

普鲁兰和海藻酸钠包埋微生物用于污水处理的研究

乔长晟¹, 彭巧¹, 刘建波², 王羿超¹, 李雪³, 李坤荣¹

(1. 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

(2. 天津市地震局 天津 300457) (3. 天津北洋百川生物技术有限公司, 天津 300457)

摘要: 本研究利用混合固定化微生物技术, 结合海藻酸钠(SA)和普鲁兰多糖(Pu)两种生物多糖固定化微生物用于污水处理。本实验发现当普鲁兰多糖添加量为1%, 海藻酸钠添加量为7%时固定化颗粒的机械强度、弹性和扩散速率最佳。本研究利用三种能够产淀粉酶、蛋白酶和纤维素酶的微生物作为基础菌种, 分别对三种微生物进行固定化; 本研究对三种微生物在固定化过程中的种子液添加量进行了优化, 发现制备固定化颗粒的种子液添加量为200 mL时, 污水处理效果较好, 污水经过7天的处理TN去除率达65.94%, 水体中COD的去除率达77.88%。三种固定化颗粒经过复配后用于污水处理, 当固定化颗粒11008、11009和10004添加量分别为0.75%、0.50%和0.50%时, 连续处理污水7d后水体TN去除率高达90.55%, 水质COD的去除率高达91.45%。

关键词: 普鲁兰多糖; 海藻酸钠; 固定化; 污水处理

文章编号: 1673-9078(2015)2-173-178

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.2.029

Wastewater Treatment Using Microorganisms Entrapped in Sodium Alginate and Pullulan Immobilization Matrix

QIAO Chang-sheng¹, PENG Qiao¹, LIU Jian-bo², WANG Yi-chao¹, LI Xue³, LI Kun-rong¹

(1. Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China) (2. Earthquake Administration of Tianjin Municipality, Tianjin 300457, China)

(3. Tianjin Peiyang Biotrans Co., Ltd, Tianjin 300457, China)

Abstract: The aim of this study was to develop immobilized systems for wastewater treatment by immobilizing microorganisms in mixed matrices. Two bioactive polysaccharides, sodium alginate (SA) and pullulan (Pu), were used to immobilize microorganisms for wastewater treatment. The optimum mechanical strength, elasticity, and diffusion rate of the immobilized beads were obtained upon addition of 1% Pu polysaccharides and 7% SA. Three base strains of bacteria (which produce amylase, protease, and cellulase) were immobilized in SA or Pu matrices for wastewater treatment. The seeding quantity for microbial immobilization was optimized. A seeding quantity of 200 mL during the preparation of immobilized beads helped achieve efficient wastewater treatment. The total nitrogen (TN) and chemical oxygen demand (COD) removal rates observed during the end of a seven-day treatment period were 65.94% and 77.88%, respectively. Three types of immobilized beads were compounded for wastewater treatment. The immobilized beads 11008, 11009, and 10004 were added at concentrations of 0.75%, 0.50%, and 0.50% of the total volume of wastewater, respectively, and wastewater was treated for seven days continuously; the TN and COD removal rates under these conditions were observed to be up to 90.55% and 91.45%, respectively.

Key words: pullulan; sodium alginate; immobilization; wastewater treatment

中国环境状况公报披露, 2012年全国地表水国控断面总体为轻度污染。其中, 长江、黄河、珠江、松花江、淮河、海河、辽河、浙闽片河流、西南诸河和西北诸河等十大流域的国控断面中, IV~V类和劣V类水质的断面比例为31.1%; 黄河、松花江、淮河和辽河为轻度污染, 海河为中度污染。在监测的60个湖泊(水库)中, 富营养化状态的湖泊(水库)占25.0%, 其中, 列入国家重点治理范围的滇池依然属重度污染。污水主要有生活污水、工业废水和初期雨水, 污水主

收稿日期: 2014-05-28

要污染物为源污染物、好氧污染物、植物营养物和有毒污染物等。其中含有大量的蛋白类, 淀粉类和纤维素类污染物。污水对人类的生产生活产生了很大的影响, 虽然经过长期治理, 取得了较好的成果, 但污水处理仍然是我国一个急需处理的问题。生物固定化技术是现代生物工程领域中的一项新兴技术, 用于废水的生物处理具有生物浓度高、处理效率高、稳定性强、反应易于控制和保持微生物活性的特点^[1-5]。海藻酸钠(sodium alginate, SA)因具有价格低廉, 对细胞相对毒性小, 固定化成形方便, 传质性能好, 对微生物细

胞的富集程度高等特点,成为目前废水处理中应用最广的包埋剂之一^[6]。普鲁兰多糖(pullulan, Pu)是一种由出芽短梗霉发酵所产生的类似葡聚糖、黄原胶的胞外水溶性粘质多糖,又名短梗霉多糖、茁霉多糖;普鲁兰多糖是一种高分子多糖,作为絮凝剂,普鲁兰多糖特殊的吸附性及电化学性使其在有助凝剂的作用下进行分子架桥、吸附、絮凝与收缩沉淀。此特点使其可用作饮用水及生活、工业污水的净化剂,能够有效去除水中的悬浮物和COD^[7]。

本研究利用普鲁兰多糖的吸附、絮凝原理和海藻酸钠的固定化技术,以高产蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶的菌种作为污水处理的基础菌种,利用普鲁兰多糖和海藻酸钠固定化载体将菌种进行固定。本研究考察了普鲁兰多糖添加量,包埋载体海藻酸钠的浓度,种子液添加量对包埋颗粒的物理性质和污水处理效果的影响,确定了最佳的包埋条件,并对菌种复配情况和最佳的接种量做了研究。普鲁兰和海藻酸钠固定化微生物处理污水的方法大大提高微生物菌种对环境的耐受性,提高了微生物对污水的处理净化能力。本菌剂可以直接投加到污染水体中,操作简单,处理效果较好,且不会对水体形成二次污染,为水体污染净化提供了一种理论依据和技术支持。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种来源

由本实验室筛选和保存的产蛋白酶菌:11008号枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*; 产淀粉酶菌:11009号地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis*; 产纤维素酶菌:10004号巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium*; 培养基:蛋白胨 10 g/L,牛肉膏 5 g/L, NaCl 5 g/L 调 pH 7.2~7.4, 121 °C 灭菌 20 min。固体培养基,琼脂添加量为 2%。

1.1.2 黑臭水的配制

蛋白胨 5.0 g、牛肉膏 5.0 g、淀粉 4.0 g、NaCl 2.3 g、KCl 0.4 g、CaCl₂ 0.3 g、MgSO₄ 0.3 g、K₂HPO₄ 1.5 g、NaH₂PO₄ 1.5 g、尿素 1.5 g、柠檬酸铵 0.1 g、FeSO₄ 0.03 g 和 CuSO₄ 0.3 g 充分混匀加水至 10 L。放置七天后水开始变黑臭。

1.2 实验仪器

LGJ-125 冷冻干燥机,北京松源华兴科技发展有限公司; SU-1510 扫描式电子显微镜,日本日立公司; ML-1.5-4 紫外可见分光光度计,北京市永光明医疗仪器厂; YXQ-LS-50 立式压力蒸汽灭菌锅,上海博讯实

业有限公司医疗设备厂; BC/BD-256AZ2 摇床,合肥美菱股份有限公司; FE20 台式高速离心机,北京汇中顺成科技有限责任公司;

1.3 实验方法

1.3.1 微生物固定化颗粒的制备及污水处理实验

1.3.1.1 菌种培养及菌种富集

将斜面菌种接种于肉汤种子培养基,于 37 °C, 转速 200 r/min 培养 10 h。测定种子液的 OD₆₀₀。取一定体积种子液(OD₆₀₀ 为 1.7~1.9) 8000 r/min 离心 10 min, 倒出上清液后用生理盐水重悬。

1.3.1.2 菌种固定化颗粒的制备

配制一定浓度的固定化载体溶液 100 mL, 100 °C 灭菌 30 min, 当温度降至 30~40 °C 时, 与富集后的种子液充分混匀, 然后用 10 mL 无菌注射器挤入一定浓度的 CaCl₂ 溶液中成形, 在 4 °C 冰箱中交联 24 h, 用生理盐水冲洗 3 遍, 4 °C 冰箱中保存备用。

1.3.1.3 污水处理实验

以 1% (m/V) 固定化颗粒的添加量, 将固定化颗粒加入到添加 100 mL 自制的黑臭水的 500 mL 的挡板瓶中, 20 °C 100 r/min 摇床上处理 7 d; 期间, 每天取样测定污水处理的 TN 和 COD。

1.3.2 固定化颗粒物理性能的测定

1.3.2.1 机械强度的测定

用质构仪测定, 将待测样品置于测定平台上, 使用 TA41 柱形探头直径 6 mm~35 mm 长。设定测定条件: 选 TPA 测定类型, 触发值为 5 g, 下压速度 30 mm/min, 变形程度 50%。两次循环, 每次间隔 3 s。以恒定的速度和压力对样品进行压迫, 与其相连的控制器内特定的内置测定程序, 将传感器感应的探头压迫凝胶块, 整个过程中数据的变化输送至显示器上, 在显示的测定结果的统计表中, 可直接读出凝胶强度及弹性。

1.3.2.2 扩散速率测定

取大小相同的固定化颗粒浸没于惰性红墨水中, 分别在 5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min、35 min 取出, 先用游标卡尺测量颗粒的直径(D), 之后从正中间切开, 测量未变色部分的直径(d)。实际扩散距离为(D-d)/2。其中扩散距离越大说明其扩散速率越大。

1.3.2.3 活菌数测定

称取新鲜固定化颗粒 1.0 g, 分别于 0.2 mol/L 的柠檬酸钠溶液中, 定容至 10 mL, 以旋涡式振荡器充分振荡至颗粒完全溶解, 目的使菌体释放完全, 用稀释

平板法于 37 °C 培养 24 h, 菌落计数, 计算指标:

$$\text{单位质量颗粒活菌数(个/g)} = (\text{一定稀释度的活菌数} \times \text{稀释倍数} \times \text{菌液量}) / \text{颗粒重}^{[8]}$$

1.3.3 水质 TN 和 COD 测定

碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法测定水质的 TN, 重铬酸钾法测定水质的 COD^[9]。

1.3.4 数据分析

固定化微生物颗粒处理污水时, 固定化颗粒的机械强度和扩散速率越大越好, 这样有利于颗粒在湍急的水流中保持完整并较好的传质速率, 提高污水处理的效果。水体的检测指标 TN 和 COD, 其中两种指标越大说明其水体的污染情况越严重。污水处理过程中 TN 和 COD 的去除率越高说明固定化颗粒的污水处理效果越好。

2 结果与讨论

2.1 海藻酸钠添加量对固定化颗粒的影响

在交联剂 CaCl₂ 溶液浓度为 2%, 交联温度为 4 °C, 交联 pH 为 6~7 条件下, 考察不同海藻酸钠浓度 (5%、6%、7%、8%、9%), 对微球物理性质的影响, 确定固定化颗粒的最佳制备条件。图 1 和表 1 是所制备的固定化颗粒机械强度、弹性和扩散速率的结果。

表1 SA添加量对颗粒强度和弹性的影响

Table 1 Effect of the quantity of added SA on the mechanical strength and elasticity of immobilization beads

SA浓度	5%SA	6%SA	7%SA	8%SA	9%SA
强度/N	1.78	2.57	5.15	6.97	7.32
弹性	0.83	0.84	0.87	0.87	0.89

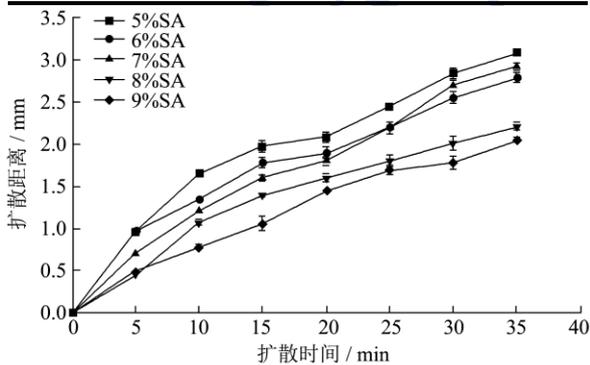


图1 SA添加量对颗粒扩散速率的影响

Fig.1 Effect of the quantity of added SA on the diffusion rate

从表1可以看出; 固定化颗粒随着加入的海藻酸钠的浓度, 机械强度随之增大, 其中9%SA固定化颗粒的强度最大。但是8%SA和9%SA固定化颗粒制作时颗粒拖尾严重, 颗粒的粘连度较大, 制作难度较大; 从图1可以看出固定化颗粒的扩散速率随着SA的浓度增加而

降低, 其中5%SA固定化颗粒的扩散速率最大, 6%SA固定化颗粒的扩散速率其次。综合固定化颗粒的机械强度和扩散速率, 选择7%SA为固定化的海藻酸钠的包埋浓度。

2.2 普鲁兰添加量对固定化颗粒的影响

以 7%SA 作为固定化的基础材料, 向其中添加普鲁兰多糖, 混合固定化微生物。在交联剂 CaCl₂ 溶液浓度为 2%, 交联温度为 4 °C, 交联 pH 为 6~7 条件下, 考察不同普鲁兰浓度 (0.5%、1%、1.5%、2%、2.5% 和 3%), 对微球物理性质的影响, 确定固定化颗粒的最佳制备条件。图 2 和表 2 是所制备的固定化颗粒机械强度、弹性和扩散速率的结果。

表2 不同Pu添加量对颗粒强度和弹性的影响

Table 2 Effect of the different quantities of added Pu on the mechanical strength and elasticity of the immobilization system

Pu浓度	0	0.5%Pu	1%Pu	1.5%Pu	2%Pu	2.5%Pu	3%Pu
强度/N	5.15	6.57	7.85	7.97	7.82	7.87	7.95
弹性	0.87	0.88	0.89	0.87	0.89	0.87	0.87

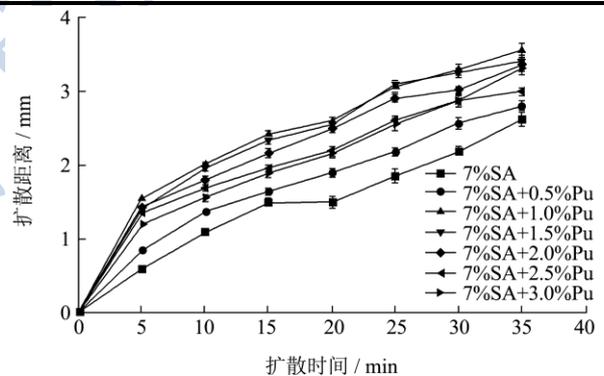


图2 不同Pu添加量对颗粒扩散速率的影响

Fig.2 Effect of the quantity of added Pu on the diffusion rate

从表 2 可以看出, 固定化颗粒加入 Pu 后的机械强度比 SA 单一材料固定化颗粒的强度大。其中 7%SA+1.5%Pu 混合固定化颗粒的强度最大; 7%SA+1%Pu 混合固定化颗粒的弹性最大。从图 2 可以看出固定化颗粒加入 Pu 的固定化颗粒的扩散速率比 SA 单一材料的大, 7%SA+1%Pu 固定化颗粒的扩散速率最大。综合固定化颗粒的机械强度和扩散速率, 选择 7%SA+1%Pu 为固定化菌种的包埋浓度。

2.3 制备固定化颗粒种子液的添加量对污水处理的影响

表3为制备菌种固定化颗粒时种子液的添加量对

污水处理效果的影响, 种子液经过离心收集后用蒸馏水重悬, 然后加入到普鲁兰多糖溶液中进行絮凝富集, 利用海藻酸钠为固定化材料进行包埋。以1% (m/V)的固定化颗粒添加量用于处理污水, 不同菌液添加量对污水处理效果不同; 从表3可以看出随着种子液添加量的增加TN和COD去除率逐渐增加, 且固定化颗粒的活菌数也在增加。但是当种子液添加量达200 mL后继续增

加种子液浓度的固定化颗粒处理污水的TN和COD去除率增加的并不明显, 并且固定化颗粒的活菌数也并未有太大的增加。于是确定用于制备固定化颗粒的种子液添加量为200 mL, 在此条件下污水处理TN去除率达65.94%, 水体中COD的去除率达77.85%, 所含的活菌数达 4.88×10^8 个/g。

表3 不同种子液添加量对TN和COD去除率的影响

Table 3 Effect of the quantity of added seeds on the TN and COD removal rates

实验号	1	2	3	4	5	6
种子液添加/mL	50	100	150	200	250	300
TN去除率/%	34.51	45.73	58.14	65.94	66.26	66.83
COD去除率/%	43.92	56.41	68.57	77.85	77.63	76.55
活菌数(个/g)	3.12×10^5	4.55×10^6	5.84×10^7	4.88×10^8	7.85×10^8	8.54×10^8

2.4 固定化颗粒菌种的生物复配

表4 11008不同添加量对TN和COD去除率的影响

Table 4 Effect of the quantity of added 11008 on the TN and COD removal rates

试验号	1	2	3	4	5
添加量(m/V)%	0.20	0.50	0.70	1.00	1.50
TN去除率/%	47.53	60.45	68.48	67.26	66.85
COD去除率/%	45.13	57.71	69.85	60.34	59.64

表5 11009不同添加量对TN和COD去除率的影响

Table 5 Effect of the quantity of added 11009 on the TN and COD removal rates

试验号	1	2	3	4	5
添加量(m/V)%	0.20	0.50	0.70	1.00	1.50
TN去除率/%	34.52	58.74	58.42	57.15	56.84
COD去除率/%	27.83	51.95	50.84	50.33	49.88

表6 10004不同添加量对TN和COD去除率的影响

Table 6 Effect of the quantity of added 10004 on the TN and COD removal rates

试验号	1	2	3	4	5
添加量(m/V)%	0.20	0.50	0.70	1.00	1.50
TN去除率/%	39.53	50.92	48.57	45.16	45.36
COD去除率/%	35.74	48.69	47.94	46.37	47.64

以上述实验确定的最佳固定化微生物的方法分别制备11008、11009和10004菌种的固定化颗粒。然后, 将三种颗粒分别以不同的添加量投加到污水中, 上污水摇床, 经过五天的处理, 测定不同固定化颗粒不同添加量对污水效果; 确定三种固定化颗粒处理污水的最佳添加量。从表4~6可以看出固定化颗粒的最佳添加量分别为11008号0.70%、11009号0.50%、10004号0.50%。

根据上述单因素实验结果利用正交法对菌种之间的添加量进行进一步优化。表7为菌种复配对污水处理的情况; 从表中可以明显的发现三种菌种的固定化颗粒都加入的污水处理效果比单一菌种固定化颗粒的效果好, 其中水质TN的去除率都达80%以上; 水体COD的去除率都达78%以上。菌种间最佳的添加量为: 11008、11009和10004号菌添加量分别为0.75%、0.50%和0.50%; 在此条件下水体TN去除率高达90.55%, 水质COD的去除率高达91.45%。

表7 正交实验对TN和COD去除率的影响

Table 7 Effect of the orthogonal experiment on the TN and COD removal rates

实验号	11008 /%	11009 /%	10004 /%	TN去除率/%	COD去除率/%
1	0.65	0.45	0.45	81.43	78.45
2	0.65	0.50	0.50	84.94	80.16
3	0.65	0.55	0.55	84.45	79.30
4	0.70	0.45	0.45	85.31	81.21
5	0.70	0.50	0.50	87.22	82.52
6	0.70	0.55	0.55	87.70	83.65
7	0.75	0.45	0.45	88.70	87.35
8	0.75	0.50	0.50	90.55	91.45
9	0.75	0.55	0.55	88.36	90.27

2.5 复配优化后污水处理效果

经过上述固定化条件的优化和菌种的复配, 以11008、11009和10004号菌固定化颗粒添加量分别为0.75%、0.5%和0.5%将颗粒加入到, 添加100 mL自制的黑臭水的500 mL的挡板瓶中, 20 °C 150 r/p摇床上处理7 d; 期间, 每天取样测定污水处理的TN和COD。图3和图4为测定的菌剂处理污水后水体的TN和COD变化

图。处理到第三天TN和COD的去除率都达77.24%以上；到第四天后水质TN和COD的减小就比较缓慢了，水样处理到第七天后水体TN去除率高达90.55%，水质COD的去除率高达91.45%，水质的TN为0.43 mg/L，COD为44.49 mg/L。水质均已经达到国家一级污水排放标准（COD<100 mg/L）。

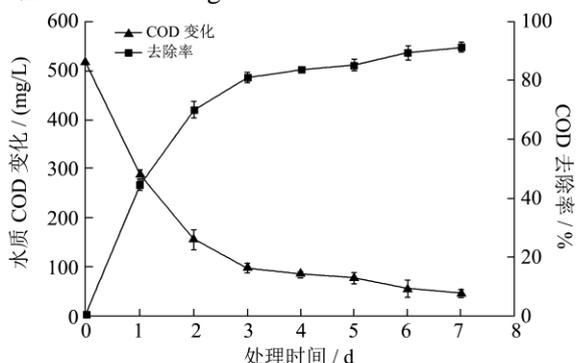


图3 优化后对水体COD去除率的影响

Fig.3 Effects of optimization on the water COD removal rate

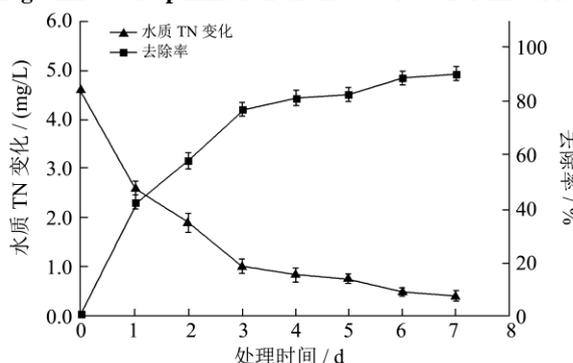


图4 优化后对水体TN去除率的影响

Fig.4 Effects of optimization on the water TN removal rate

2.6 固定化颗粒微观结构

利用海藻酸钠和普鲁兰多糖固定化微生物，并用蒸馏水反复冲洗，以除去游离微生物和其它杂质，然后置于冷冻干燥仪中脱水，干燥。并借助扫描电子显微镜(SEM)进行表面形态了观察，得图5中的SEM照片。图a是7%SA固定化微生物颗粒SEM放大到300倍的表面图像；图b是是7%SA固定化微生物颗粒SEM放大到5000倍的表面图像；图c和d是7%SA+1%Pu和7%SA+2%Pu固定化微生物颗粒SEM放大到5000倍的表面图像；从这些照片可见，7%SA载体的SEM照片a显示固定化微生物颗粒经过干燥后表面并非是光滑的而是凹凸不平的，其表面有许多不规则的颗粒状附着物，应该是载体上固定化微生物脱水后形成的，证实有大量的微生物固定于载体上；7%SA载体包埋微生物的颗粒b SEM照片在放大5000倍后显示其固定化颗粒表面较为平整，并且其表面或内部都附着或镶嵌着杆

状的菌体，进一步证明了SA载体能够有效的将微生物固定于载体中；海藻酸钠分子形成的载体结构远小于微生物的大小，能够有效的防止微生物菌种在污水处理过程中的流失。从图c和d可以看到有许多的小于菌体而大于SA载体的颗粒物质，可知是加入的Pu；图中显示普鲁兰多糖的分子比海藻酸钠的分子大，载体固定微生物时能够增加海藻酸钠包埋颗粒传质速率（也得出了图2包埋颗粒添加Pu的扩散情况的实验结果）；普鲁兰多糖和海藻酸钠混合固定微生物能有效的增加其在污水处理过程中的传质，加快了包埋颗粒的污水处理速度，提高了污水处理效果。

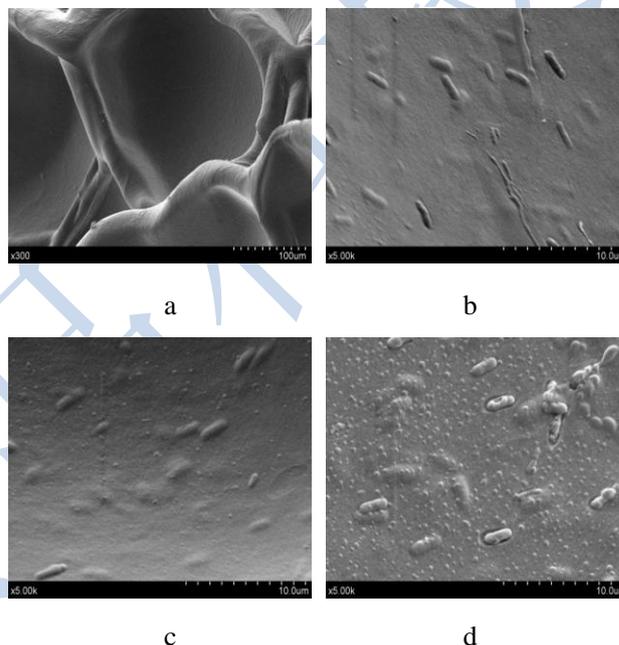


图5 包埋微生物颗粒SEM图

Fig.5 SEM images of the beads

注：a:7%SA、b:7%SA、c:7%SA+1%Pu和d:7%SA+2%包埋颗粒。

3 结论

本研究利用普鲁兰多糖的吸附、絮凝和海藻酸钠的固定化技术，以高产蛋白酶，淀粉酶和纤维素酶的菌种为污水处理的基础菌种利用普鲁兰多糖和海藻酸钠混合固定化微生物。经过试验研究发现普鲁兰多糖的最佳添加量为1%，包埋载体海藻酸钠的最好的添加量为7%，在这个条件下固定化颗粒的机械强度、弹性和扩散速率最好。并且对11008、11009和10004号菌进行了生物复配；其中菌种间的最佳添加量为：11008、11009和10004号菌添加量分别为0.75%、0.50%和0.50%；在此条件下水体TN去除率高达90.55%，水质COD的去除率高达91.45%；本研究对固定化颗粒的微观结构进行了观察，发现普鲁兰多糖和海藻酸钠混合

包埋为微生物能够有效的增加包埋颗粒的扩散速率, 加快固定化颗粒的污水处理速度, 提高污水处理效果。

参考文献

- [1] Ma F, Wei L, Wang L, et al. Isolation and identification of the sulphate-reducing bacteria strain H1 and its function for hydrolysed polyacrylamide degradation [J]. International Journal of Biotechnology, 2008, 10(1): 55-63
- [2] Wang Z, Ye Z, Zhang M, et al. Degradation of 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) by immobilized microorganism-biological filter [J]. Process Biochemistry, 2010, 45(6): 993-1001
- [3] Chen D Z, Fang J Y, Shao Q, et al. Biodegradation of tetrahydrofuran by pseudomonas oleovorans DT4 immobilized in calcium alginate beads impregnated with activated carbon fiber: mass transfer effect and continuous treatment [J]. Bioresource Technology, 2013, 139: 87-93
- [4] Yan F F, Wu C, Cheng Y Y, et al. Carbon nanotubes promote Cr (VI) reduction by alginate-immobilized Shewanella oneidensis MR-1 [J]. Biochemical Engineering Journal, 2013, 77: 183-189
- [5] Pakshirajan K, Kheria S. Continuous treatment of coloured industry wastewater using immobilized Phanerochaete chrysosporium in a rotating biological contactor reactor [J]. Journal of Environmental Management, 2012, 101: 118-123
- [6] 孙鸿,宋华,刘江红,等.微生物固定化降解含聚废水[J].环境化学,2013,32(3):419-424
- SUN Hong, SONG Hua, LIU Jiang-hong, et al. Degradation of poly-containing wastewater with immobilized microorganism [J]. Environmental Chemistry, 2013, 32(3):419-424
- [7] 孟少魁.普鲁兰发酵条件优化及其重金属絮凝研究[D].华中科技大学,2006
- MENG Shao-kui. Study on fermentation technics of pullulans and application in heavy metal removal [D]. Huazhong University of Science & Technology, Wuhan, 2006
- [8] 韩梅.大豆复合微生物肥料功能菌系的构建及包埋固定化研究[D].沈阳农业大学,2013
- HAN Mei. Studies on construction and immobilization of functional flora for compound microbial fertilizer in soybean [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2013
- [9] 水和废水监测分析方法[M].中国环境科学出版社,2002
- Water and wastewater monitoring analysis method [M]. Beijing: China Environmental Science Press, 2002