

松醇油降解菌的分离鉴定及降解条件优化

梁杰慧, 孙水裕, 杜青平, 刘敬勇, 黄绍松, 尹光彩, 田 静, 曾佳俊, 许娉婷

(广东工业大学 环境科学与工程学院, 广州 510006)

摘 要: 从广东凡口铅锌矿尾矿库周边土壤中分离出一株能高效降解松醇油的细菌 KS-1, 并进行人工配制含松醇油的模拟废水的化学需氧量(COD)降低条件优化试验研究。形态学和生理学分析表明: 该 KS-1 菌株为革兰氏阳性好氧菌, 呈细胞杆状、芽孢椭圆或柱状; 接触酶、硝酸盐还原和 V-P 测定呈阳性反应; 能利用葡萄糖、木糖、甘露醇、柠檬酸盐、淀粉和明胶生长, 不能利用吡啶、卵黄卵磷脂酶、苯丙氨酸脱氨酶和丙酸盐生长。16SrDNA 序列分析表明: 该菌株与 *Bacillus subtilis* AF0907 的相似性达到 100%, 最终鉴定菌株 KS-1 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* AF0907), 登录号为 GU272021。正交试验优化结果表明: 菌株 KS-1 降低松醇油废水 COD 工艺最佳条件为 pH4, 接种量 15%, 摇床转速 200 r/min, 松醇油浓度 300 mg/L, 在此条件下反应 4 d, COD 去除率达到 65.91%。

关键词: 松醇油; 选矿废水; 菌种鉴定; 枯草芽孢杆菌

中图分类号: Q939.99

文献标志码: A

Isolation and identification of pine oil degrading bacteria and optimization of degrading conditions

LIANG Jie-hui, SUN Shui-yu, DU Qing-ping, LIU Jing-yong,

HUANG Shao-song, YIN Guang-cai, TIAN Jing, ZENG Jia-jun, XU Ping-ting

(School of Environmental Science and Engineering, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: A strain KS-1 capable of highly degrading pine oil was isolated from the soil collected from tailings reservoir in Fankou Lead-zinc Mine of Guangdong province, and the best degradation conditions of pine oil wastewater (chemical oxygen demand, COD) were investigated. The analysis of morphology and physiology shows that the strain KS-1 is gram-positive and aerobic bacterium and rhabditiform, which can grow by using glucose, xylose, mannitol, citrate, starch and gelatin and cannot grow with indole, yolk lecithinase, phenylalanine deaminase and propionate. Based on analysis of phenotype, physiological and biochemical characters and 16SrDNA, KS-1 is identified as *Bacillus subtilis* AF0907 due to its 16SrDNA sequence, GU272021, which has the similarity of 100% to *Bacillus subtilis* AF0907. According to the orthogonal optimization test, the degradation conditions are as follows: pH 4, inoculating ratio 15%, rotation speed 200 r/min, pine oil concentration 300 mg/L, with COD removal rate up to 65.91% in 4 d.

Key words: pine oil; flotation wastewater; strain identification; *Bacillus subtilis*

松醇油是国内外铅锌硫化矿选矿中使用最广泛的起泡剂, 它是在以松节油为原料、硫酸为催化剂, 酒精或平平加(一种表面活性剂)为乳化剂的参与下, 发生水解反应制取的。其主要化学成分萜烯醇是一种环状结构, 难以自然降解, 会残留在选矿废水中^[1-3], 从

而导致选矿废水的化学需氧量(COD)升高, 使选矿废水难以达标排放并对水体中的动植物和人类构成威胁^[4-5]。

目前, 国内外处理选矿废水的方法主要有酸碱中和法^[6]、混凝沉降法^[7]、化学氧化法^[8]、人工湿地法^[9]

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40971251)

收稿日期: 2011-10-28; 修订日期: 2012-04-26

通信作者: 孙水裕, 教授, 博士; 电话: 020-39322293; E-mail: sysun@gdut.edu.cn

和微生物法^[10]。酸碱中和法和混凝沉降法存在结垢严重、沉淀污泥量大、易造成二次污染等弊端,且不易去除残留在选矿废水中的有机浮选药剂(如黄药和松醇油),化学氧化法处理费用高;人工湿地法占地面积大,易受外界环境的影响;微生物降解法具有高效降解有机污染物、无二次污染、费用低等优点,已经引起越来越多研究者的关注^[5]。LI等^[11]用两段接触氧化生物吸附反应器处理铜矿选矿废水,经过长期运营发现该反应器能有效去除重金属,化学需氧量和氨氮的去除率分别达到84.1%和71.3%。HE等^[12]采用厌氧/生物活性碳反应器对模拟选矿废水进行处理,在最佳碳水比(质量比)为2:1、最佳气水比(质量比)为3:1、水力停留时间为4 h时,可将模拟废水COD浓度由300 mg/L降至100 mg/L以下。LI^[13]研究了葡萄球菌 *Auricularis* 对矿山废水中重金属的生物吸附能力,发现当菌剂量为15 g/L时,100 mg/L Cu和50 mg/L Zn的去除率分别是77.1%和56.3%。张萍等^[14]及肖华花^[15]从南京某硫化矿溢流井废水中分别筛选出能高效降解捕收剂黄药和黑药的降解菌,初步鉴定为假单胞菌属,并研究了其降解特性。但目前国内外对选矿废水生物处理的研究主要针对重金属离子、黄药、黑药等目标污染物的去除或降解,对于微生物法降解选矿废水中常见起泡剂松醇油的研究还未见报道。本文作者对亚洲最大的硫化铅锌矿——广东省韶关市凡口铅锌矿尾矿库周边的土样进行取样、富集、培养,并分离出一株以松醇油为唯一碳源的高效降解菌,研究其对松醇油的降解特性及最佳条件,从而为微生物净化处理含残留松醇油的尾矿库废水提供试验依据。

1 实验

1.1 培养基

无机盐培养基按照文献^[15]配制;以松醇油为唯一碳源的富集培养基:将无机盐培养基灭菌,冷却后加入松醇油;固体选择培养基:在富集培养基的基础上,加入20 g/L琼脂粉;牛肉膏蛋白胨培养基用于制备种子液和菌种斜面保存。

1.2 松醇油降解菌的富集分离

实验土样采自凡口铅锌矿尾矿库周边的土壤。细菌富集分离过程采用定时定量、逐步提高松醇油浓度的方法。将实验土样于37℃生化培养箱活化3 d,称取5.0 g土样于盛有100 mL已灭菌的富集培养基(加入1%松醇油)的锥形瓶中,在37℃、120 r/min水浴摇

床中培养7 d后,以10%(体积分数)的接种量接入新鲜的富集培养基(加入2%松醇油),同样条件下培养7 d。继续提高碳源浓度,以同样的接种量接入新鲜的富集培养基(加入3%松醇油),相同条件下驯化7 d。取最后富集液用稀释平板法进行分离,选取单菌落接种到以松醇油为唯一碳源的固体选择培养基上,反复多次,最终得到分离和纯化,选取生长良好的单菌落保存。

1.3 分离菌株的鉴定

对分离筛选得到的松醇油降解菌KS-1,参照文献^[16-17],采用菌落形态观察、生理生化特征实验及16SrDNA序列分析相结合的方法进行鉴定。将16SrDNA测序结果运用BLAST软件与GenBank数据库中的序列进行比较,从中获得与菌株KS-1序列最相近的16SrDNA序列(即参照序列),然后使用CLUSTAL X 1.81软件对菌株KS-1的序列和参照序列进行对比,利用MEGA 3.1软件,采用邻接法构建系统发育树。

1.4 菌悬液的制备

在无菌条件下,选取单菌落接种到已灭菌的牛肉膏蛋白胨培养基,在37℃、120 r/min摇床中培养16 h,并将菌液在12 000 r/min条件下离心15 min,去掉上清液,用已灭菌的无机盐培养基重悬,使细菌的数目达到108 mL⁻¹。

1.5 松醇油降解试验

松醇油由广东省韶关市凡口铅锌矿选厂提供。无菌条件下,按照15%的接种量将菌悬液接种到已灭菌的无机盐培养基中,并加入松醇油使得松醇油的浓度为300 mg/L,在37℃、150 r/min摇床中培养7 d。为研究松醇油降解菌对选矿废水中COD的降解能力,在本研究中采用COD来衡量目标菌株对松醇油的降解效果。每天定时取上述培养液在12 000 r/min条件下离心15 min,取上清液测定COD;同时取样直接测定细菌生长量。COD按照文献^[18]测定。菌株生物量采用比浊法^[19]于600 nm处测定其吸光度,即OD₆₀₀值。

1.6 正交试验设计

运用正交试验法研究松醇油降解菌的降解特性。根据文献^[20]确定本实验的影响因素为4个,4因素3水平可采用L₉(3⁴)正交表。选择对降解菌生长影响较大的pH值、接种量、摇床转速和松醇油浓度4个因素作为考察对象。松醇油降解菌的降解条件的因素与水平见表1。

表 1 松醇油降解菌降解条件的正交因素与水平

Table 1 Orthogonal factors and levels of degradation conditions by pine oil degrading bacteria

Level	pH (A)	Inoculating ratio/% (B)	Rotation speed/(r·min ⁻¹) (C)	Concentration of pine oil/(mg·L ⁻¹) (D)
1	4	5	100	100
2	6	10	150	200
3	10	15	200	300

2 结果与讨论

2.1 菌株的分离及鉴定

2.1.1 形态及生理生化特征

以松醇油为唯一碳源富集分离，逐步驯化，筛选出一株能在固体选择培养基中生长迅速、外形较大的菌株作为试验菌株，命名为 KS-1。菌株 KS-1 在牛肉膏蛋白胨固体培养基上培养 24 h 后，菌落表面粗糙不透明，呈白色或微黄色。菌株 SEM 像显示，该菌株为杆状，菌体大小为(1.0±0.05) μm×(1.8±0.2) μm，如图 1 所示。菌株革兰氏染色结果为阳性，呈芽孢椭圆状或柱状，位于菌体中央或稍偏，有鞭毛，能运动。

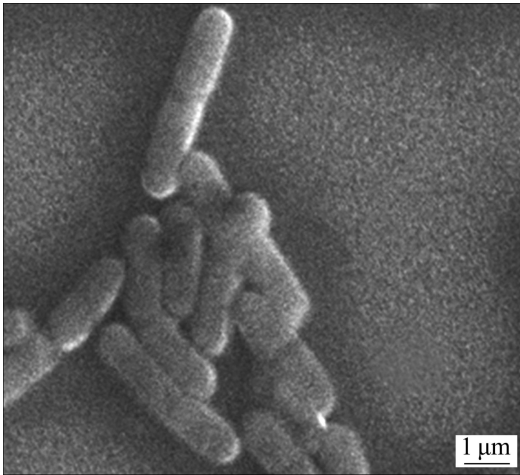


图 1 菌株 KS-1 的 SEM 像

Fig. 1 SEM image of KS-1

根据文献[16–17]有针对性地进行生理生化试验，结果见表 2。表 2 表明，菌株 KS-1 好氧，接触酶试验、硝酸盐还原试验和 V-P 测定呈阳性反应，能利用葡萄糖、木糖、甘露醇、柠檬酸盐，能水解淀粉和明胶，不能利用吡啶、卵黄卵磷脂酶、苯丙氨酸脱氨酶和丙酸盐。以上鉴定结果与微生物分类法^[16–17]和王海峰等^[21]报道的枯草芽孢杆菌的生理生化特征一致。初步确定菌株 KS-1 为枯草芽孢杆菌。

表 2 菌株 KS-1 的生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characters of KS-1

Biochemical reaction	Biochemical reaction	Physiological and biochemical reaction
Xylose (+)	Catalase (+)	Indole (–)
Mannitol (+)	Nitrate reduction (+)	Propionate (–)
Starch hydrolysis (+)	Gelatin hydrolysis (+)	Yolk lecithinase (–)
Glucose fermentation (+)	Voges-Proskauer reaction (+)	Phenylalanine Deaminase (–)
		Citrate (+)

“+” indicates positive reaction; “–” indicates negative reaction.

2.1.2 16SrDNA 序列分析

将菌株提取基因组 DNA 后进行 16S rDNA 片段的 PCR 扩增，扩增产物经凝胶电泳检测，并进行测序，序列长度为 1 458 bp，在 GenBank 中登录号为 GU272021。将菌株 KS-1 的 16S rDNA 的基因序列运用 BLAST 软件和 GenBank 中的序列进行同源性比较，结果表明，菌株 KS-1 与 *Bacillus subtilis* AF0907 序列同源性达 100%。结合菌株 KS-1 株的菌株形态特征和生理生化特征，鉴定菌株 KS-1 为枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* AF0907。菌株的系统发育进化树见图 2。

2.2 化学需氧量(COD)变化特性

将菌株活化并制备菌悬液后接种到松醇油降解培养基中，测定 COD 去除率和 OD₆₀₀ 值，结果如图 3 所示。

从图 3 可以看出，COD 的去除率与菌株 KS-1 生长量的变化趋势基本吻合。接种后的第 1~3 天菌株 KS-1 处于延滞期，细菌生长量少，COD 的去除率不高，对松醇油的降解速度较慢。这是因为当菌株从营养丰富的培养基转移到一个营养不良培养基时，会出现延滞期；在特定培养基中，细胞生长必须具备一套完整的酶系去合成培养基中不存在但对细胞来说又是必需的代谢物。当微生物转移到新鲜的培养基时，需

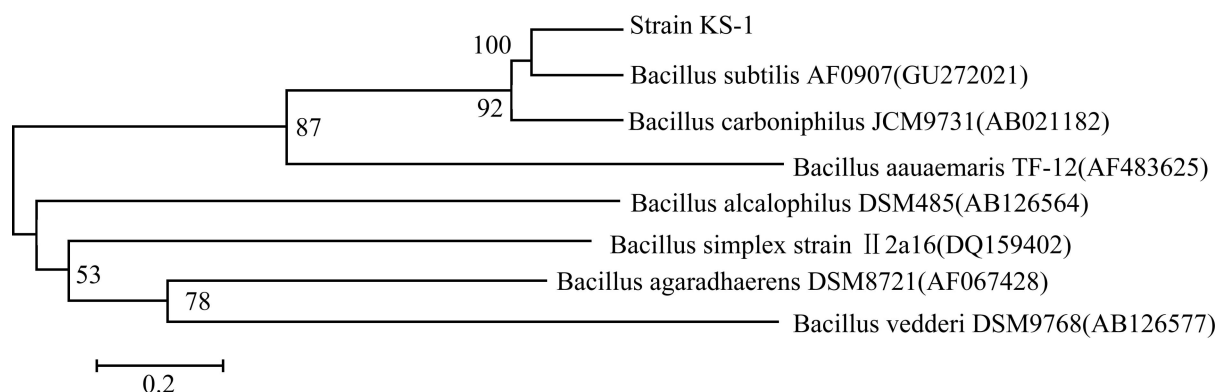


图 2 菌株 KS-1 的系统发育进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of KS-1

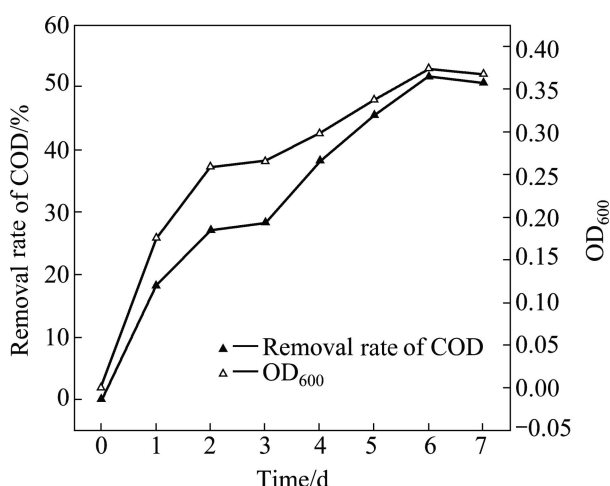


图 3 菌株 KS-1 对松醇油的降解结果

Fig. 3 Degrading results of pine oil by KS-1

要时间去合成新的酶^[22]。从第 3 天开始菌株生长量持续快速增加, 菌株处于对数生长期, 此时细菌数量多且活性高, COD 的去除率不断升高, 对松醇油的降解明显加快, 表明此阶段菌株充分利用自身合成的酶, 以松醇油为碳源, 大量繁殖。到第 6 天 COD 的降解率达到 51.9%, 第 7 天菌株生长量和 COD 去除率都开始下降, 这是由于培养基中碳源松醇油的消耗, 中间代谢产物的产生, 细胞毒素的积累, 细菌繁殖速度下降。

目前, 关于松醇油的吸附去除与臭氧氧化法去除已有研究。张晓茜^[23]研究了不同滤料(镁渣滤料、铝渣、石英砂)对松醇油的吸附作用, 发现在相同的松醇油浓度下, 镁渣滤料吸附容量最大, 但松醇油去除率只有 12.904%。欧阳魁^[24]用臭氧法去除松醇油, 当臭氧氧化 6 min 时, 松醇油去除率达到 95.26%, 但臭氧不稳定、易分解、不能贮存, 必须在使用现场制造,

且臭氧发生器能耗高、设备操作及维修麻烦, 水质水量变化时, 投加量调节困难, 因此, 臭氧氧化法应用于大量尾矿库废水的治理成本过高, 工程应用可能性小。与以上方法相比, 在本研究中筛选得到的菌株 KS-1 对松醇油的降解效率高、成本低、无二次污染, 且枯草芽孢杆菌对不同营养化水体的净水作用已有报道^[25], 表明菌株 KS-1 在降解废水中松醇油具有良好的应用前景。

2.3 松醇油降解菌降解条件优化

根据文献[20], 运用综合平衡法对试验结果进行极差分析, 结果见表 3。计算步骤如下: 逐列计算各因素同一水平之和, 记作 X_1 、 X_2 和 X_3 ; 逐列计算各水平的平均数记作 $\bar{x}_1$ 、 $\bar{x}_2$ 和 $\bar{x}_3$; 逐列计算各水平平均数的极差, 记作 R 。计算公式如下:

$$\bar{x}_1 = \frac{X_1}{n/3}, n = 9 \quad (1)$$

$$R_A = \max \bar{x}_A - \min \bar{x}_A \quad (2)$$

2.3.1 主次顺序的确定和初选优化降解条件

根据表 3 可知, 对于试验指标 OD₆₀₀, 4 个因素极差由大到小的顺序为 R_A 、 R_C 、 R_B 、 R_D 。由此可知, 各因素对菌株 KS-1 的生长情况影响由大到小的顺序为 A、C、B、D; 根据各因素水平的 $\bar{x}$ 值, 确定各因素的优化水平组合为 A₁B₃C₃D₂。对于试验指标 COD 降解率, 4 个因素的极差由大到小的顺序为 R_D 、 R_C 、 R_B 、 R_A 。由此可知, 各因素对 COD 降解率影响由大到小的顺序为 D、C、B、A; 根据各因素水平的 $\bar{x}$ 值, 确定各因素的优化水平组合为 A₂B₃C₃D₃。

2.3.2 综合平衡法确定最优降解条件

由于两个指标单独分析得到的优化条件不一致,

表 3 松醇油降解菌降解条件正交试验的极差分析

Table 3 Orthogonal test intuitive analysis chart of degradation conditions for pine oil degrading bacteria

Number	Experimental factor				Result	
	A	B	C	D	Removal rate of COD /%	OD ₆₀₀
	pH value	Inoculating ratio/%	Rotation speed/(r·min ⁻¹)	Concentration of pine oil/(mg·L ⁻¹)		
1	4	5	100	100	18.81	0.075
2	4	10	150	200	42.83	0.190
3	4	15	200	300	65.91	0.239
4	6	5	150	300	63.31	0.101
5	6	10	200	100	32.02	0.180
6	6	15	100	200	55.13	0.188
7	10	5	200	200	53.03	0.117
8	10	10	100	300	39.45	0.051
9	10	15	150	100	26.72	0.082
Removal rate of COD	X_1	127.56	135.15	113.40	77.55	
	X_2	150.45	114.30	132.87	150.99	
	X_3	119.19	147.75	150.96	168.66	
	$\bar{x}_1$	42.52	45.05	37.80	25.85	
	$\bar{x}_2$	50.15	38.10	44.29	50.33	
	$\bar{x}_3$	39.73	49.25	50.32	56.22	
	R	10.42	11.15	12.52	30.37	
OD ₆₀₀	X_1	0.504	0.293	0.314	0.337	
	X_2	0.469	0.421	0.373	0.495	
	X_3	0.250	0.509	0.536	0.391	
	$\bar{x}_1$	0.168	0.098	0.105	0.112	
	$\bar{x}_2$	0.156	0.140	0.124	0.165	
	$\bar{x}_3$	0.083	0.170	0.179	0.130	
	R	0.085	0.072	0.074	0.053	

必须对因素的影响主次顺序进行综合考虑，确定最佳降解条件。

对于因素 A，其对 OD₆₀₀ 值影响最大，排第 1 位，取 A₁ 为好；但其对 COD 降解率的影响排第 4 位，为次要的。因此，应以 OD₆₀₀ 值这一指标考虑，选取 A 因素为 A₁。对于因素 B，其对 OD₆₀₀ 值和 COD 降解率影响都排第 3 位，且均取 B₃ 为好，故 B 因素选取 B₃。对于因素 C，其对 OD₆₀₀ 值和 COD 降解率影响都排第 2 位，且均取 C₃ 为好，故 C 因素选取 C₃。对于因素 D，其对 COD 降解率影响排第一位，取 D₃ 为好；其对 OD₆₀₀ 值的影响排第 4 位，为次要的。因此，应以 COD 降解率这一指标考虑，选取 D 为 D₃。

本实验的优化组合为 A₁B₃C₃D₃，即 pH 值为 4，

接种量为 15%，摇床转速为 200 r/min，松醇油浓度为 300 mg/L。此优化组合即是试验 3，试验指标 COD 从 653.27 mg/L 下降到 222.70 mg/L，去除率达到 65.91%，OD₆₀₀ 为 0.239，均为最大值。结果表明，菌株在酸性条件下生长良好，能够降解高浓度松醇油，且在松醇油浓度较高的情况下，适当增大接种量和提高摇床转速可以提高菌株 KS-1 对松醇油的降解率。

3 结论

1) 从广东省韶关市凡口铅锌矿尾矿库周边土壤中筛选出一株能高效降解松醇油的细菌 KS-1，经对其

进行形态特征、生理生化特征鉴定及 16SrDNA 序列分析,鉴定菌株 KS-1 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* AF0907)。

2) 松醇油降解菌降低含松醇油废水 COD 的优化条件如下: pH 4、接种量 15%、摇床转速 200 r/min、松醇油浓度 300 mg/L,在此条件下,COD 从 653.27 mg/L 降到 222.70 mg/L,去除率达到 65.91%。

REFERENCES

- [1] 孔令强,覃文庆,何名飞,刘三军. 蒙自铅锌矿选矿废水净化处理与回用研究[J]. 金属矿山, 2011(4): 153-161.
KONG Ling-qiang, QIN Wen-qing, HE Ming-fei, LIU San-jun. Study on purification and recycling of dressing wastewater from Mengzi lead-zinc mine[J]. Metal Mine, 2011(4): 153-161.
- [2] 陈伟,彭新平,陈代雄. 某铅锌矿选矿废水处理复用与零排放试验研究[J]. 环境工程, 2011, 29(3): 37-39.
CHEN Wei, PENG Xin-ping, CHEN Dai-xiong. Treatment and reuse of a lead-zinc ore dressing wastewater[J]. Environmental Engineering, 2011, 29(3): 37-39.
- [3] 张艳,戴晶平. 凡口铅锌矿选矿废水资源化研究与应用[J]. 有色金属, 2007(6): 33-35.
ZHANG Yan, DAI Jing-ping. Fankou lead-zinc mine flotation wastewater recycling research and application[J]. Nonferrous Metals, 2007, (6): 33-35.
- [4] YANG Qing-wei, LAN Chong-yu, SHU Wen-sheng. Copper and zinc in a paddy field and their potential ecological impacts affected by wastewater from a lead/zinc mine, P. R. China[J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2008, 147(1/3): 65-73.
- [5] 严群,黄俊文,唐美香,赖华,罗仙平. 矿山废水的危害及治理技术研究进展[J]. 金属矿山, 2010(8): 183-186.
YAN Qun, HUANG Jun-wen, TANG Mei-xiang, LAI Hua, LUO Xian-ping. Research progress in the damage of mine wastewater and its treatment techniques[J]. Metal Mine, 2010(8): 183-186.
- [6] 杨晓松,邵立南. 有色金属矿山酸性废水处理技术发展趋势[J]. 有色金属, 2011, 63(1): 114-117.
YANG Xiao-song, SHAO Li-nan. Development tendency of non-ferrous metal mineral acidic wastewater treatment technology[J]. Nonferrous Metals, 2011, 63(1): 114-117.
- [7] YANG Yu, LI Ye, ZHANG Yi-min, LIANG Da-wei. Applying hybrid coagulants and polyacrylamide flocculants in the treatment of high-phosphorus hematite flotation wastewater (HHFW): Optimization through response surface methodology [J]. Separation and Purification Technology, 2010, 76: 72-78.
- [8] 刘红,梅光军,周国华. Bi₂O₃ 催化氧化法处理选矿废水试验研究[J]. 金属矿山, 2011(3): 151-153.
LIU Hong, MEI Guang-jun, ZHOU Guo-hua. Experimental research on wastewater treatment of beneficiation with Bi₂O₃ catalytic oxidation[J]. Metal Mine, 2011(3): 151-153.
- [9] SARDAR K, IRSHAD A, TAHIR S, SHAFIQR R, ABDUL K. Use of constructed wetland for the removal of heavy metals from industrial wastewater[J]. Journal of Environmental Management, 2009, 90: 3451-3457.
- [10] NECULITA C M, ZAGURY G J. Biological treatment of highly contaminated acid mine drainage in batch reactors: Long-term treatment and reactive mixture characterization[J]. Journal of Hazardous Materials, 2008, 157: 358-366.
- [11] LI Gang, LI Ke-qing, LIANG Li-li. Effect of two-phase contact oxidation on enhanced removal of contaminants in wastewater from copper mine[J]. Advanced Materials Research, 2011, 183/185: 1404-1407.
- [12] HE Xu-wen, XIN Lu, DONG Gui-xian, ZHANG Li-ping, ZHANG Shuo. Research on the treatment of simulated flotation wastewater by anaerobic-BAC process[C]//Proceedings of the 2011 International Conference on Remote Sensing, Environment and Transportation Engineering (RSETE 2011). Piscataway, IEEE, 2011: 4261-4364.
- [13] LI Zhong-hua. The biosorption study of heavy metals in mine wastewater by *Staphylococcus Auricularis* [C]//Proceedings of 2010 International Workshop on Diffuse Pollution-Management Measures and Control Technique. California: SCI RES PUBL, 2010: 260-262.
- [14] 张萍,孙水裕,徐劲. 一株有机浮选药剂——黄原酸盐降解菌的特性研究[J]. 环境污染治理技术与设备, 2006, 7(2): 53-56.
ZHANG Ping, SUN Shui-yu, XU Jin. Characteristics of a xanthate-degrading bacterial strain[J]. Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control, 2006, 7(2): 53-56.
- [15] 肖华花. 二苯胺基二硫代磷酸生物降解特性研究[D]. 广州: 广东工业大学, 2006: 13, 19-22.
XIAO Hua-hua. Research on biodegradation characteristics of dianilino dithiophosphoric acid[D]. Guangzhou: Guangdong University of Technology, 2006: 13, 19-22.
- [16] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 45-63.
DONG Xiu-zhu, CAI Miao-ying. Common bacteria system identification manual[M]. Beijing: Science Press, 2001: 45-63.
- [17] 中科院微生物所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法[M]. 北京: 科学出版社, 1978: 56-80.
Bacteria Classification Groups of Chinese Academy of Sciences Microbes. Commonly used appraisal method of general bacteria[M]. Beijing: Science Press, 1978: 56-80.
- [18] 国家环境保护总局水和废水监测分析方法编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 216-219.
Editorial Committee of Water and Exhausted Water Monitoring

- Analysis Method of State Environmental Protection Administration. Water and exhausted water monitoring analysis method[M]. 4th ed. Beijing: China Environmental Science Press, 2002: 216–219.
- [19] 闵 巷. 微生物学试验(试验指导分册)[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2005: 33–35, 97–98.
- MIN Xiang. Microbiology test (test guidance)[M]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 2005: 33–35, 97–98.
- [20] 李志西, 杜双奎. 试验优化设计与统计分析[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 152–160.
- LI Zhi-xi, DU Shuang-kui. Test optimization design and statistical analysis[M]. Beijing: Science Press, 2010: 152–160.
- [21] 王海峰, 包木太, 韩 红, 李希明, 王江涛, 李 阳. 一株枯草芽孢杆菌分离鉴定及其降解稠油特性[J]. 深圳大学学报: 理工版, 2009, 26(3): 221–227.
- WANG Hai-feng, BAO Mu-tai, HAN Hong, LI Xi-ming, WANG Jiang-tao, LI Yang. Isolation and identification of a *Bacillus subtilis* and its characterization in degrading heavy oil[J]. Journal of Shenzhen University: Science and Engineering, 2009, 26(3): 221–227.
- [22] MADIGAN M T, MARTINKO J M, PARKER J. 微生物生物学[M]. 杨文博, 译. 北京: 科学出版社, 2001: 191–93.
- MADIGAN M T, MARTINKO J M, PARKER J. Brock biology of microorganisms[M]. YANG Wen-bo, transl. Beijing: Science Press, 2001: 191–193.
- [23] 张晓茜. 基于在线循环利用的选矿废水处理工艺试验研究[D]. 武汉: 武汉理工大学, 2009: 33–34.
- ZHANG Xiao-qian. Research on treatment process of dressing wastewater based on online recycling[D]. Wuhan: Wuhan University of Technology, 2009: 33–34.
- [24] 欧阳魁. 臭氧法处理硫化矿选矿废水的新工艺及其机理研究[D]. 长沙: 中南大学, 2009: 36–39.
- OUYANG Kui. The new technology of treatment of ore dressing wastewater by ozone and its mechanism[D]. Changsha: Central South University, 2009: 36–39.
- [25] 汪文俊. 枯草芽孢杆菌对不同富营养化水体的净水作用[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(10): 1972–1974.
- WANG Wen-jun. Purification ability of *Bacillus subtilis* on eutrophic water[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2011, 50(10): 1972–1974.

(编辑 陈卫萍)