

污水处理与回用

寸淑娟, 王宪文, 曹平波, 等. 城市污水处理厂病原菌多样性及健康风险评价[J]. 净水技术, 2024, 43(10): 77-85.

CUN S J, WANG X W, CAO P B, et al. Evaluation of pathogenic bacterial diversity and health risks in urban WWTPs[J]. Water Purification Technology, 2024, 43(10): 77-85.

城市污水处理厂病原菌多样性及健康风险评价

寸淑娟^{1,2,3}, 王宪文³, 曹平波³, 李 宗¹, 黄 婷¹, 鲁智皓³, 刘如钢^{1,2,*}

(1. 中国科学院大学资源与环境学院, 北京 100049; 2. 滨州魏桥国科高等技术研究院, 山东滨州 256200; 3. 保山市检验检测院, 云南保山 678099)

摘 要 污水中普遍存在大量病原菌, 污水处理厂作为接收和处理污水的主要场所, 在控制病原菌污染和保障再生水安全中发挥重要作用。研究利用 16S rRNA 测序技术和实时荧光定量 PCR 技术对中国北方一座污水处理厂夏、冬两季的细菌群落结构和病原细菌存在情况进行分析。研究结果表明, 共检出 27 个病原菌属, 其中假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 是主要病原菌属。经过一系列工艺处理, 出水含有病原菌属数目和含量明显降低, 但发现常规出水检测指标大肠杆菌不能指示其他病原菌的存在情况和风险水平, 提示仍需引入新的检测指标减少再生水回用的病原菌风险。

关键词 污水处理厂 多样性 病原菌 健康风险 大肠杆菌 嗜肺军团菌

中图分类号: TU992 文献标识码: A 文章编号: 1009-0177(2024)10-0077-09

DOI: 10.15890/j.cnki.jsjs.2024.10.010

Evaluation of Pathogenic Bacterial Diversity and Health Risks in Urban WWTPs

CUN Shujuan^{1,2,3}, WANG Xianwen³, CAO Pingbo³, LI Zong¹, HUANG Ting¹, LU Zhihao³, LIU Ruyin^{1,2,*}

(1. College of Resources and Environment, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

2. Binzhou Institute of Technology, Binzhou 256200, China;

3. Baoshan City Testing and Inspection Institute, Baoshan 678099, China)

Abstract A large number of pathogenic bacteria are commonly found in wastewater, and wastewater treatment plants (WWTPs), as the main sites for receiving and treating wastewater, play an important role in controlling pathogenic bacterial contamination and ensuring the safety of reclaimed water. In this study, the bacterial community structure and the presence of pathogenic bacteria in a WWTP in northern China during summer and winter were analyzed using 16S rRNA sequencing and real-time fluorescence quantitative PCR techniques. The results showed that a total of 27 pathogen-containing bacterial genera were detected, among which *Pseudomonas* and *Acinetobacter* were the main pathogenic genera. After a series of process treatment, the number and content of pathogenic genera in the effluent were significantly reduced, but it was found that the conventional effluent testing index *Escherichia coli* could not indicate the presence and risk level of other pathogenic bacteria, suggesting that new testing indices still need to be introduced to reduce the risk of pathogenic bacteria in reclaimed water reuse.

Keywords wastewater treatment plant (WWTP) diversity pathogenic bacteria health risk *Escherichia coli* *Legionella pneumophila*

[收稿日期] 2023-08-07

[基金项目] 国家重点研发计划“政府间国际科技创新合作”重点专项(2019YFE0122400); 中国科学院大学魏桥国科联合实验室科研项目(GYY-DTFZ-2022-010)

[作者简介] 寸淑娟(1997—), 女, 硕士, 研究方向为环境微生物与分子生态学, E-mail: cunshujuan@163.com。

[通信作者] 刘如钢, 副教授, E-mail: Lry1981@ucas.ac.cn。

随着我国人口增长、城市化进程加快和经济社会发展, 污水排放总量也逐年升高。大量污水在排放前必须经过污水处理厂一系列处理, 达到排放标准。细菌在污水处理中发挥着重要的作用, 如变形菌门(Proteobacteria)细菌参与脱氮除磷、拟杆

菌门(Bacteroidota)细菌参与有机物降解、厚壁菌门(Firmicutes)细菌参与反硝化等^[1-2]。

除发挥污水处理作用的功能细菌外,污水处理厂中还包含大量病原细菌,形成病原菌的“汇”。病原细菌随感染者排泄物进入污水管道,最终汇入城市污水处理厂^[3]。研究^[4-6]指出,污水处理厂中存在沙门氏菌(*Salmonella*)、志贺氏菌(*Shigella*)、大肠杆菌和军团菌(*Legionella*)等多种病原细菌,感染可引发各类胃肠道和呼吸系统疾病。值得注意的是,目前已发现超过 50 种 *Legionella*,其中近 1/2 与人类疾病有关^[7]。通常情况下,经过污水处理厂处理和消毒灭活后病原菌的数量会大大降低,但部分病原菌生存能力强,难以完全去除^[8],直接或间接暴露于含病原细菌的水体中可能会增加水媒传染病感染风险。Pruss 等^[9]统计数据显示,水媒传染病感染造成的死亡人数约占全世界总死亡人数的 4%。由此可见,增强对污水处理各环节病原细菌的系统研究,明晰其群落结构和物种组成,对控制再生水中致病菌的环境排放,保障生态安全和公众健康具有重要意义。

一般来说,消毒是污水处理厂灭活病原细菌的主要手段,但是较高的病原微生物负荷会影响消毒效果。为了降低污水处理厂出水的微生物风险,避免消毒剂投加量升高对排放水体的负面影响,需要明确各工艺段对病原细菌的削减程度。目前,对污水处理厂不同工艺段病原细菌的存在状况和控制效果研究较少,为了规避病原细菌带来的公共健康风险,亟需明晰各工艺段病原细菌分布情况及对病原细菌的去除效能,这对病原细菌的控制和再生水的回用安全具有重要意义。因此,本研究通过 16S rRNA 测序技术分析污水处理厂夏、冬两季中细菌群落结构和优势菌群、确定潜在的病原细菌,采用实时荧光定量 PCR 技术(real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR)定量检测典型病原菌大肠杆菌和含量并利用微生物风险评估模型评估其健康分析,以期对污水处理厂中的细菌,特别是病原细菌群落结构及分布状况及风险水平进行全面解析。

1 材料与方法

1.1 样品采集与预处理

本研究以中国北方某活性污泥工艺污水处理厂(工艺流程如图 1 所示)为研究对象,于夏(2021-08)、冬(2021-12—2022-01)两季选取原水(100 mL)、曝气池出水(500 mL)、二沉池出水(500 mL)、超滤膜出水(3 L)、臭氧消毒池出水(3 L)、紫外消毒池出水(3 L)及曝气池污泥(1 mL)进行样品采集,每周 1 次,夏季连续取样 4 周,冬季连续取样 3 周,共采集 49 份样品。采集到的样品暂存于 4 ℃ 冰箱中,24 h 内完成预处理和基因组 DNA 提取。利用真空抽滤装置和 0.22 μm 微孔滤膜(Merck Millipore, Billerica, MA, USA)过滤水样以截留细菌。

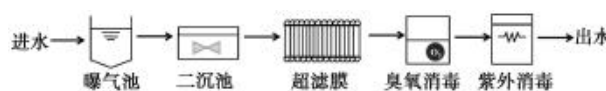


图 1 污水处理厂工艺流程

Fig. 1 Process of WWTP

1.2 基因组 DNA 提取

用无菌剪刀和无菌镊将滤膜剪碎,放入 Lysing Matrix E Tube 中,按照 Fast DNATM Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, Solon, OH, USA) 试剂盒提供的说明书提取样本的基因组 DNA。采用 Nanodrop 微量分光光度计(Thermo, USA)对 DNA 浓度及纯度进行测定,并置于-20 ℃下保存。

1.3 16S rRNA 基因高通量测序及数据分析

采用引物对 338F (5'-ACTCCTACGGGAGG-CAGCA-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTW-TCTAAT-3') 扩增细菌 16S rRNA 的 V3-V4 高变区。PCR 体系如下: 2 × Pro Taq 10 μL, 上游引物 (5 μmol/L) 0.8 μL, 下游引物 (5 μmol/L) 0.8 μL, Template DNA 10 ng/μL, 无菌水补足至 20 μL。PCR 条件如下: 95 ℃ 预变性 3 min, 在 95 ℃ 30 s, 50 ℃ 30 s, 72 ℃ 42 s 下进行 30 个循环, 最后在 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物送至上海美吉生物医药科技有限公司进行 16S rRNA 测序, 测序平台为 Illumina Miseq (Illumina, USA)。

对于得到原始测序数据, 首先使用 Trimmomatic v0.39 除去序列中的 barcode, 然后使用 FLASH v1.2.11 对短序列进行拼接以组装成长序列。使用 QIIME 2 对拼接序列进行质量控制和后续分析, 具

体如下:将所得序列进行相似性分析,并划分操作分类单元(OTUs)(相似性大于0.97),随后使用Uparse 7.0.1090(<http://drive5.com/uparse/>)软件对Tags在97%的相似度水平下进行聚类以获得OTUs,有效序列与SILVA数据库(Release138 <http://www.arb-silva.de>)进行对比并对OTUs进行分类学注释,分别在各个分类水平下统计各样本的群落组成与OTUs信息。参考Fang等^[10]的微生物 α 多样性指数算法计算Chao(物种丰度)指数、Shannon(物种多样性)指数和Coverage(覆盖度)指数。基于R语言(version 3.3.1)工具绘制群落结构柱状图。夏、冬两季和不同工艺段中组间差异的比较采用Kruskal-Wallis秩检验和单因素方差分析进行检验。

1.4 qPCR

根据Donohue等^[11]建立的嗜肺军团菌定量检测方法,采用引物对(正向:Lpneu CGGAATTACTGGCGTAAAGG,反向:Lpneu GAGTCAACCACTATTATCTGACCG)和探针(Lpneu FAM-AAGCCCA-GGAATTTACAGAT-TAMRA)。反应体系(20 μ L):10 μ L Premix Ex Taq(Takara,JP),0.4 μ L正向引物(10 μ mol/L),0.4 μ L反向引物(10 μ mol/L),0.4 μ L探针(10 μ mol/L),1 μ L DNA模板,0.4 μ L BSA(5 mg/mL),7.4 μ L无菌水。反应条件如下:95 $^{\circ}$ C预变性10 min,在95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 s下进行45个循环,最后在40 $^{\circ}$ C下延伸30 s。根据Maheux等^[12]建立的大肠杆菌SYBR定量检测方法,采用引物对(正向:UAL TGGTAAATTACCGAC-GAAAACGGC,反向:UAR ACGCGTGTTACAGTCT-TGCCG)对样品中的目标细菌进行定量。反应体系(20 μ L)如下:10 μ L SYBR Green1染料(Takara,JP),0.4 μ L正向引物(10 μ mol/L),0.4 μ L反向引物(10 μ mol/L),1 μ L DNA模板,0.5 μ L的ROX染料(50X),0.4 μ L BSA(5 mg/mL),7.3 μ L无菌水。反应条件如下:95 $^{\circ}$ C预变性5 min,在95 $^{\circ}$ C 1 min,62 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min下进行35个循环,最后在72 $^{\circ}$ C下延伸10 min;qPCR扩增仪器为ABI Q1(Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)。

1.5 健康风险评估

本研究按照美国环境保护署推荐的风险评价“四步法”,对污水处理厂中嗜肺军团菌和大肠杆菌

的风险进行评估。较为常用的是表1中Hass等^[13]提出的“指数模型”与“Beta-Poisson模型”[式(1)~式(2)],根据Semerjian等^[14]假定每人意外摄入1 mL/d污水。

表1 健康风险评估模型

Tab. 1 Models of Health Risk Assessment			
病原菌	模型	参数	
嗜肺军团菌 ^[15]	$P_i = 1 - e^{-rd}$	(1)	$r = 0.059\ 9$
大肠杆菌 ^[16]	$P_i = 1 - \left[1 + \left(\frac{d}{N_{50}} \right) \left(2^{\frac{1}{\alpha}} - 1 \right) \right]^{-\alpha}$	(2)	$N_{50} = 2.11 \times 10^6$ $\alpha = 1.55 \times 10^{-1}$

注: r —单个病原菌感染的概率常数; P_i —感染概率; d —摄入人体的病原菌个数; $d = CV$; C —基因拷贝数; V —摄入污水量; N_{50} —感染50%暴露人群的病原菌个数; α —斜率参数。

2 结果与讨论

2.1 污水处理厂细菌群落多样性分析

本研究对我国北方某污水处理厂夏、冬两季各工艺段共计49个样本进行细菌16S rRNA基因测序,共得到2 209 071条优化序列,29 875个OTUs。为避免测序深度的差异对分析结果产生影响,保证数据之间的可比性,将每个样品按最小序列数进行抽平,平均长度为419 bp。

α 多样性是特定生态系统内的多样性,Chao指数和Shannon指数分别反映群落丰富度和群落多样性^[17]。由表2可知,样本覆盖率均在97%以上,表明其测序深度足够,结果可靠。夏季样本中,曝气池、二沉池和污泥中的Chao指数显著高于其他采样点,Shannon指数呈现同样趋势;而冬季样本间无显著差异,各采样位点间群落丰富度和多样性相似如图2所示。表明温度影响细菌多样性,夏季气温高,细菌生长繁殖加快,群落更迭随之增加;冬季低温条件下细菌群落结构更稳定。

2.2 污水处理厂细菌群落结构分析

污水处理厂门水平细菌群落结构如图3所示,45个菌门中Proteobacteria、弯曲杆菌门(Campilobacterota)、Bacteroidota、放线菌门(Actinobacteriota)、超门(Patescibacteria)、Firmicutes和蛭弧菌门(Bdellovibrionota)占主导(占比小于1%时划入其他类别)。与其他研究结果一致,多数活性污泥处理系统中,主要的微生物种群是Proteobacteria和Bacteroidota^[18-20]。Proteobacteria细菌主要参与反硝化作用且能够去除有机物^[21-23],Bacteroidota细菌主

表 2 样本 α 多样性
Tab. 2 Samples of α Diversity

采样季节	采样点	OTUs	Coverage	Chao	Shannon
夏季	原水(SA)	1 156	0.988 6	1 076.708 3	3.259 8
	曝气池水样(SB)	2 771	0.974 7	2 299.532 0	5.062 4
	二沉池水样(SC)	2 506	0.976 6	2 027.800 0	3.996 7
	超滤膜水样(SD)	1 994	0.980 1	1 700.009 9	3.671 4
	臭氧池水样(SE)	2 486	0.981 3	1 648.520 5	4.034 0
	紫外消毒池水样(SF)	1 778	0.983 5	1 414.835 4	3.190 6
	曝气池污泥(SG)	2 415	0.977 9	2 120.044 9	5.516 9
冬季	原水(WA)	1 087	0.988 1	1 087.332 9	3.574 2
	曝气池水样(WB)	2 275	0.977 5	2 077.843 7	5.223 7
	二沉池水样(WC)	2 518	0.973 8	2 330.113 9	5.247 5
	超滤膜水样(WD)	2 126	0.978 4	1 872.366 7	4.334 6
	臭氧池水样(WE)	2 429	0.973 9	2 266.290 7	4.721 4
	紫外消毒池水样(WF)	2 184	0.973 6	1 922.129 7	4.340 8
	曝气池污泥(WG)	2 150	0.978 7	2 080.771 6	5.553 0

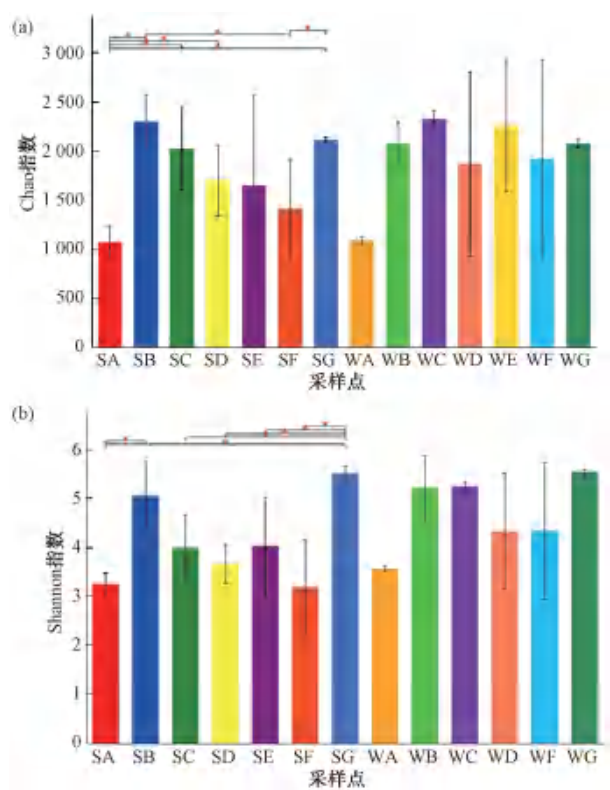


图 2 α 多样性指数组间差异检验

Fig. 2 α Diversity Index for Inter-Group Difference Test
要降解污水中的有机物。工艺组间差异显著性检验 (Kruskal-Wallis 秩和检验) 结果显示,不同采样点优势菌门相对丰度存在显著差异($p<0.05$)。原始污

水中主要是 *Campilobacterota*, 占比在 50% 以上, 其余样本点 *Proteobacteria* 占主导, 特别是在超滤膜和紫外消毒采样点占比达 70% 以上。夏、冬两季对比发现, 冬季 *Campilobacterota* ($p<0.05$) 和 *Firmicutes* ($p<0.05$) 相对丰度显著高于夏季, 而夏季 *Bdellovibrionota* ($p<0.05$) 相对丰度显著高于冬季。

在属水平上, 共检出 1 179 个菌属 (占比小于 1% 时化入其他类别), 前 20 个优势菌属群落结构如图 4 所示。主要的优势菌属有: 弓形杆菌属 (*Arcobacter*)、嗜甲基菌属 (*Methylophilus*)、假支杆菌属 (*Pseudarcobacter*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、分枝杆菌属 (*Mycobacterium*)、甲基娇养杆菌属 (*Methylostenora*)。 *Arcobacter*、*Pseudarcobacter*、*Mycobacterium* 和 *Methylostenora* 在不同季节、不同工艺段中的丰度存在极显著差异 ($p<0.001$); *Methylophilus*、*Acinetobacter* 和 *Pseudomonas* 的丰度存在显著差异 ($p<0.05$)。

2.3 潜在的病原细菌

及时识别污水处理厂中的潜在病原菌对保障再生水安全和从业者健康至关重要, 基于毒力因子数据 (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>)^[24-25] 整合国内外病原菌分类研究^[26-29], 从所得测序数据中筛选得到病原菌类群。各个采样点中病原菌存在情况如图 5 所示。结果显示, 污水处理厂中共检出 27 个含有病原体的属, 包括 *Arcobacter*、*Pseudomonas*、*Mycobacteri-*

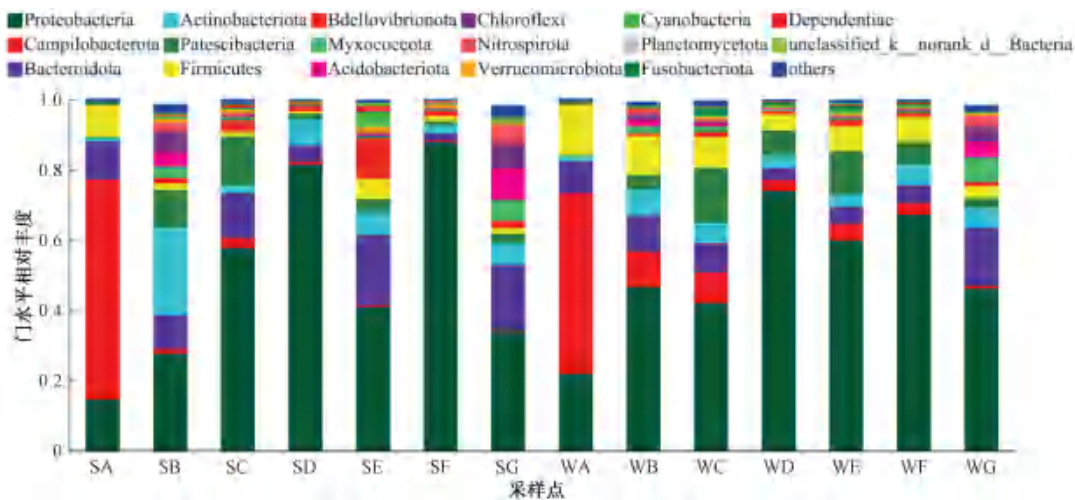


图 3 细菌门水平相对丰度直方图/热图

Fig. 3 Relative Abundance Histograms/Heatmaps at Bacterial Phylum Level

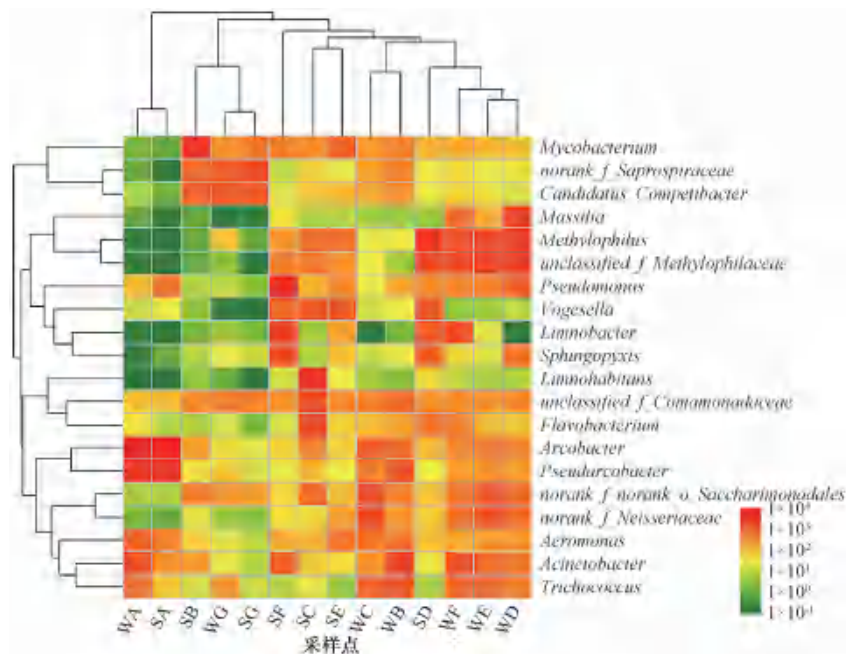


图 4 细菌属水平相对丰度直方图/热图

Fig. 4 Relative Abundance Histograms/Heatmaps at Bacterial Genus Level

um、Acinetobacter、气单胞菌属 (Aeromonas)、拟杆菌属 (Bacteroides)、Legionella、芽孢杆菌属 (Bacillus)、诺曼梭状芽孢杆菌属 (Cloacibacterium)、链球菌属 (Streptococcus)、肠杆菌属 (Enterobacter)、肠球菌属 (Enterococcus)、丹毒丝菌属 (Erysipelothrix)、柯克斯氏体属 (Coxiella)、梭杆菌属 (Fusobacterium)、钩端螺旋体属 (Leptospira)、沙雷氏菌属 (Serratia)、棒状杆菌属 (Corynebacterium)、奈瑟氏菌属 (Neisseria)、立克次氏体属 (Rickettsia)、鲍特菌属 (Bordetella)、耶尔森氏鼠疫杆菌属 (Yersinia)、嗜血杆菌属 (Haemophilus)、

弧菌属 (Vibrio)、葡萄球菌属 (Staphylococcus)、螺杆菌属 (Helicobacter) 和诺卡氏菌属 (Nocardia)。

不同季节比较结果可见,夏季丰度较高的病原菌主要是 Arcobacter、Pseudomonas、Mycobacterium;冬季丰度较高的病原菌主要是 Arcobacter、Acinetobacter 和 Aeromonas。Arcobacter 中的嗜低温弓形杆菌 (A. cryaerophilus)、布氏弓形杆菌 (A. butzleri)、斯氏弓形杆菌 (A. skirrowli) 感染可导致腹泻、菌血症等疾病。Pseudomonas 中的铜绿假单胞菌 (P. aeruginosa) 是重要的院内感染条件致病菌,感染可引发创

面感染。*Mycobacterium* 是一类革兰氏阳性细菌,包括 50 多种细菌,其中结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)、麻风分枝杆菌(*M. leprae*)和溃疡分枝杆菌(*M. ulcerans*)为环境致病菌,主要通过呼吸道传播。*Aeromonas* 在环境中无处不在,其中嗜中性气单胞菌(*A. hydrophila*)可感染人类,引发胃肠炎和伤口感染。Kruskal-Wallis 秩和检验结果显示,冬季样品中 *Acinetobacter* ($p=0.0003$)、*Aeromonas* ($p=0.0027$)、*Bacteroides* ($p=0.0003$)、*Enterococcus* ($p=0.0001$) 的相对丰度均显著高于夏季。

不同工艺段比较结果可见,进水中主要是 *Arcobacter*。曝气池中主要是 *Mycobacterium*、*Acinetobacter* 和 *Arcobacter*, *Acinetobacter* 中的鲍曼不动杆菌(*A. baumannii*)是一种新型条件致病菌,主要与医院获得性感染相关,可引发肺炎、菌血症、心内膜炎、皮肤和软组织感染、尿道感染和脑膜炎。二沉池中主要是 *Arcobacter*、*Aeromonas* 和 *Mycobacterium*。超滤膜处理出水后主要是 *Pseudomonas*、*Acinetobacter* 和 *Arcobacter*, *Pseudomonas* 中的 *P. aeruginosa* 是重要的院内感染条件致病菌,感染可引发创面感染。臭氧消毒池出水后,各含有病原菌属的占比相对均匀,主要是 *Mycobacterium*、*Aeromonas* 和 *Bacillus*。紫外消毒池出水中,主要是 *Pseudomonas* 和 *Acinetobacter*。污泥中主要是 *Mycobacterium* 和 *Arcobacter*。Kruskal-Wallis 组间差异检验结果显示,再生水中 *Mycobacterium* ($p=0.00001$)、*Arcobacter* ($p=0.00008$)、*Aero-*

monas ($p=0.0136$)、*Legionella* ($p=0.0001$)、*Streptococcus* ($p=0.0002$)、*Corynebacterium* ($p=0.00005$)、梭菌属($p=0.0035$)和 *Haemophilus* ($p=0.0001$) 相对丰度均显著低于原始污水,说明经过一系列的污水处理工艺,绝大多数病原菌得到有效去除。

但值得注意的是,再生水中仍存在一定数目的病原菌,主要是 *Pseudomonas* 和 *Acinetobacter*。*Pseudomonas* 包括 *P. aeruginosa*、荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)、鼻疽假单胞菌(*P. glanders*)和类鼻疽假单胞菌(*P. pseudomallei*) 4 种。其中 *P. aeruginosa* 是医院感染的主要病原之一,感染可引发创面感染、中耳炎、泌尿系统感染,但其属于条件致病菌,一般为继发性感染。*Acinetobacter* 包括醋酸钙不动杆菌(*A. calcoaceticus*)、鲁菲不动杆菌(*A. lwoffii*)、鲍曼不动杆菌(*A. baumannii*)、溶血不动杆菌(*A. haemolyticus*)、琼氏不动杆菌(*A. junii*)、约翰逊不动杆菌(*A. johnsonii*)和抗辐射不动杆菌 7 种。其中, *A. baumannii* 是一种条件致病菌,感染可引发肺炎、菌血症、心内膜炎、皮肤和软组织感染、尿道感染和脑膜炎。由此可见,随着污水处理工艺的一系列处理结合臭氧消毒和紫外消毒,污水中绝大多数病原细菌能得到有效去除/灭活,再生水中仅存在少量条件致病菌,条件致病菌一般属于继发性感染,正常人群极少感染。因此,经过污水处理厂一系列工艺处理结合臭氧、紫外消毒工艺,能对原始污水中的病原菌有较好的去除效果。

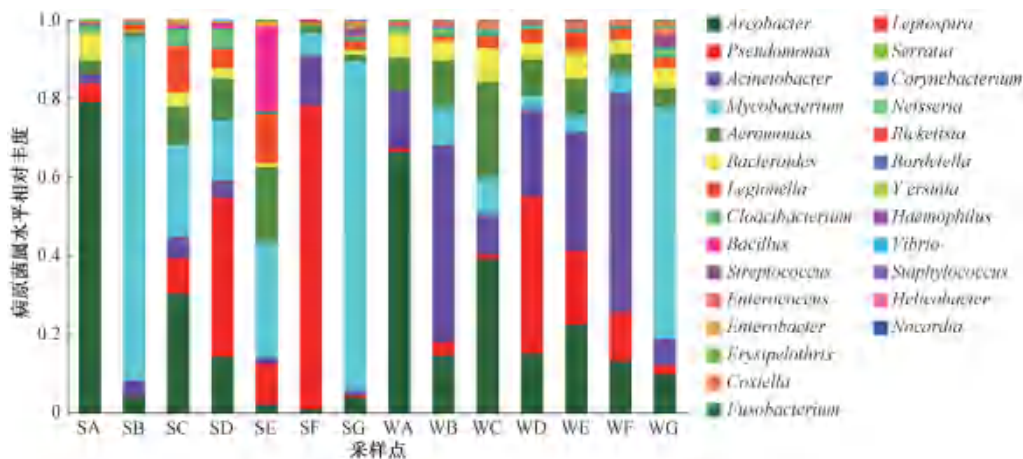


图5 病原菌属水平多样性和相对丰度

Fig. 5 Pathogenic Bacterial Diversity and Relative Abundance at Genus Level

2.4 典型病原菌的定量检测及风险评价

2.4.1 嗜肺军团菌和大肠杆菌定量检测

对污水处理厂中的典型病原菌大肠杆菌和嗜肺

军团菌进行定量检测(图6),发现在本研究 49 个样本中,大肠杆菌和嗜肺军团菌检出率均为 100%且不存在明显的季节差异。大肠杆菌整体浓度要高于

嗜肺军团菌,在进水和污泥中超过 $8 \lg$ copies/L,嗜肺军团菌为 $6 \lg$ copies/L。经过生物池、超滤膜和臭氧、紫外消毒后,出水中得到有效降低;嗜肺军团菌较进水降低 $2.5 \lg$ copies/L,大肠杆菌降低近 $4 \lg$ copies/L,可见污水处理工艺对大肠杆菌有良好的去除效果。在污水处理厂中,嗜肺军团菌和大肠杆菌均在生物池处理后得到有效降低,而臭氧和紫外消毒前后无显著差异。这可能是由于基于 PCR 扩增的分子检测手段检测的片段只是病原菌核酸的一部分,易造成假阳性结果,高估其真实含量;还需结合培养等手段进一步明晰其在污水处理厂中的存在情况。污水处理厂曝气池污泥中嗜肺军团菌含量较进水高,这是由于污泥中的细菌群落结构多样性更丰富,有机物含量丰富;此外,污泥中大量存在的蓝藻^[30]、细菌^[31]和阿米巴虫等原生动物^[32-33]能作为宿主促进其生长繁殖。

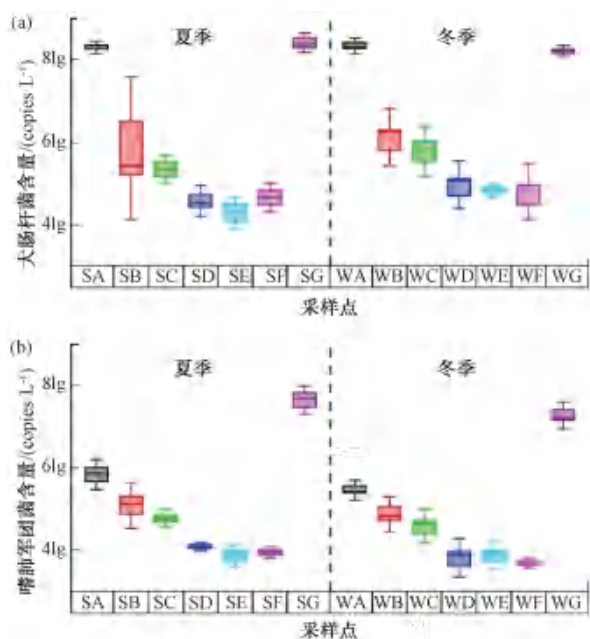


图6 污水处理厂嗜肺军团菌/大肠杆菌含量变化

Fig. 6 Quantity Changes of *Legionella pneumophila*/
Escherichia coli in WWTP

2.4.2 嗜肺军团菌和大肠杆菌风险评估

对污水处理厂中嗜肺军团菌和大肠杆菌进行健康风险评估(图7),发现尽管大肠杆菌的检出浓度要高于嗜肺军团菌,但嗜肺军团菌的患病风险要远高于大肠杆菌。如按意外摄入 1 mL/d 污水计算,进水、曝气池和二沉池中嗜肺军团菌的感染概率都接近 1,不过鉴于本研究的病原菌定量是基于核酸

片段而非活性的病原菌,实际感染风险应该有高估;超滤膜、臭氧消毒池和紫外消毒池处理后,其风险显著降低,在 0.4 左右。对于大肠杆菌,整体健康风险都较低,在进水和污泥中风险为 0.5,其他工艺段中健康风险都低至可忽略不计。这些结果表明,大肠杆菌作为出水监测指标不能反映其他病原菌的风险水平,需要引入更加严格的病原菌监测指标以保证再生水回用安全;对于污水处理厂内部的从业者而言,其面临的患病风险较高,需要佩戴口罩、手套、面罩、防护服等护具,减少喷溅污水从口鼻摄入的可能,以减少职业病风险。

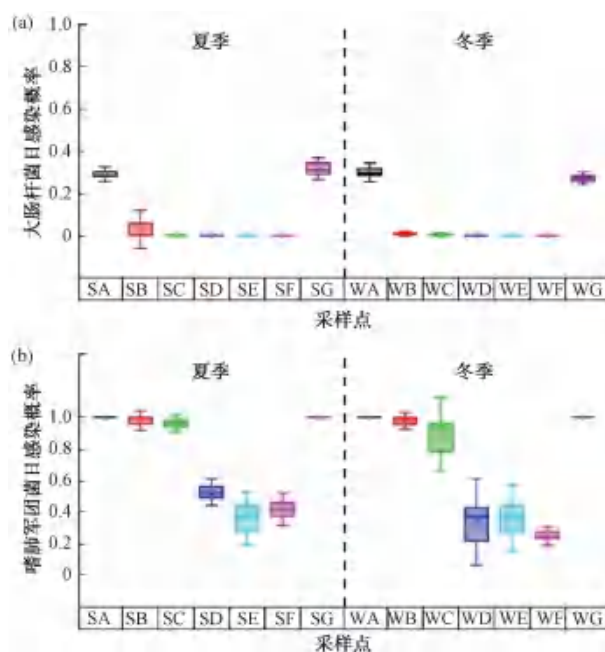


图7 污水处理厂嗜肺军团菌/大肠杆菌风险评价

Fig. 7 Risk Assessment of *Legionella pneumophila*/
Escherichia coli in WWTP

3 结论

本研究通过 16S rRNA 测序方法系统调查了城市污水处理厂中细菌群落在时间(夏季和冬季)和空间(不同工艺段)上的动态变化、病原菌的去除效果及典型病原菌健康风险。结果表明,污水处理厂中检测到 45 个菌门,主要是与污水处理相关的功能菌,包括 Proteobacteria、Campilobacterota 和 Bacteroidota。在 1 180 个菌属中,共发现 27 个潜在病原菌属,主要包括 *Arcobacter*、*Pseudomonas*、*Mycobacterium*、*Acinetobacter*、*Aeromonas* 和 *Legionella*。经过一系列处理,包括指示菌在内的多数潜在致病菌得到有效去除;出水中病原菌含量较进水显著降低,健康风

险也达到较低水平。值得注意的是,结果表明常规出水检测指标大肠杆菌难以反映非粪源性病原菌(如嗜肺军团菌)的存在情况和风险等级。

参考文献

- [1] JU F, GUO F, YE L, et al. Metagenomic analysis on seasonal microbial variations of activated sludge from a full-scale wastewater treatment plant over 4 years [J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2014, 6(1): 80–89.
- [2] NIELSEN P H, SAUNDERS A M, HANSEN A A, et al. Microbial communities involved in enhanced biological phosphorus removal from wastewater — A model system in environmental biotechnology [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2012, 23(3): 452–459.
- [3] OKOH A I, ODJADJARE E E, IGBINOSA E O, et al. Wastewater treatment plants as a source of microbial pathogens in receiving watersheds [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2007, 6(25): 2932–2944.
- [4] OTTOSON J, HANSEN A, WESTRELL T, et al. Removal of noro- and enteroviruses, *Giardia* cysts, *Cryptosporidium* oocysts, and fecal indicators at four secondary wastewater treatment plants in Sweden [J]. *Water Environment Research*, 2006, 78(8): 828–834.
- [5] VARELA A R, MANAIA C M. Human health implications of clinically relevant bacteria in wastewater habitats [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2013, 20(6): 3550–3569.
- [6] BOTES M, KWAADSTENIET M D, CLOETE T E. Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013, 405(1): 91–108.
- [7] LESNIK R, BRETTAR I, HOEFLE M G. *Legionella* species diversity and dynamics from surface reservoir to tap water: From cold adaptation to thermophily [J]. *Isme Journal*, 2016, 10(5): 1064–1080.
- [8] WERY N, LHOUTELLIER C, DUCRAY F, et al. Behaviour of pathogenic and indicator bacteria during urban wastewater treatment and sludge composting, as revealed by quantitative PCR [J]. *Water Research*, 2008, 42(1/2): 53–62. DOI: 10.1016/j.watres.2007.06.048.
- [9] PRUSS A, KAY D, FEWTRELL L, et al. Estimating the burden of disease from water, sanitation, and hygiene at a global level [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2002, 110(5): 537–542.
- [10] FANG D, ZHAO G, XU X, et al. Microbial community structures and functions of wastewater treatment systems in plateau and cold regions [J]. *Bioresource Technology*, 2018, 249: 684–693. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.10.063.
- [11] DONOHUE M J, O'CONNELL K, VESPER S J, et al. Widespread molecular detection of *Legionella pneumophila* Serogroup 1 in cold water taps across the United States [J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(6): 3145–3152.
- [12] MAHEUX A F, PICARD F J, BOISSINOT M, et al. Analytical comparison of nine PCR primer sets designed to detect the presence of *Escherichia coli/Shigella* in water samples [J]. *Water Research*, 2009, 43(12): 3019–3028.
- [13] HAAS C N, ROSE J B, GERBA C, et al. Risk assessment of virus in drinking water [J]. *Risk Analysis*, 1993, 13(5): 545–52.
- [14] SEMERJIAN L, SHANABLEH A, SEMREEN M H, et al. Human health risk assessment of pharmaceuticals in treated wastewater reused for non-potable applications in Sharjah, United Arab Emirates [J]. *Environment International*, 2018, 121: 325–331. DOI: 10.1016/j.envint.2018.08.048.
- [15] CHEN M, SHI L, LIU G, et al. Aerosol exposure assessment during reclaimed water utilization in China and risk evaluation in case of *Legionella* [J]. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 2022, 16(7): 95. DOI: 10.1007/s11783-021-1516-1.
- [16] AMOAH I D, KUMARI S, BUX F. A probabilistic assessment of microbial infection risks due to occupational exposure to wastewater in a conventional activated sludge wastewater treatment plant [J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 843: 156849. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.156849.
- [17] CURTIS T P, SLOAN W T, SCANNELL J W. Estimating prokaryotic diversity and its limits [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(16): 10494–10499.
- [18] HAN I, YOO K. Metagenomic profiles of antibiotic resistance genes in activated sludge, dewatered sludge and bioaerosols [J]. *Water*, 2020, 12(6): 1516. DOI: 10.3390/w12061516.
- [19] XIA Y, WEN X, ZHANG B, et al. Diversity and assembly patterns of activated sludge microbial communities: A review [J]. *Biotechnology Advances*, 2018, 36(4): 1038–1047.
- [20] GAO P, XU W, SONTAG P, et al. Correlating microbial community compositions with environmental factors in activated sludge from four full-scale municipal wastewater treatment plants in Shanghai, China [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(10): 4663–4673.
- [21] WANG Z, ZHANG X X, LU X, et al. Abundance and diversity of bacterial nitrifiers and denitrifiers and their functional genes in tannery wastewater treatment plants revealed by high-throughput sequencing [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): 101–123.
- [22] CYDZIK K A, ZIELINSKA M. Bacterial communities in full-scale wastewater treatment systems [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2016, 32(4): 66. DOI: 10.1007/s11274-016-2012-9.

- [23] CHEN H J, LIN Y Z, FANJIANG J M, et al. Microbial community and treatment ability investigation in AOA process for the optoelectronic wastewater treatment using PCR-DGGE biotechnology[J]. *Biodegradation*, 2013, 24(2): 227–243.
- [24] FANG H, WANG H, CAI L, et al. Prevalence of antibiotic resistance genes and bacterial pathogens in long-term manured greenhouse soils as revealed by metagenomic survey [J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(2): 1095–1104.
- [25] CHEN L, XIONG Z, SUN L, et al. VFDB 2012 update: Toward the genetic diversity and molecular evolution of bacterial virulence factors[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(D1): D641–D645. DOI: 10.1093/anar/gkr989.
- [26] QU A, BRULC J M, WILSON M K, et al. Comparative metagenomics reveals host specific metavirolomes and horizontal gene transfer elements in the chicken cecum microbiome[J]. *PLoS One*, 2008, 3(8): e2945. DOI: 10.1371/journal.pone.0002945.
- [27] OAKLEY B B, MORALES C A, LINE J, et al. The poultry-associated microbiome: Network analysis and farm-to-fork characterizations[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57190. DOI: 10.1371/journal.pone.0057190.
- [28] OSUNMAKINDE C O, SELVARAJAN R, MAMBA B B, et al. Profiling bacterial diversity and potential pathogens in wastewater treatment plants using high-throughput sequencing analysis[J]. *Microorganisms*, 2019, 7(11): 506. DOI: 10.3390/microorganisms7110506.
- [29] XUE J, SCHMITZ B W, CATON K, et al. Assessing the spatial and temporal variability of bacterial communities in two Bardenpho wastewater treatment systems via Illumina MiSeq sequencing[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 657: 1543–1552. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.12.141.
- [30] TISON D L, POPE D H, CHERRY W B, et al. Growth of legionella pneumophila in association with blue-green-algae (*Cyanobacteria*) [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1980, 39(2): 456–459.
- [31] STATES S J, CONLEY L F, KUCHTA J M, et al. Survival and multiplication of *legionella-pneumophila* in municipal drinking-water systems [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, 53(5): 979–986.
- [32] GARCIA A, GONI P, CLAVEL A, et al. Potentially pathogenic free-living amoebae (FLA) isolated in Spanish wastewater treatment plants [J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2011, 3(5): 622–626.
- [33] PRICE C T D, RICHARDS A M, VON D J E, et al. Amoeba host-Legionella synchronization of amino acid auxotrophy and its role in bacterial adaptation and pathogenic evolution [J]. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(2): 350–358.
- (上接第 56 页)
- [53] DAI H, ZHAO J, WANG Z, et al. Optimal control of sewage treatment process using a dynamic multi-objective particle swarm optimization based on crowding distance [J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2023, 11(2): 109484.
- [54] KIM M, YOO C. Multi-objective controller for enhancing nutrient removal and biogas production in wastewater treatment plants [J]. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2014, 45(5): 2537–2548.
- [55] 李晨修. 基于智能算法的污水厂碳源投加系统研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2023.
- LI C X. Research on carbon source addition system in wastewater treatment plant based on intelligent algorithms [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2023.
- [56] WU X, ZHENG Z, WANG L, et al. Coupling process-based modeling with machine learning for long-term simulation of wastewater treatment plant operations [J]. *Journal of Environmental Management*, 2023, 341: 118116. DOI: 10.1016/j.jenvman.2023.118116.
- [57] YANG Y H, GUERGACHI A, KHAN G. Support vector machines for environmental informatics: Application to modelling the nitrogen removal processes in wastewater treatment systems [J]. *Journal of Environmental Informatics*, 2006, 7(1): 14–23.
- [58] FERNANDEZ DE CANETE J, DEL SAZ-OROZCO P, GÓMEZ-DE-GABRIEL J, et al. Control and soft sensing strategies for a wastewater treatment plant using a neuro-genetic approach[J]. *Computers & Chemical Engineering*, 2021, 144: 107146. DOI: 10.1016/j.compchemeng.2020.107146.
- [59] FERNANDEZ D C J, DEL S P, BARATTI R, et al. Soft-sensing estimation of plant effluent concentrations in a biological wastewater treatment plant using an optimal neural network[J]. *Expert Systems with Applications*, 2016, 63: 8–19. DOI: 10.1016/j.eswa.2016.06.028.
- [60] CARAMAN S, LUCA L, VASILIEV I, et al. Optimal-setpoint-based control strategy of a wastewater treatment process [J]. *Processes*, 2020, 8(10): 1203.