgenroth E, Derlon N, Desmond P, Burkhardt M, et al. Gravity-driven membrane filtration for water and wastewater treatment: a review. *Water Res* 2019;149:553–65.
- [18] Park KY, Choi SY, Lee S-H, Kweon JH, Song JH. Comparison of formation of disinfection by-products by chlorination and ozonation of wastewater effluents and their toxicity to *Daphnia magna*. *Environ Pollut* 2016;215:314–21.
- [19] Li Z, Liu X, Huang Z, Hu S, Wang J, Qian Z, et al. Occurrence and ecological risk assessment of disinfection byproducts from chlorination of wastewater effluents in East China. *Water Res* 2019;157:247–57.
- [20] Deborde M, von Gunten U. Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment-kinetics and mechanisms: a critical review. *Water Res* 2008;42(1–2):13–51.
- [21] Diana M, Felipe-Sotelo M, Bond T. Disinfection byproducts potentially responsible for the association between chlorinated drinking water and bladder cancer: a review. *Water Res* 2019;162:492–504.
- [22] Knozowska K, Kujawski W, Zatorska P, Kujawa J. Pervaporative efficiency of organic solvents separation employing hydrophilic and hydrophobic commercial polymeric membranes. *J Membr Sci* 2018;564:444–55.
- [23] Zhao L, Wu C, Lu X, Ng D, Truong YB, Zhang J, et al. Theoretical guidance for fabricating higher flux hydrophobic/hydrophilic dual-layer membranes for direct contact membrane distillation. *J Membr Sci* 2020;596:117608.
- [24] Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 2010;8(9): 623–33.
- [25] Bereschenko LA, Heilig GH, Nederlof MM, van Loosdrecht MC, Stams AJ, Euverink GJ. Molecular characterization of the bacterial communities in the different compartments of a full-scale reverse-osmosis water purification plant. *Appl Environ Microbiol* 2008;74(17):5297–304.
- [26] Wu B, Suwarno SR, Tan HS, Kim LH, Hochstrasser F, Chong TH, et al. Gravity-driven microfiltration pretreatment for reverse osmosis (RO) seawater desalination: microbial community characterization and RO performance. *Desalination* 2017;418:1–8.
- [27] Akram KM, Yates LL, Mongey R, Rothery S, Gaboriau DCA, Sanderson J, et al. Live imaging of alveologenesis in precision-cut lung slices reveals dynamic epithelial cell behaviour. *Nat Commun* 2019;10(1):1178.
- [28] Teirlinck E, Xiong R, Brans T, Forier K, Fraire J, Van Acker H, et al. Laser-induced vapour nanobubbles improve drug diffusion and efficiency in bacterial biofilms. *Nat Commun* 2018;9(1):4518.
- [29] Yu W, Xu L, Graham N, Qu J. Pre-treatment for ultrafiltration: effect of prechlorination on membrane fouling. *Sci Rep* 2014;4(1):6513.
- [30] Denis K, Le Bris M, Le Guennec L, Barnier JP, Faure C, Gouge A, et al. Targeting Type IV pili as an antivirulence strategy against invasive meningococcal disease. *Nat Microbiol* 2019;4(6):972–84.
- [31] Kuijl C, Savage ND, Marsman M, Tuin AW, Janssen L, Egan DA, et al. Intracellular bacterial growth is controlled by a kinase network around PKB/AKT1. *Nature* 2007;450(7170):725–30.
- [32] Lawrence JR, Neu TR. Confocal laser scanning microscopy for analysis of microbial biofilms. *Methods Enzymol* 1999;310:131–44.
- [33] Schlafer S, Meyer RL. Confocal microscopy imaging of the biofilm matrix. *J Microbiol Methods* 2017;138:50–9.
- [34] Castello M, Tortarolo G, Buttafava M, Deguchi T, Villa F, Koho S, et al. A robust and versatile platform for image scanning microscopy enabling superresolution FLIM. *Nat Methods* 2019;16(2):175–8.
- [35] Peiffer JA, Spor A, Koren O, Jin Z, Tringe SG, Dangel JL, et al. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(16):6548–53.
- [36] Yuan J, Li M, Lin S, Hoheisel JD. An improved DNA extraction method for efficient and quantitative recovery of phytoplankton diversity in natural assemblages. *PLoS ONE* 2015;10(7):e0133060.
- [37] Guo X, Zhou X, Hale L, Yuan M, Ning D, Feng J, et al. Climate warming accelerates temporal scaling of grassland soil microbial biodiversity. *Nat Ecol Evol* 2019;3(4):612–9.
- [38] DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* 2006;72(7):5069–72.
- [39] Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods* 2013;10(10):996–8.
- [40] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 2007;73(16):5261–7.
- [41] Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013;30(12):2725–9.
- [42] Letunic I, Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res* 2016; 44(W1):W242–5.
- [43] Schmitt J, Flemming HC. FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. *Int Biodeter Biodegr* 1998;41(1):1–11.
- [44] Sailakshmi G, Mitra T, Sinha S, Chatterjee S, Gnanamani A, Mandal AB. Suberic acid acts as a dissolving agent as well as a crosslinker for natural polymers (carbohydrate and protein): a detailed discussion on the chemistry

- behind the interaction. *J Macromol Sci Part A Pure Appl Chem* 2012;49(8): 619–29.
- [45] Mann D, Teuber C, Tennigkeit SA, Schröter G, Gerwert K, Kötting C. Mechanism of the intrinsic arginine finger in heterotrimeric G proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016;113(50):E8041–50.
- [46] Jung H, Pena-Francesch A, Saadat A, Sebastian A, Kim DH, Hamilton RF, et al. Molecular tandem repeat strategy for elucidating mechanical properties of high-strength proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016;113(23):6478–83.
- [47] Edington SC, Gonzalez A, Middendorf TR, Halling DB, Aldrich RW, Baiz CR. Coordination to lanthanide ions distorts binding site conformation in calmodulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018;115(14):E3126–34.
- [48] Wiegel J. The genus *Xanthobacter*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, editors. *The prokaryotes*. Volume 5: Proteobacteria: alpha and beta subclasses. New York: Springer; 2006. p. 290–314.
- [49] Hill MO. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology* 1973;54(2):427–32.
- [50] Causey BD. Parametric estimation of the number of classes in a population. *J Appl Stat* 2002;29(6):925–34.
- [51] Chao A, Lee SM. Estimating the number of classes via sample coverage. *J Am Stat Assoc* 1992;87(417):210–7.
- [52] Chen W, Westerhoff P, Leenheer JA, Booksh K. Fluorescence excitation—emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter. *Environ Sci Technol* 2003;37(24):5701–10.
- [53] Stedmon CA, Bro R. Characterizing dissolved organic matter fluorescence with parallel factor analysis: a tutorial. *Limnol Oceanogr Methods* 2008;6(11):572–9.
- [54] Bahram M, Bro R, Stedmon C, Afkhami A. Handling of Rayleigh and Raman scatter for PARAFAC modeling of fluorescence data using interpolation. *J Chemometr* 2006;20(3–4):99–105.
- [55] Wünsch UJ, Murphy KR, Stedmon CA. The one-sample PARAFAC approach reveals molecular size distributions of fluorescent components in dissolved organic matter. *Environ Sci Technol* 2017;51(20):11900–8.
- [56] Yu W, Liu T, Crawshaw J, Liu T, Graham N. Ultrafiltration and nanofiltration membrane fouling by natural organic matter: mechanisms and mitigation by pre-ozonation and pH. *Water Res* 2018;139:353–62.
- [57] Yu W, Graham NJD, Fowler GD. Coagulation and oxidation for controlling ultrafiltration membrane fouling in drinking water treatment: application of ozone at low dose in submerged membrane tank. *Water Res* 2016;95:1–10.
- [58] Yu W, Zhang D, Graham NJD. Membrane fouling by extracellular polymeric substances after ozone pre-treatment: variation of nano-particles size. *Water Res* 2017;120:146–55.
- [59] Bae H, Kim H, Jeong S, Lee S. Changes in the relative abundance of biofilmforming bacteria by conventional sand-filtration and microfiltration as pretreatments for seawater reverse osmosis desalination. *Desalination* 2011; 273(2–3):258–66.
- [60] Abe Y, Zopfi J, Hunkeler D. Effect of molecule size on carbon isotope fractionation during biodegradation of chlorinated alkanes by *Xanthobacter autotrophicus* GJ10. *Isotopes Environ Health Stud* 2009;45(1):18–26.
- [61] Rozeboom HJ, Kingma J, Janssen DB, Dijkstra BW. Crystallization of haloalkane dehalogenase from *Xanthobacter autotrophicus* GJ10. *J Mol Biol* 1988;200(3):611–2.
- [62] Ling F, Whitaker R, LeChevallier MW, Liu WT. Drinking water microbiome assembly induced by water stagnation. *ISME J* 2018;12(6):1520–31.
- [63] Lin W, Yu Z, Zhang H, Thompson IP. Diversity and dynamics of microbial communities at each step of treatment plant for potable water generation. *Water Res* 2014;52:218–30.
- [64] Li C, Ling F, Zhang M, Liu WT, Li Y, Liu W. Characterization of bacterial community dynamics in a full-scale drinking water treatment plant. *J Environ Sci* 2017;51:21–30.
- [65] Liu G, Ling FQ, van der Mark EJ, Zhang XD, Knezev A, Verberk JQJC, et al. Comparison of particle-associated bacteria from a drinking water treatment plant and distribution reservoirs with different water sources. *Sci Rep* 2016; 6(1):20367.