

# 鲜萃花椒油加工废水中降污菌株的筛选及鉴定

苏亚男<sup>1</sup> 秦礼康<sup>1</sup> 陈梦苹<sup>1</sup> 吴起凤<sup>1</sup> 闵芳卿<sup>2</sup>

(1. 贵州大学酿酒与食品工程学院, 贵州 贵阳 550025;

2. 贞丰县顶罐椒业有限公司, 贵州 黔西南布依族苗族自治州 562200)

**摘要:** [目的] 分离筛选出具有去除抑菌性废水中化学需氧量(COD)和氨氮能力的优良菌株。[方法] 利用宏基因组测序技术, 深入挖掘鲜萃花椒油分离废水中微生物资源, 精准解析可高效去除 COD 和氨氮的菌株, 并从在室外自然培养富集 1 个月的废水中筛选出具有降污能力的菌株。[结果] 鲜萃花椒油分离废水中主要菌门为变形杆菌门和厚壁菌门, 主要菌属为肠杆菌属和醋杆菌属; 优选出 3 株可去除 COD 和氨氮的细菌, 经鉴定为枯草芽孢杆菌堆肥亚种 X4 (*Bacillus stercoris* X4)、恶臭假单胞菌 X21 (*Pseudomonas putida* X21) 和台湾假单胞菌 X22 (*Pseudomonas taiwanensis* X22); 在实际废水处理中, 3 株菌株 8 d 内的 COD 去除率分别为 55.47%, 50.76%, 52.32%, 36 h 内的氨氮去除率分别为 55.93%, 54.19%, 40.79%。[结论] 花椒油废水中适生富集筛选出的菌株比其他来源的降污菌株具有更强的降污能力。

**关键词:** 鲜萃; 花椒油; 抑菌性废水; 降污菌株; 化学需氧量去除率; 氨氮去除率

## Screening and identification of pollution-reducing strains in wastewater processed by freshly-extracted *Zanthoxylum* oil

SU Yanan<sup>1</sup> QIN Likang<sup>1</sup> CHEN Mengping<sup>1</sup> WU Qifeng<sup>1</sup> MIN Fangqing<sup>2</sup>

(1. College of Liquor and Food Engineering, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China; 2. Zhenfeng Dingtan Pepper Industry Co., Ltd., Qianxinan Buyei and Miao Autonomous Prefecture, Guizhou 562200, China)

**Abstract:** [Objective] To isolate and identify highly effective strains capable of removing chemical oxygen demand (COD) and ammonia nitrogen from antibacterial wastewater. [Methods] Metagenomic sequencing technology is employed to deeply explore the microbial resources in wastewater isolated by freshly-extracted *Zanthoxylum* oil. The strains with the ability to efficiently remove COD and ammonia nitrogen are accurately analyzed. The strains with pollution-reducing potential are screened from wastewater enriched through natural outdoor cultivation for one month. [Results] *Proteobacteria* and *Firmicutes* are the predominant phyla in the wastewater isolated by freshly-extracted *Zanthoxylum* oil, while *Enterobacter* and *Acetobacter* are the dominant genera. Three strains with significant COD and ammonia nitrogen removal capabilities are selected and identified as *Bacillus stercoris* strain X4, *Pseudomonas putida* X21, and *Pseudomonas taiwanensis* X22. In actual wastewater treatment, the COD removal rate of these three strains after 8 days is 55.47%, 50.76%, and 52.32%, respectively, while the ammonia nitrogen removal rate after 36 hours is 55.93%, 54.19%, and 40.79%, respectively. [Conclusion] The strains identified through indigenous enrichment in *Zanthoxylum* oil wastewater are more effective in reducing pollution than those from other sources.

**Keywords:** freshly-extracted; *Zanthoxylum* oil; antibacterial wastewater; pollution-reducing strains; COD removal rate; ammonia-nitrogen removal rate

未经处理食品加工废水中通常含有大量有机物, 学需氧量(COD)含量较高时, 大量微生物会消耗水中溶氧, 导致严重的环境污染。当水中生化需氧量(BOD)和化 解氧, 导致水体缺氧, 影响水生生物生存<sup>[1]</sup>, 进而腐蚀周边

基金项目: 国家重点研发计划子课题(编号: 2022YFD1100305)

通信作者: 秦礼康(1965—), 男, 贵州大学教授, 博士生导师。E-mail: lkqin@gzu.edu.cn

收稿日期: 2025-01-17 改回日期: 2025-03-27

引用格式: 苏亚男, 秦礼康, 陈梦苹, 等. 鲜萃花椒油加工废水中降污菌株的筛选及鉴定[J]. 食品与机械, 2025, 41(4): 19-26.

Citation: SU Yanan, QIN Likang, CHEN Mengping, et al. Screening and identification of pollution-reducing strains in wastewater processed by freshly-extracted *Zanthoxylum* oil[J]. Food & Machinery, 2025, 41(4): 19-26.

植被,破坏周围土壤<sup>[2]</sup>。同时,食品加工废水中氮含量过高也会破坏水体生态平衡。目前,常见的食品加工废水处理有物理、化学、生物、膜分离技术以及新型水处理技术等<sup>[3]</sup>。生物处理法是最常见的污水处理法,不仅成本低,处理效率高,且处理过程绿色环保,不会产生有毒有害副产物,符合可持续发展的要求。Wu 等<sup>[4]</sup>筛选了一株巴基斯坦赖氨酸芽孢杆菌,当废水中 COD 质量浓度为 800 mg/L 时,96 h 内的 COD 去除率可达 81.90%;袁野等<sup>[5]</sup>筛选了一株戈登氏菌,当豆制品废水中氨氮质量浓度为 104.22 mg/L 时,36 h 内的氨氮去除率可达 96.22%。

花椒(*Zanthoxylum* genus),作为中国八大香辛料之一<sup>[6]</sup>,不仅具有丰富的香气特征和独特的辛辣麻感,还含有具有抑菌作用的黄酮、挥发油和生物碱类<sup>[7]</sup>等多种活性物质。花椒油,作为花椒传统加工产品,主要是以干花椒为原料,通过超临界 CO<sub>2</sub> 萃取法和植物油浸提法等工艺制备的调味油<sup>[8]</sup>,但萃取法成本较高,而浸提法香气损失大、苦味重。近年来,为提升花椒油风味品质,创新集成了一种成本低、操作简单的鲜萃花椒油分离法,其工艺流程如图 1 所示。但该加工过程中汁水分离工序会产生大量废水,废水污染物浓度高(COD 质量浓度为 10 222.00 mg/L,氨氮质量浓度为 176.21 mg/L,总磷质量浓度为 76.04 mg/L),且具有抑菌作用,还会抑制常见的废水处理菌株的生长繁殖,使其不能发挥降污能力。研究拟利用宏基因组测

序技术,深入挖掘鲜萃花椒油分离废水中微生物资源,精准解析可高效去除 COD 和氨氮的菌株,并从中分离筛选出具有降污能力的优势菌株,以期对抑菌性废水处理提供新的菌源。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 菌株、样品来源及试剂

金黄色葡萄球菌:*Staphylococcus aureus* 186335,贵州大学药学院;

*Acinetobacter johnsonii* ENJ1、*Pseudomonas fragi* EH-H1、*Pseudomonas poae* EH-H3、*Acinetobacter guillouiae* BY18:贵州大学生命科学学院;

废水样品:采自贵州省贞丰县顶罐椒业有限公司,取回后于 -80 °C 冰箱贮藏备用;

LB 固体培养基、LB 液体培养基、琼脂粉:上海博微生物科技有限公司;

无水乙酸钠、硫酸亚铁、硫酸镁、过硫酸钾:分析纯,成都金山化学试剂有限公司;

氯化铵、氯化钙、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾:分析纯,上海易恩化学技术有限公司;

纳氏试剂、钼酸铵、抗坏血酸、酒石酸钾钠、番红、结晶紫:分析纯,上海麦克林生化科技股份有限公司。

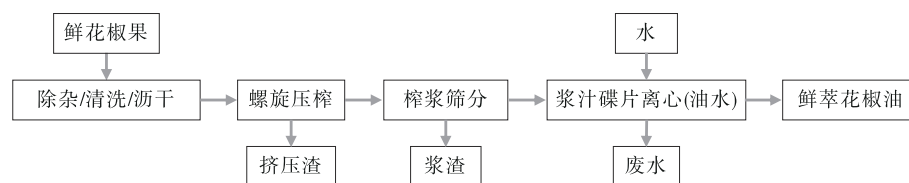


图 1 鲜萃花椒油分离废水工艺流程图

Figure 1 Process of wastewater isolated from freshly-extracted *Zanthoxylum* oil

#### 1.1.2 仪器与设备

生化培养箱:SPX-150B III 型,天津市泰斯特仪器有限公司;

震荡摇床:ZWY-C2112B 型,上海智城分析仪器制造有限公司;

双人净化工作台:SW-CJ-2D 型,浙江苏净净化设备有限公司;

紫外可见分光光度计:L5S 型,上海仪电分析仪器有限公司;

紫外酶标仪:1550-802480 DMEX20 型,赛默飞世尔科技有限公司;

光学显微镜:DMEX20 型,宁波舜宇仪器有限公司;

冷冻干燥机:SCIENTZ-18N 型,宁波新芝生物科技股份有限公司;

台式显微镜电镜:TM3030 型,日立高新技术公司。

### 1.2 宏基因组测序

1.2.1 测序对象 将一部分废水样品充分混匀后立即通过 0.22 μm 水系滤膜进行抽滤,抽滤约 150 mL 水样,均分装入 3 支已灭菌的 50 mL 离心管中,标记为样品 A-1、A-2、A-3;另一部分样品混匀后装入 2 L 已灭菌烧杯,于室外自然培养富集 1 个月后充分混匀,抽滤,获得样品 B-1、B-2、B-3。两组样品均低温保存送至北京奥维森科技有限公司进行宏基因组测序分析。

#### 1.2.2 宏基因组生物信息学分析

(1) 数据质控:去除含有接头的 Reads、低质量 Reads (去除 N 比例 > 10% 的 Reads;去除质量值  $Q \leq 10$  碱基数占整条 Read 50% 以上的 Reads),得到高质量有效数据 (Clean Data)。

(2) 基因组组装:合并所有样本 Reads,使用拼接软件 MEGAHIT<sup>[9-10]</sup> 拼接组装,根据 Kmer 重叠 (overlap) 关

系,构建 De-Bruijn graph,获得 Contigs,筛选 500 bp 以上 Contigs 进行统计。

(3) 基因预测:使用 Prodigal<sup>[11]</sup> 软件对拼接的 Contigs 序列进行 ORF 预测,将其翻译为氨基酸序列,计算得到各基因在各样品中的丰度信息。

(4) 物种水平分析:使用 genes 与各功能数据库比对,DIAMOND<sup>[12]</sup> 软件将 Unigenes 与从 NCBI 的 NR (Version: 2021.11) 数据库中抽提出的细菌、真菌、古菌和病毒序列比对,选取  $Evalue \leq \text{最小 } Evalue * 10$  的比对结果进行后续分析。

### 1.3 降污菌株筛选及抑菌圈测定

#### 1.3.1 培养基

(1) LB 培养基:酵母提取物 5 g/L,蛋白胨 10 g/L, NaCl 10 g/L。

(2) 模拟废水培养基:  $\text{CH}_3\text{COONa}$  13.21 g/L,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.65 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.07 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.17 g/L,  $\text{CaCl}_2$  0.01 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.04 g/L,  $\text{FeSO}_4$  0.01 g/L, pH 8.53。

(4) 实际废水培养基:鲜萃花椒油加工中分离的抑菌性废水过滤后待用, pH 6.21。

以上 3 种培养基的固体培养基中需加入 20 g/L 琼脂粉,所有培养基均于 121 °C 高压灭菌 20 min 后备用。

1.3.2 降污菌株的分离筛选 将 A、B 两组样品混匀后各取 1 mL 于 9 mL 无菌水中,依次梯度稀释后取 100  $\mu\text{L}$   $10^{-4}$ ~ $10^{-6}$  菌悬液,用涂布棒接种于固体模拟废水培养基中,25 °C 恒温培养 3~5 d,筛选符合要求的菌落,并通过 3 次平板划线分离以得到纯种菌落。将纯种菌落接入液体 LB 培养基中,培养 24 h 后转移至甘油管,于 -80 °C 下低温保存。

将分离所得菌株接种于液体 LB 培养基中,25 °C、180 r/min 活化培养 24 h,转接于新的 LB 液体培养基中,扩大培养 32 h。将菌液用无菌水洗涤,离心悬浮后接入液体模拟废水培养基中,以不接菌的模拟废水培养基为对照,每组设置 3 个平行,25 °C、180 r/min 下振荡培养 8 d。每隔 24 h 测定 COD 含量、氨氮含量、总磷含量、pH 和菌体细胞密度 ( $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ ),以 COD 和氨氮去除率为主要指标,筛选降污能力较强的菌株。

1.3.3 抑菌圈的测定 在无菌环境下,将金黄色葡萄球

菌、*Acinetobacter johnsonii* ENJ1、*Pseudomonas fragi* EH-H1、*Pseudomonas poae* EH-H3 和 *Acinetobacter guillouiae* BY18 接种到 LB 液体培养基中,分别在其最佳生长条件下活化 3 次后备用。用镊子将已灭菌的牛津杯 (直径 8 mm) 放入无菌培养皿中,倒入 100  $\mu\text{L}$  菌液 ( $10^8$  CFU/mL<sup>[13]</sup>) 与 20 mL 高压灭菌后的 LB 固体培养基 (冷却至 45 °C 左右) 混合物,待培养基完全凝固后取出牛津杯,往孔中加入 100  $\mu\text{L}$  鲜萃花椒油加工中分离的抑菌性废水,以无菌生理盐水为对照,每组 3 个平板,最佳条件下培养 24 h 后采用十字交叉法测其抑菌圈直径大小,取平均值<sup>[14]</sup>。

1.3.4 优选菌株在实际废水中的降污效果测定 将筛选出的菌株活化后接种于鲜萃花椒油加工中分离的抑菌性废水培养基,以不接菌的实际废水培养基为对照,在 1.3.2 条件下测定相关指标。

### 1.4 菌株鉴定

1.4.1 菌株的初步鉴定 对具备较高降污能力的菌株进行菌落形态观察和革兰氏染色,光学显微镜下观察染色结果,同时利用扫描电子显微镜对菌株形态进行观察。

1.4.2 菌株的 16S rDNA 鉴定 采用常规细菌总 DNA 提取法,以基因组 DNA 为模板扩增 16S rDNA,扩增采用通用引物 27F: 5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3' 和 1492R: 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'。PCR 扩增采用 25  $\mu\text{L}$  反应体系,升温程序: 94 °C, 3 min; 94 °C, 45 s; 58 °C, 45 s; 72 °C, 2 min; 循环 30 次; 72 °C 10 min, 4 °C 贮藏。测序由科学指南针公司完成,测序结果采用 DNA MAN 软件拼接处理。

### 1.5 数据处理

所以试验均重复 3 次,结果以平均值  $\pm$  标准差表示;采用 Excel 2022 和 Origin 2024 软件进行数据分析和作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 宏基因组测序

2.1.1 鲜萃花椒油分离废水宏基因组测序 在 Illumina 测序平台上对样品 A-1、A-2、A-3 和 B-1、B-2、B-3 进行宏基因组测序,根据下机数据对 6 个样本组原始数据进行质控 (见表 1),得到最终有效 Reads 数据范围为 38 051 666~

表 1 测序数据统计表  
Table 1 Sequencing data statistics

| 样品  | 总 Read 数   | 有效 Read 数  | 有效 Read/% | 总碱基数          | GC/%  | Q20/% | Q30/% |
|-----|------------|------------|-----------|---------------|-------|-------|-------|
| A-1 | 43 008 982 | 41 483 372 | 96.45     | 6 198 615 161 | 49.43 | 97.77 | 93.73 |
| A-2 | 38 302 292 | 38 051 666 | 99.35     | 5 704 709 921 | 52.67 | 98.03 | 94.25 |
| A-3 | 44 292 126 | 44 033 220 | 99.42     | 6 598 080 119 | 52.99 | 98.27 | 94.72 |
| B-1 | 45 343 032 | 44 974 134 | 99.19     | 6 725 830 879 | 51.46 | 97.71 | 93.58 |
| B-2 | 40 268 598 | 39 951 670 | 99.21     | 5 955 118 804 | 51.12 | 97.75 | 93.66 |
| B-3 | 39 193 952 | 38 970 612 | 99.43     | 5 824 156 334 | 51.29 | 97.93 | 94.07 |

44 974 134。Q20 值均在 97% 以上, Q30 值均在 93% 以上, GC 含量均在 49% 以上, 说明基因组测序结果较好, 且基因组组装具有较高的完整性和质量。

**2.1.2 门分类水平上物种丰度分析** 由图 2 可知, A 组样品中共检测到 30 个门类, 包含 21 个细菌门类、5 个病毒门类、3 个古细菌门类和 1 个真菌门类; B 组样品中共检测到 16 个门类, 包含 10 个细菌门类、3 个病毒门类、2 个古细菌门类和 1 个真菌门类。A 组样品细菌共 1 230 种, 病毒 168 种, 古细菌 4 种, 真菌 3 种; B 组样品细菌共 660 种, 病毒 98 种, 古细菌 2 种, 真菌 9 种。A 组样品门类比 B 组多 46.67%, 可能是因为 A 组样品为鲜萃花椒油榨浆分离后立即采集的废水, 保留了鲜花椒果皮上的大量微生物, B 组样品为 A 组样品采后在室外自然培养富集 1 个月所得, 此时的废水因具有花椒的抑菌作用, 大部分微生物不能生长繁殖, 只有部分具有抗菌性能的菌株能继续生长。

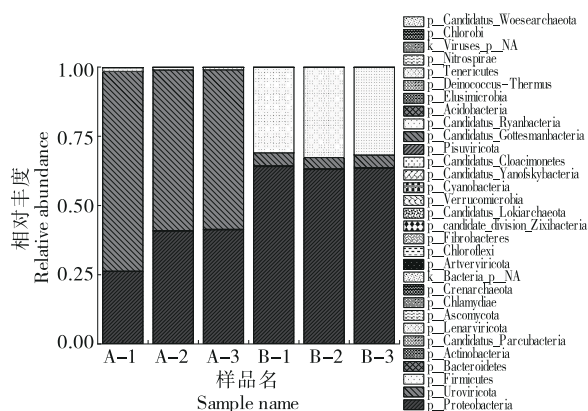


图 2 门分类水平上物种丰度分析

Figure 2 Analysis of species abundance at the phylum classification level

两组样品均包含 3 个相同优势门类(相对丰度 > 1%), 分别为尾噬菌门(Uroviricota)、变形杆菌门(Proteobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes)。这 3 个菌门在 A 组样品中丰度分别为 57.64%~72.15%, 26.30%~41.41%, 0.91%~1.32%; 在 B 组样品中分别为 4.06%~4.75%, 63.26%~64.33%, 30.91%~32.67%。B 组样品中的尾噬菌门丰度较 A 组样品大幅降低, 但变形杆菌门和厚壁菌门的丰度大幅升高, 印证了变形杆菌门和厚壁菌门在食品加工废水处理中较为常见的现象<sup>[15]</sup>。Hu 等<sup>[16]</sup>在某肉类加工厂废水处理研究中, 以变形杆菌门和厚壁菌门为主要微生物处理门类对该废水进行生物处理时, 废水中的 COD、总氮和总磷分别降解了 60%, 80%, 80%。赵婷婷等<sup>[17]</sup>在某淀粉废水处理厂活性污泥中检测到变形杆菌门和厚壁菌门的存在, 且变形杆菌门是其中最大的优势细菌门, 丰度为 45.66%~66.30%。Li 等<sup>[18]</sup>在处理高浓度大蒜加工废水 UASB-SBR 系统中, 检测到  $\beta$ -变形菌门和  $\alpha$ -变形菌

门在污泥中的丰度分别为 30.05%, 47.57%, 且变形杆菌门在该大蒜加工废水中对有机物、氮和磷的去除发挥着重要作用。综上, 变形杆菌门和厚壁菌门在食品加工废水中对 COD 和氨氮的去除有着重要的影响。目前, 有关尾噬菌门在食品加工废水中的研究尚未见报道, 但其具有对抗病原菌的作用<sup>[19]</sup>, 可能是其在食品加工废水中对某些病原菌具有抑制作用, 从而达到对废水降污的效果。

**2.1.3 属分类水平上物种丰度分析** 由图 3 可知, A、B 组样品中分别检测到 503, 304 个属, 其中有 221 个属仅在 A 组样品中存在, 22 个属仅在 B 组样品中存在, 大部分来自鲜花椒果皮上的微生物因不能适应废水环境而不能在 B 组样品中生长繁殖, 所以 B 组样品中检测到的菌属远少于 A 组样品。

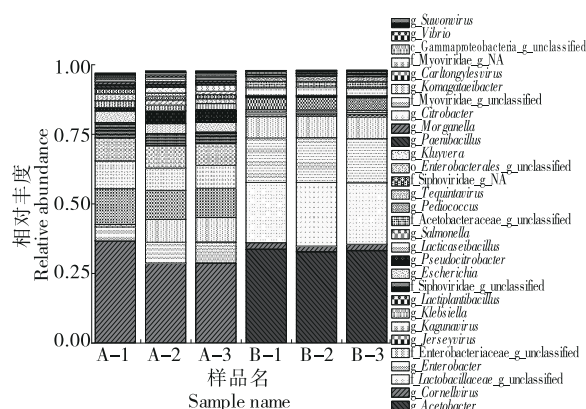


图 3 属分类水平上物种丰度分析

Figure 3 Analysis of species abundance at the genus classification level

两组样品中共包含 20 个优势属(相对丰度 > 1%)。其中, A 组样品有 2 个属丰度超过 10%, 分别为康奈尔病毒(Cornellvirus)和泽西噬菌体(Jersevirus), 丰度分别为 28.72%~36.73% 和 10.42%~12.88%。B 组样品有 3 个属丰度超过 10%, 分别为醋杆菌属(Acetobacter)、乳杆菌科中未分类的属(Lactobacillaceae-g-unclassified)和肠杆菌属(Enterobacter), 丰度分别为 32.87%~33.74%, 21.65%~22.88% 和 15.83%~16.10%。康奈尔病毒和泽西噬菌体均来自尾噬菌门, 目前没有关于康奈尔病毒在食品加工废水中存在的报道。食品加工废水中可能存在其他病毒, 如肠道病毒和轮状病毒等<sup>[20-21]</sup>, 泽西噬菌体可以特异性感染和裂解这些病原菌<sup>[22-23]</sup>, 可推测鲜萃花椒油分离废水中的泽西噬菌体在其中发挥着控制病原菌数量的作用。醋杆菌属和肠杆菌属均来自变形杆菌门, 部分醋杆菌属菌株能够在特定酸碱度<sup>[24]</sup>、温度<sup>[25]</sup>等条件下生存, 具有适应废水环境的特性, 可在某些特定的废水中检测到<sup>[22]</sup>。肠杆菌属在食品加工废水处理中也较常见, 如在某奶酪生产厂废水处理中发现, 阴沟肠杆菌在 36 h 的孵

育后的 COD 去除率可达到  $(87.0 \pm 0.4)\%$  [26]; Zhang 等 [27] 通过定量 PCR 检测发现,在共培养条件下肠杆菌中的 *napA2*、*narG* 和 *ppk* 基因显著上调,这些基因分别与硝酸盐还原酶(*NapA* 和 *NarG*)和聚磷酸盐激酶(*ppk*)相关,表明肠杆菌可增强对总氮和磷酸盐的去除效率,可推测试验检测到的肠杆菌属也在鲜萃花椒油分离废水中发挥着去除 COD 和氨氮的作用。乳杆菌科中未分类的属来自厚壁菌门,目前并无该菌属在废水处理中的相关报道,但通过对乳酸菌科的一般特性以及相关研究分析,推测该菌属可能在废水中发挥着有机物降解、影响微生物群落结构、参与氮磷循环等作用 [28]。

## 2.2 鲜萃花椒油分离废水降污菌株筛选

2.2.1 降污菌株分离筛选 经分离纯化,A组废水样品中并未分离出可降污菌株,B组样品中共筛选出22株可去除COD和氨氮的菌株;B组样品中的菌株为在室外自然培养1个月富集所得,这部分菌株已适应花椒废水的环境,故只能从B组样品中筛出可去除COD和氨氮的菌株。将从B组废水样品中分离得到的22株菌株命名为X1~X22。

由图4可知,在初始COD质量浓度为10 203.00 mg/L,氨氮质量浓度为102.81 mg/L,总磷质量浓度为82.84 mg/L左右的模拟废水培养基中,菌株X4、X21和X22对COD、氨氮和总磷的去除能力均高于其他菌株,其COD去除率分别为83.77%,83.23%,85.20%,氨氮去除率分别为66.06%,69.26%,63.73%,总磷去除率分别为21.20%,27.81%,20.08%。因此,选择这3株菌进行后续试验。

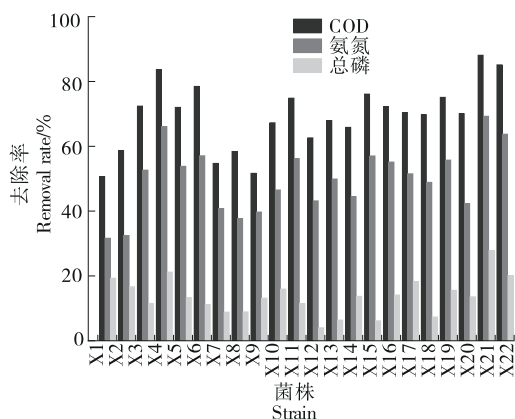


图4 22株降污菌株在模拟废水培养基中对COD、氨氮和总磷的去除率

Figure 4 Removal rates of COD, ammonia nitrogen, and total phosphorus by 22 pollution-reducing strains in the simulated wastewater medium

2.2.2 花椒油废水抑菌特性 由表2可知,金黄色葡萄球菌对该废水敏感(抑菌圈直径14~20 mm) [29],从试验中筛选出的菌株X4、X21和X22对该废水不敏感(抑菌圈直

径 $<4$  mm);其他来源降污菌株中,3株菌(*Acinetobacter johnsonii* ENJ1、*Pseudomonas fragi* EH-H1和 *Pseudomonas poae* EH-H3)对该废水中度敏感(抑菌圈直径为8~14 mm),1株菌(*Acinetobacter guillouiae* BY18)对该废水敏感。表明鲜萃花椒油加工中分离的抑菌性废水对金黄色葡萄球菌和4株其他来源的降污菌株均具有抑制作用,4株降污菌株因在该废水中的生长繁殖受到抑制而不能很好地发挥降污性能,但从试验中适生富集筛选出的3株菌因已适应鲜萃花椒油分离废水的抑菌性,可在该废水中很好地发挥其降污能力。

表2 鲜萃花椒油分离废水对不同菌株的抑菌圈直径

Table 2 Diameters of inhibition zone of different strains by wastewater isolated by freshly-extracted *Zanthoxylum* oil

| 菌株                                   | 抑菌圈直径/mm   |
|--------------------------------------|------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> 186335  | 16.18±0.85 |
| <i>Acinetobacter guillouiae</i> BY18 | 14.25±0.56 |
| <i>Acinetobacter johnsonii</i> ENJ1  | 9.12±0.11  |
| <i>Pseudomonas fragi</i> EH-H1       | 8.16±0.39  |
| <i>Pseudomonas poae</i> EH-H3        | 8.04±0.37  |
| <i>Pseudomonas taiwanensis</i> X22   | 3.99±0.54  |
| <i>Bacillus stercoris</i> X4         | 3.61±0.19  |

2.2.3 优选菌株在实际废水中的降污效果 由图5可知,在初始COD质量浓度为10 222.00 mg/L,氨氮质量浓度为169.78 mg/L,总磷质量浓度为110.10 mg/L左右的鲜萃花椒油分离废水培养基中,菌株X4、X21和X22的COD去除率分别为55.47%,50.76%,52.32%,氨氮去除率分别为55.93%,54.19%,40.79%,总磷去除率分别为18.49%,12.67%,19.01%。3株菌在实际废水中的降污能力略低于模拟废水培养基,主要与实际废水的复杂成分密切相关,相较于模拟废水培养基,实际鲜萃花椒油分离废水中不仅含有高浓度COD、氨氮和总磷,还含有多种其他复杂的有机物和难降解化合物,这些额外成分可能干扰菌株的代谢途径 [30],影响其对COD、氨氮和总磷的去除效果。此外,实际废水培养基源于鲜萃花椒油分离废水,该废水中仍含有抑菌作用的活性物质 [31],这些物质可能通过干扰细菌细胞壁合成或代谢活动 [32],抑制菌株生长和繁殖,降低其生理活性,进一步削弱其降污能力。

## 2.3 菌株鉴定

2.3.1 形态学鉴定 由图6可知,菌株X4在固体培养基上呈白色,形状为圆形,边缘不整齐,表面粗糙且不透明,革兰氏阳性,菌体杆状,无鞭毛、无芽孢;菌株X21呈浅黄色,形状为圆形,边缘整齐,质地湿润且黏稠,表面光滑,革兰氏阴性,菌体杆状,无鞭毛、无芽孢;菌株X22呈黄绿色,形状呈圆形,边缘整齐,表面光滑,革兰氏阴性,菌体

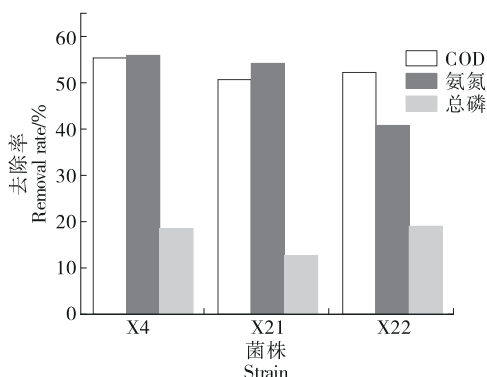
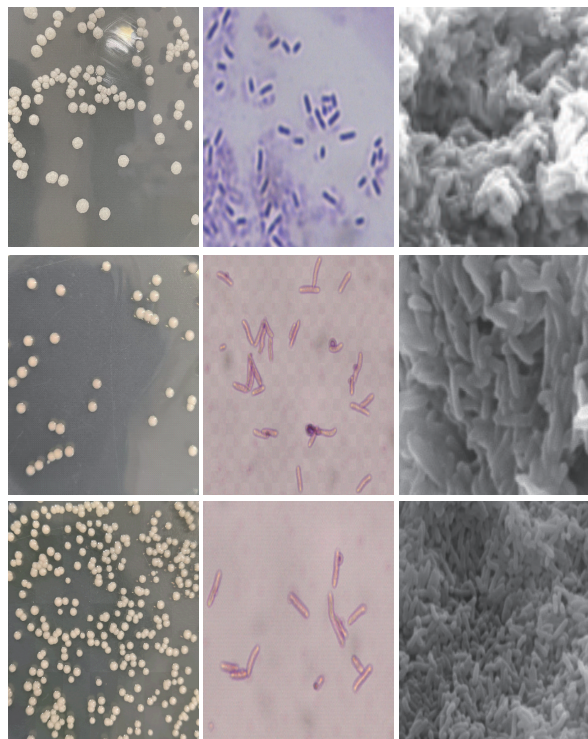


图5 3株高效降污菌株在实际废水培养中对COD、氨氮和总磷的去除率

Figure 5 Removal rates of COD, ammonia nitrogen, and total phosphorus by three highly efficient pollution-reducing strains in the cultivation with actual wastewater

杆状,无鞭毛、无芽孢。

2.3.2 16S rDNA 分子生物学鉴定 将菌株X4、X21和X22的16S rDNA序列在NCBI-nucleotide数据库中进行比对,发现菌株X4与*Bacillus stercoris* strain D7XPNI同

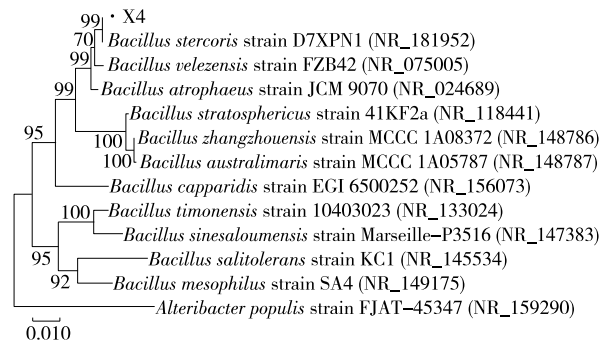


从左至右分别为菌落形态图、革兰氏染色图和扫描电镜图;从上至下分别为菌株X4、X21和X22

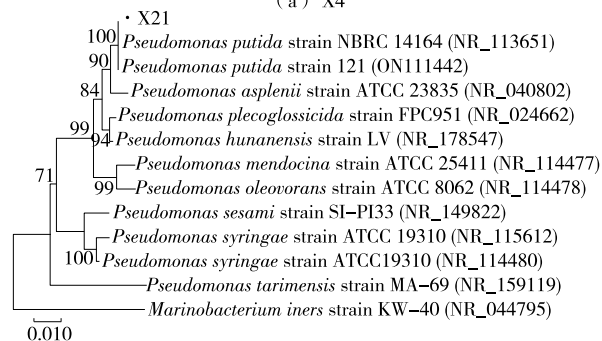
图6 菌株X4、X21和X22的菌落形态图、革兰氏染色图和扫描电子显微镜图

Figure 6 Colony morphology, Gram staining, and scanning electron microscopy images of strains X4, X21, and X22

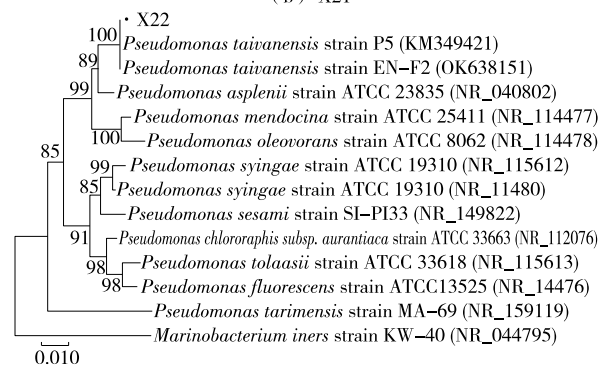
源性为99%,X21与*Pseudomonas putida* strain NBRC14164同源性为100%,X22与*Pseudomonas taiwanensis* strain P5同源性为100%。由图7可知,菌株X4为枯草芽孢杆菌堆肥亚种,菌株X21为恶臭假单胞菌,菌株X22为台湾假单胞菌。恶臭假单胞菌和台湾假单胞菌均属于变形菌门,枯草芽孢杆菌属于厚壁菌门,3株菌均可在B组样品宏基因组测序结果中可见。



(a) X4



(b) X21



(c) X22

图7 基于16S rDNA基因序列同源性构建的菌株X4、X21和X22的系统发育树

Figure 7 Phylogenetic trees of strains X4, X21, and X22 constructed based on 16S rDNA gene sequence homology

王朝旭等<sup>[33]</sup>从某污水处理厂中筛选出一株恶臭假单胞菌N3,对氨氮质量浓度为10 mg/L的废水72 h内的氨氮去除率为72.02%;He等<sup>[34]</sup>筛选了一株在氨氮质量浓度约为50 mg/L的废水中对氨氮的去除率可达100%的台湾

假单胞菌 J488。这两株菌的氨氮去除率均略高于试验中筛选的菌株,可能与试验中鲜萃花椒油分离废水具有抑菌性且污染物含量较高有关。枯草芽孢杆菌堆肥亚种在废水中能够分泌多种酶类<sup>[35]</sup>,如蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶等,这些酶可以将污废水中的有机物质分解为小分子物质,从而去除废水中的 COD;张云泽等<sup>[36]</sup>研究发现,枯草芽孢杆菌可通过其代谢作用,将氨氮转化为无害的物质,从而降低水中的氨氮含量。

### 3 结论

宏基因组测序结果显示,鲜萃花椒油分离废水的优势门类为尾噬菌门、变形杆菌门和厚壁菌门,优势菌属为醋杆菌属、乳杆菌科中未分类的属和肠杆菌属。从鲜萃花椒油分离废水中复筛得到 3 株对化学需氧量和氨氮降解效果较好的菌株,经鉴定菌株 X4 为枯草芽孢杆菌堆肥亚种,菌株 X21 为恶臭假单胞菌,菌株 X22 为台湾假单胞菌,且 3 株菌均在鲜萃花椒油分离废水宏基因组测序结果中可见。在实际抑菌性废水培养基中,3 株菌株对高浓度化学需氧量的去除率分别为 55.47%, 50.76%, 52.32%, 对高浓度氨氮的去除率分别为 55.93%, 54.19%, 40.79%。综上,菌株 X4、X21 和 X22 均可显著降低抑菌性废水中污染物的浓度。后续可进一步研究 3 种菌株在复杂废水环境中的适应性及其与其他微生物的协同作用,以优化处理工艺并扩大其实际应用范围。

### 参考文献

- [1] DROZDOV I Y, ALEKSAKHIN A V, ALEKSAKHINA Y V, et al. Mathematical models of water pollution evaluation[J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2021, 684(1): 012026.
- [2] 祁彦青, 裔照晖. 污水 COD 超标的原因与控制研究[J]. 工业微生物, 2023, 53(1): 76-78.  
QI Y Q, YI Z H. Study on the causes and control of excessive COD in Sewage[J]. Industrial Microbiology, 2023, 53(1): 76-78.
- [3] 邓永飞, 刘涛, 吴海铨, 等. 食品工业废水处理技术研究进展[J]. 工业水处理, 2021, 41(10): 1-7, 13.  
DENG Y F, LIU T, WU H Q, et al. Research progress of wastewater treatment technology in food industry [J]. Industrial Water Treatment, 2021, 41(10): 1-7, 13.
- [4] WU X L, ZHOU H, LI L Z, et al. Whole genome sequencing and comparative genomic analyses of *Lysinibacillus pakistanensis* LZH-9, a halotolerant strain with excellent COD removal capability[J]. Microorganisms, 2020, 8(5): 716.
- [5] 袁野, 周佳, 屈建航, 等. 高效反硝化聚磷菌的筛选及其脱氮除磷条件和性能研究[J]. 生物技术通报, 2023, 39(7): 266-276.  
YUAN Y, ZHOU J, QU J H, et al. Screening of an efficient denitrifying phosphorus-accumulating bacterium and its denitrification and phosphorus removal[J]. Biotechnology Bulletin, 2023(7): 266-276.
- [6] 胡晴文, 彭郁, 李茉, 等. 花椒油和花椒籽油提取技术研究进展[J]. 中国油脂, 2024, 49(1): 16-21.  
HU Q W, PENG Y, LI M, et al. Research progress on extraction process of *Zanthoxylum bungeanum* oil and *Zanthoxylum bungeanum* seed oil[J]. China Oils and Fats, 2024, 49(1): 16-21.
- [7] 席少阳, 郭延秀, 马晓辉, 等. 花椒化学成分及药理作用的研究进展[J]. 华西药理学杂志, 2021, 36(6): 717-722.  
XI S Y, GUO Y X, MA X H, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Zanthoxylum*[J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 2021, 36(6): 717-722.
- [8] 屈岩峰, 郭晓婵, 唐嘉瞳, 等. 花椒中天然成分提取工艺及在食品中的应用研究进展[J]. 食品与机械, 2024, 40(5): 234-240.  
QU Y F, GUO X C, TANG J T, et al. Research progress on the extraction process of natural components from *Zanthoxylum bungeanum* and its application in food[J]. Food & Machinery, 2024, 40(5): 234-240.
- [9] LI D H, LIU C M, LUO R B, et al. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph[J]. Bioinformatics, 2015, 31(10): 1 674-1 676.
- [10] LI D H, LUO R B, LIU C M, et al. MEGAHIT v1.0: a fast and scalable metagenome assembler driven by advanced methodologies and community practices[J]. Methods, 2016, 102: 3-11.
- [11] HYATT D, CHEN G L, LOCASCIO P F, et al. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification[J]. BMC Bioinformatics, 2010, 11: 119.
- [12] BUCHFINK B, XIE C, HUSON D H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND[J]. Nature Methods, 2015, 12(1): 59-60.
- [13] 谭雨心, 渡部由香, 廖明系, 等. 柑橘皮油胞层提取物的抗氧化活性与抑菌活性[J]. 食品与机械, 2024, 40(9): 145-152.  
TAN Y X, WATANABE Y K, LIAO M X, et al. Study on antioxidant and antibacterial activity of extracts from flavedo of citrus peel[J]. Food & Machinery, 2024, 40(9): 145-152.
- [14] 梁红春, 夏陈, 邓俊琳, 等. 5 种处理方法对赶黄草功效成分、体外抗氧化性和抑菌活性的影响[J]. 食品与机械, 2025, 41(3): 134-141.  
LIANG H C, XIA C, DENG J L, et al. Effects of five different processing methods on functional components, *in vitro* antioxidant ability, and antibacterial activities of *Penthorum chinense* Pursh[J]. Food & Machinery, 2025, 41(3): 134-141.
- [15] WANG X h, XU X, BAO Z, et al. Analysis of fermentation microbial diversity in biogas slurry by using high-throughput sequencing in Xinjiang, China[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2019, 35(5): 219-225.
- [16] HU X J. Microalgae-based meat processing wastewater treatment for nutrients recovery and water reconditioning[D].

- Lincoln: The University of Nebraska-Lincoln, 2020.
- [17] 赵婷婷, 乔凯, 王蕾, 等. 淀粉废水处理系统中活性污泥的微生物群落结构及多样性分析[J]. 环境科学, 2020, 41(1): 321-329.
- ZHAO T T, QIAO K, WANG L, et al. Measurements of bacterial community and biodiversity from activated sludge for a wastewater treatment containing starch[J]. Environmental Science, 2020, 41(1): 321-329.
- [18] LI W, ZHU X Y, HOU Y H, et al. The treatment of high-concentration garlic processing wastewater by UASB-SBR[J]. Environmental Technology, 2023, 44(7): 921-935.
- [19] ALEXYUK P, BOGOYAVLENSKIY A, ALEXYUK M, et al. Isolation and characterization of lytic bacteriophages active against clinical strains of *E. coli* and development of a phage antimicrobial cocktail[J]. Viruses, 2022, 14(11): 2 381.
- [20] YANG W, CAI C, DAI X H. Interactions between virus surrogates and sewage sludge vary by viral analyte: recovery, persistence, and sorption[J]. Water Research, 2022, 210: 117995.
- [21] AZZAM M, FAIESAL A A, MOHAMMED F A, et al. An innovative approach using lytic phage mix for wastewater management and pathogen control[J]. Egyptian Journal of Applied Science, 2023, 38(3): 14-44.
- [22] ALVAREZ-PEREZ S, BAKER L J, MORRIS M M, et al. *Acinetobacter pollinis* sp. nov., *Acinetobacter baretiae* sp. nov. and *Acinetobacter rathckeae* sp. nov., isolated from floral nectar and honey bees[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2021, 71(5): 4 783.
- [23] DING Y F, HUANG C X, ZHU W J, et al. Characterization of a novel *Jerseyvirus* phage T102 and its inhibition effect on biofilms of multidrug-resistant *Salmonella*[J]. Virus Research, 2023, 326: 199054.
- [24] SYAZWANI A, MISNON M I, AHMAD M R, et al. The characteristics of acetobacter xylinum membrane affected by pH of culture medium[J]. International Journal of Advanced Technology and Engineering Exploration, 2019, 9(1): 5 873-5 878.
- [25] SRIPHOCHANART W, KRUSONG W, SAMUELA N, et al. Enhancing small-scale acetification processes using adsorbed *Acetobacter pasteurianus* UMCC 2951 on  $\kappa$ -carrageenan-coated luffa sponge[J]. PeerJ, 2024, 12: e17650.
- [26] RAJALAKSHMI B S, FATHIMA A A S, JASMINE B S, et al. Pollutant removal from cheese processing effluent using effective indigenous natural scavengers[J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2022, 195(1): 12.
- [27] ZHANG Y X, XU Z X, LI J X, et al. Cooperation between two strains of *Enterobacter* and *Klebsiella* in the simultaneous nitrogen removal and phosphate accumulation processes[J]. Bioresource Technology, 2019, 291: 121854.
- [28] 聂紫玉, 吴艳阳, 王增光, 等. 植物源益生乳酸菌的筛选及其特性[J]. 食品科学, 2022, 43(18): 143-151.
- NIE Z Y, WU Y Y, WANG Z G, et al. Screening and Characterization of Plant-derived Probiotic Lactic Acid Bacteria[J]. Food Science, 2022, 43(18): 143-151.
- [29] 何正云, 伍乔, 毛雨, 等. 不同产地山胡椒油的抑菌活性比较研究[J]. 山地农业生物学报, 2025, 44(1): 51-58, 75.
- HE Z Y, WU Q, MAO Y, et al. Comparative study on the antibacterial activities of *litsea glauca* oils from different geographical origins[J]. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 2025, 44(1): 51-58, 75.
- [30] NEERACKAL G M, NDEGWA P M, JOO H S, et al. Potential application of *Alcaligenes faecalis* strain No. 4 in mitigating ammonia emissions from dairy wastewater[J]. Bioresource Technology, 2016, 206: 36-42.
- [31] 赵二劳, 徐未芳, 刘乐, 等. 花椒抑菌作用研究进展[J]. 中国调味品, 2019, 44(3): 185-188.
- ZHAO E L, XU W F, LIU L, et al. Research progress of the bacteriostasis of *Zanthoxylum bungeanum*[J]. China Condiment, 2019, 44(3): 185-188.
- [32] 脱聪聪, 丁旭, 周瑶, 等. 甘肃陇南大红袍花椒芳香油成分分析及其抑菌活性[J]. 食品工业科技, 2020, 41(5): 227-231, 238.
- TUO C C, DING X, ZHOU T, et al. Composition analysis and antibacterial activity of aromatic oil of Dahongpao pepper from Longnan in Gansu Province[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(5): 227-231, 238.
- [33] 王朝旭, 任静. 改性生物炭固定异养硝化菌对水中低浓度氨氮的去除[J]. 环境污染与防治, 2021, 43(2): 139-144.
- WANG Z X, REN J. Removal of ammonia nitrogen with low concentration in water by heterotrophic nitrifying bacteria immobilized on modified biochar[J]. Environmental Pollution & Control, 2021, 43(2): 139-144.
- [34] HE T X, XIE D T, NI J P, et al. Nitrous oxide produced directly from ammonium, nitrate and nitrite during nitrification and denitrification[J]. Journal of Hazardous Materials, 2020, 388: 122114.
- [35] PREM ANAND M, HARIHARAN V C, SHANKAR H, et al. Genome sequence of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* Strain IITK SM1, Isolated from kitchen waste compost[J]. Microbiology Resource Announcements, 2019, 8(6): e01330-18.
- [36] 张云泽, 张磊, 张礼, 等. 水处理枯草芽孢杆菌的研究[J]. 盐科学与化工, 2022, 51(2): 15-17.
- ZHANG Y Z, ZHANG L, ZHANG L, et al. Study on *Bacillus subtilis* in water treatment[J]. Journal of Salt Science and Chemical Industry, 2022, 51(2): 15-17.