

团 体 标 准

T/CSES XXXX—XXXX

有机污染场地土壤生物修复技术规范 微生物
菌剂使用

Technical specifications for soil bioremediation at organic contaminated sites- Application of
microbial agents

征求意见稿

Draft for Soliciting Comments

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

20XX - XX - XX 发布

20XX - XX - XX 实施

中国环境科学学会 发布

目 次

前 言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 总体要求	2
5 微生物菌剂应用流程	2
6 微生物菌剂筛选	4
7 微生物菌剂应用设计	5
8 微生物菌剂工程施用	6
9 监测与评估	7
附 录 A（资料性）微生物菌剂应用设计与过程监测环境参数	9

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由清华大学提出。

本文件由中国环境科学学会归口。

本文件起草单位：清华大学、北京建筑大学、中国科学院微生物研究所、上海康恒环境修复有限公司、清华苏州环境创新研究院。

本文件主要起草人：王慧、高大文、李德峰、王欢、韩建均、林子雨、张作涛、龚小强、王镝翔、李明。

有机污染场地土壤生物修复技术规范 微生物菌剂使用

1 范围

本文件规定了有机污染场地土壤生物修复微生物菌剂使用的总体要求、应用流程、微生物菌剂筛选、应用设计、工程施用、监测与过程控制等技术要求。

本文件适用于芳烃类污染和多环芳烃、石油烃复合污染等有机污染场地土壤生物修复中的微生物菌剂使用。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

- GB 18597 危险废物贮存污染控制标准
- GB 36600 土壤环境质量建设用地土壤污染风险管控标准（试行）
- HJ 25.1 建设用地土壤污染状况调查技术导则
- HJ 25.2 建设用地土壤污染风险管控和修复监测技术导则
- HJ 25.3 建设用地土壤污染风险评估技术导则
- HJ 25.4 建设用地土壤修复技术导则
- HJ 25.5 污染地块风险管控与土壤修复效果评估技术导则
- HJ/T 415 环保用微生物菌剂环境安全评价导则
- HJ 805 土壤和沉积物 多环芳烃的测定 气相色谱-质谱法
- HJ 1283 污染土壤修复工程技术规范生物堆
- HJ 2035 固体废物处理处置工程技术导则
- ISO 16703 土壤中石油烃（C10~C40）含量的测定 气相色谱法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

总石油烃 total petroleum hydrocarbon, TPH

在原油中发现的含有碳氢化合物组成的混合物，由是多种烃类(正烷烃、支链烷烃、环烷烃、芳烃)和少量其他有机物，如硫化物、氮化物、环烷酸类等组成的混合物。

3.2

芳烃 aromatic hydrocarbon

芳烃(具有芳香性的烃,一般指分子中含有苯环的化合物)包括苯系物和多环芳烃,其中苯,甲苯,乙苯以及二甲苯等统称为苯系物,由两个或两个以上苯环以两个邻位碳原子(即一边)相连形成的化合物统称为多环芳烃。

3.3

微生物菌剂 microbial agents

目标微生物(有效功能菌)经过筛选扩培制备后制成的活菌制剂。这种菌剂在适宜环境条件下通过自身生长代谢活动以及其它辅助菌种或载体协同作用下,使场地环境中有机污染物降解成为低分子化合物或完全分解为二氧化碳和水。

3.3.1

外源微生物菌剂 exogenous microbial agent

由一种或多种从非本土污染环境,通过人工选育所获得的微生物菌种(株),经过加工制成活菌制剂,可直接应用于适当环境条件下的土壤生物修复。

3.3.2

土著微生物菌剂 indigenous microbial agent

由一种或多种从受污染土壤本土环境中原位分离纯化,通过人工选育所获得的微生物菌种(株),经过加工制成活菌制品菌剂,能在适宜环境条件下通过自身生长代谢活动以及其它辅助菌种或载体协同作用下使场地环境中有机污染物降解成为低分子化合物或完全分解为二氧化碳和水。

3.4

菌剂有效性评价 effectiveness evaluation of agents

对微生物菌剂进行分析、测定和评估其去除土壤污染物的能力、环境适应能力、环境安全性、稳定性,包括菌剂产品应用后对土壤目标污染物降解的功效,在土壤中的繁殖能力、恢复土壤性状等。

3.5

辅助药剂 adjuvant

满足土壤降解菌的需要,提高土壤微生物代谢活性,进而提高修复效率的药剂。包括提高污染物溶解度的助溶剂,提高微生物活性的营养物、电子受体以及共代谢基质等,利于微生物附着生长的载体物质以及调节土壤性质的调理剂等。

4 总体要求

4.1 微生物菌剂的应用应按照国家相关标准规范进行,遵循绿色低碳、因地制宜与系统治理原则和绿色可持续修复理念,具备可行性、有效性和工程适用性,实现减污降碳协同增效。

4.2 微生物菌剂的选择、制备和应用方式应根据场地污染特征、修复目标值、生物地球化学条件、水文地质条件、现场试验结果等因素确定。

4.3 应对微生物菌剂应用过程中所产生的废气、废水、固体废物及其他污染物进行治理,并达到国家、地方和相关行业排放标准要求。

4.4 微生物菌剂环境安全评价应符合 HJ/T415 的规定。

4.5 应在微生物菌剂投加部位就近建立独立的菌剂存储区,在区域内明显的位置张贴警示标志、微生物菌剂用途和注意事项等说明,并设置专人管理。

5 微生物菌剂应用流程

5.1 应用构成

5.1.1 微生物菌剂的应用过程包括：微生物菌剂筛选、应用设计和工程施用。

5.1.2 微生物菌剂筛选包括外源微生物菌剂筛选和土著微生物菌剂的筛选、菌剂的鉴定、菌剂的安全性评价。菌剂的筛选、评价应通过小试和中试实验验证菌剂施用可行性和污染物降解有效性。

5.1.3 应用设计包括微生物菌剂的扩大培养、辅助药剂选择和工程参数设计。

5.1.4 微生物菌剂可通过原位注入、浅层搅拌、生物堆、生物泥浆反应、生物耕作等原位或异位修复技术，进行工程施用。

5.2 应用流程

有机污染场地土壤微生物菌剂应用修复流程如图1所示。根据污染场地特征进行微生物菌剂筛选，并完成安全性评价。筛选出的微生物菌剂进行扩培，并选择相匹配的辅助药剂，通过现场模拟小试和中试试验完成工程参数设计，随后进行工程施用。若污染物修复达到设计目标，则达到要求并停机，若修复不合格，则继续进行工程施用，继续修复直至合格。

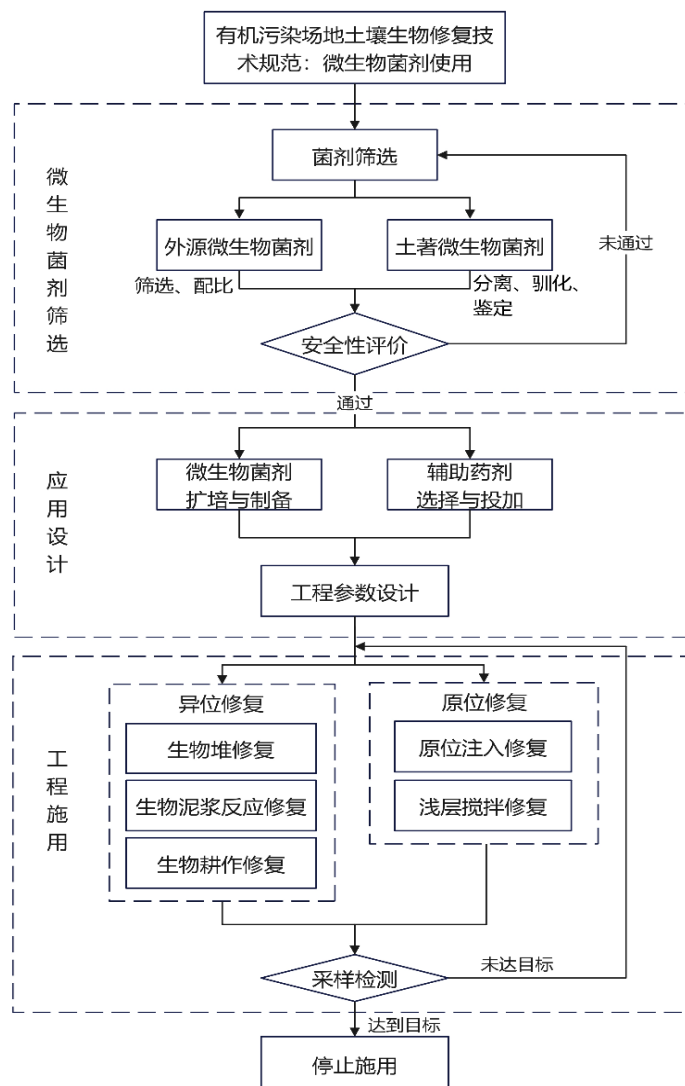


图1 微生物菌剂应用流程图

6 微生物菌剂筛选

6.1 外源微生物菌剂筛选

6.1.1 选择市售外源微生物菌剂应符合产品出厂指标，且应具备相关完整资料，应明确菌剂中所有微生物的属及种的学名、形态、理化特征和安全性评价等完整资料。

6.1.2 外源微生物菌剂应能具有将土壤中目标污染物有效降解能力，并不产生对土壤生态有毒害作用的中间代谢产物。

6.1.3 外源微生物菌剂的筛选需通过实验室液体培养基降解实验或模拟土壤试验评估其降解目标污染物能力，明确污染物降解速率或达到修复目标所需要的时间、菌剂最适宜添加量、营养物添加范围等修复参数。

6.2 土著微生物菌剂筛选

6.2.1 可采用助溶剂辅助配置疏水性污染物溶液用于筛选和驯化优势菌，避免芳烃类污染物在水中的溶解度低和对微生物细胞有毒性的影响。

6.2.2 对于单一降解菌筛选，可从受有机污染的场地中采集土壤样品，好氧降解菌从表层土壤中筛选，兼性或厌氧降解菌从深层土壤中筛选，以目标污染物为唯一碳源，在接近场地实际环境条件下进行培养、分离和纯化。

6.2.3 对于混合降解菌筛选，可采用多个单一降解菌经复配实验，获得最优菌群组成和菌株配比。可参照 6.2.2 的方法从受有机污染的场地土壤中通过富集获得。

6.3 微生物菌剂鉴定及保藏

6.3.1 微生物菌剂宜通过形态学（包括菌落形态、菌丝形态、芽胞形态等特征）、生理生化（包括糖发酵试验、氧化发酵试验、酶活性测定等）以及分子生物学（包括包括 16S rRNA 基因测序以及 DNA 指纹图谱分析等）等测定方法来确定其分类。

6.3.2 微生物菌剂的保藏应根据菌剂特性选择适当的保藏方法和条件，如低温，干燥以及缺氧等。

6.4 微生物菌剂产品要求

降解微生物菌剂产品宜符合表1的要求。

表 1 产品要求

项目	菌剂类型	
	液体	固体
有效活菌数 (cells) / (亿/g 或亿/L)	≥1.0	≥1.0
霉菌杂菌数/ (个/g 或个/mL)	≤3.0×10 ⁶	≤3.0×10 ⁶
杂菌率/ (%)	≤10	≤30
水分/ (%)	—	≤20.0
细度/ (%)	—	≥80
生长 pH	5.0~8.0	5.0~8.0
活菌的有效期/月	≥3	≥6
芳烃、石油烃去除率 (%)	实验室评估条件下，1 个月内对目标污染物降解率达到 50%以上降解速率可接受；修复周期内场地污染土壤修复达标。	

7 微生物菌剂应用设计

7.1 微生物菌剂扩培与制备

7.1.1 菌剂接种量应根据菌种特性确定，扩培过程中每次放大比例宜为已有菌液量的 10 倍~20 倍，扩培倍数过低，不能满足生产需求，扩培倍数过高，可能导致菌株老化，影响产品质量。若修复过程需要菌剂量较大，可进行多次放大培养。

7.1.2 菌剂的放大培养所需培养基应根据菌剂的生理特性，选择适宜的营养成分和配方（包括碳源，氮源以及维生素等），同时需保证培养基营养丰富和均衡、物理性质稳定。

7.1.3 菌剂扩培所需温度、湿度、pH 值、溶氧量等环境因素可通过小试实验确定，菌剂扩培过程中应通过实时监测和调控，保持适宜的培养条件，促进菌株的生长。

7.1.4 菌剂的制备过程中可采用溶解性弱酸、弱碱调节 pH，控制 pH 值稳定在 6~9 范围内，同时需根据修复要求和菌种特性，选择适宜的制备方法和工艺流程。

7.1.5 菌剂扩培后微生物浓度应达到 10^9 CFU/L 以上，生长周期控制在 5~10 天，同时应保证修复菌种为优势菌，同时根据需要提供适量的添加剂和保护剂，提高菌剂的性能和使用效果。

7.1.6 液体微生物菌剂也可通过负载到固体载体上制备成固体菌剂。载体应选择具有良好物理化学稳定性、孔隙率高、比表面积大、生物相容性好且价格低廉的载体。常用的载体材料包括生物炭、花生壳、玉米芯、海藻酸钠、卡拉胶、壳聚糖等。

7.1.7 将液体微生物菌剂固定在载体上时，菌剂接种量、培养条件、营养条件可参照 7.1.3 的方法确定，固体菌剂上微生物负载量应不低于 10^9 CFU/kg。

7.2 辅助药剂选择与投加

7.2.1 营养物药剂选择与投加

7.2.1.1 应根据污染土壤中成分组成，选择添加营养物药剂，营养物药剂包括氮、磷和其他细胞生长所必需的营养物质，宜将修复土壤的 C:N:P 摩尔比控制在 100:10:1~100:5:1 范围内。

7.2.1.2 营养物药剂可在修复开始时和修复过程中根据需要适时添加。

7.2.1.3 添加方式可采用直接添加法（修复开始时直接添加营养药剂）、循环添加法（修复周期内周期性的添加一定量的营养药剂）以及控制释放法（通过控制营养药剂的释放速率，使其在一定时间内缓慢释放）等。

7.2.1.4 营养物药剂投加所采用的设备包括注射泵，管道输送系统，喷雾器或喷雾装置以及滴灌系统等。

7.2.2 表面活性剂选择与投加

7.2.2.1 表面活性剂选择可通过小试和中试实验，确定最优使用的表面活性剂的类型

7.2.2.2 在同等促进效果条件下，应优先选择生物合成表面活性剂，添加量推荐为 0.1%-1%。

7.2.2.3 投加方式可选用 7.2.1 的直接添加法和循环添加法，投加设备与 7.2.1 相同。

7.2.3 电子受体和共代谢药剂选择

7.2.3.1 对于浅层土壤的污染物降解，可通过平整，翻刨以及犁作等方式促进生物修复；对于深层土壤的污染物降解，当其缺乏电子受体时，可通过添加氧气或硝酸盐等促进生物修复，其中氧气可通过自然通风（适用于土壤孔隙度较高、渗透性较好的情况），人工钻井的方式向土壤注入空气。

7.2.3.2 对石油烃/芳烃污染土壤进行生物修复，当石油烃/芳烃浓度过高且降解菌含量较低导致降解速率缓慢时，可加入表 2 中相应的小分子酸、小分子醇、小分子糖以及特定氨基酸等作为共代谢基质，共代谢基质加入的量根据土壤的污染状况可通过小试和中试实验确定。

表 2 土壤原位生物修复工程中常用的添加剂

生物降解类型	典型污染物	典型的添加剂
好氧氧化	石油烃；芳烃	空气，氧气，双氧水，二氧化镁(氧化剂)，麦秸以及啤酒厂残渣等有机营养，磷酸盐，铵盐以及钾盐等
厌氧氧化	石油烃；芳烃	硝酸盐，碳酸盐，麦秸以及啤酒厂残渣等有机营养，磷酸盐，铵盐以及钾盐等
共代谢氧化	石油烃；芳烃	乙酸盐，丙酸盐，柠檬酸盐，苹果酸盐，葡萄糖，木糖，甘露醇，甲醇，谷氨酸，异亮氨酸，甲硫氨酸，色氨酸，苯甲酸盐，香芹酮，二戊烯以及甲基异丙苯等

7.3 微生物菌剂应用工程参数设计

7.3.1 微生物菌剂应用应收集土壤孔隙度、湿度、渗透系数、有机质含量、电子受体/供体含量和土著微生物群落组成等相关信息和资料，需要收集的设计资料参见附录 A.1。

7.3.2 工程施用前可参照 HJ25.4 选择原位或异位修复模式。在使用微生物菌剂进行原位修复时，建议场地土壤条件满足渗透系数 $>6.0 \times 10^{-4}$ cm/s、石油烃浓度 $<5\%$ ；石油烃浓度 $>5\%$ 时建议采用异位修复。对应原位或异位修复菌剂可有效降解目标污染物时的营养条件和环境理化条件即为工程施用时应满足的基本参数。

7.3.3 现场进行小试模拟或中试试验，在加入菌剂后，可考虑补充生物菌剂投加和营养物投加，定期对主要目标污染物的降解效率进行监测，取降解效率最好的实验组菌剂及辅助药剂配置，作为工程施用时的目标参数。

7.3.4 菌剂原位应用可通过设定不同梯度值或不同种类进行单因素试验，取污染物有效降解的实验组确定土壤修复区域应满足的温度、pH、盐度、氮源、磷源等参数。

7.3.5 菌剂异位应用可通过正交或单因素试验确定修复装置应满足的温度、菌剂浓度、含水率、有机质含量、通风频率等参数。

7.3.6 由多种降解菌或以结合其它本土功能菌株（土壤改良菌、产表面活性剂菌）的形式应用于污染土壤，根据配伍菌群的污染物降解率调整营养物投加配比和环境条件参数。

8 微生物菌剂工程施工用

8.1 一般规定

8.1.1 在适宜微生物生长和有效降解污染物的工程参数条件下，菌剂培养液与水按照质量比 1: 50 配置菌剂溶液并添加辅助药剂。

8.1.2 若有机污染浓度超过一个月保持不变且未有修复效果，则需对其进行进一步投加营养物质或外源菌剂进行驯化（按照碳氮磷 100:10:1 少量多次投加），直至生物修复终止。

8.1.3 施用方式的选择应根据修复土壤有机污染浓度和空间分布等信息确定，可选择浅层搅拌、原位注入、异位修复等修复方式。

8.2 菌剂修复原位应用

8.2.1 浅层搅拌修复

8.2.1.1 浅层搅拌修复可采用表面喷淋法进行菌剂施用投加。修复前需进行土壤预处理，对修复区土壤进行人工或机械混匀，尽可能打碎其中的土块，去除大石块。

8.2.1.2 表面喷淋法投加应将菌剂用喷雾器均匀地接入修复区土壤中，根据原土中营养成分和培养基成分比例，调节场地中营养元素。可利用场地地下水调节土壤含水率在 20%左右。单位面积的喷淋量根据菌剂的渗入情况确定，保证土壤表面无大面积积水或菌液外流。

8.2.1.3 喷洒后修复土壤中有效活菌数应不低于 10^7 CFU/kg，此时可根据修复效果只添加外源营养物质；若有效活菌数低于 10^7 CFU/kg，应同时添加营养物质与外源降解微生物，有效活菌数的监测频率不低于每周一次。

8.2.1.4 修复过程中保持土壤相对湿度为 40%~60%，定期对土壤进行搅拌、喷施营养剂。

8.2.2 原位注入修复

8.2.2.1 原位注入修复可采用注入井泵送法进行菌剂施用投加。

8.2.2.2 可根据渗透系数、修复时间需求确定布设的注入井间距，同时应计算水泵参数。

8.2.2.3 应持续施用菌剂，保持土壤中有效活菌数，保证菌剂所处环境一直处于优势菌，直至修复达标，监测频率不低于每周一次。

8.3 菌剂修复异位应用

8.3.1 根据场地条件、修复工期、土壤污染特征等综合判断确定生物堆、生物泥浆反应或生物耕作等修复方式。

8.3.2 生物堆菌剂施用和修复过程应参照 HJ 1283 执行。

8.3.3 生物堆堆体可定期补水，堆体土壤中有效活菌数需控制不低于 10^7 CFU/kg，每月监测 1~2 次堆体降解微生物数量，确保微生物群落稳定。

8.3.4 生物泥浆反应修复时，可直接向进药装置投加微生物菌剂及辅助药剂，在泥浆搅拌和堆置反应期间应监测反应温度、pH、含氧量、菌剂微生物密度等，确保菌剂处于有效反应环境。

8.3.5 生物耕作修复时，可通过工程机械将微生物菌剂和污染土壤拌匀，应定期进行翻抛。

9 监测与评估

9.1 工艺参数监测

微生物菌剂施用过程中，应对土壤的生物地球化学指标、细菌总数等菌剂应用相关工艺参数进行监测，分析微生物生长和修复情况。检测项目、分析方法、监测频率见表 3。

表 3 监测项目和分析方法

序号	监测项目	监测频率	分析方法	引用标准
1	异养菌总数	根据修复周期平均分 5次测量	平板计数法	GB17378.7
2	功能微生物总数	根据修复周期平均分 5次测量	Q-PCR法	——
3	pH	≥2 次/周	pH 计	——
4	溶解氧	≥2 次/周	荧光法	——
5	有机碳含量	≥2 次/月	燃烧氧化法	HJ 695
6	全氮	≥2 次/月	凯式法	HJ 717
7	氨氮，亚硝氮，硝氮	≥2 次/月	分光光度法	HJ 634

序号	监测项目	监测频率	分析方法	引用标准
8	总磷	≥2 次/月	抗分光光度法	HJ 632
9	含水率	≥2 次/周	烘干法	GB7172

9.2 环境监测及二次污染防治

9.2.1 微生物菌剂修复过程中环境管理与二次污染防治措施应参照 HJ 25.4。

9.2.2 应对修复过程中的废水、废气排放口进行布点监测，监测布点和监测指标参照 HJ 25.2 执行。

9.2.3 在修复过程中，应定期采用便携式分析仪器设备监测分析修复区及场界周边空气中的挥发性有机物。

9.3 微生物菌剂效果评估

9.3.1 微生物菌剂施用过程中，应至少每周 1 次采集土壤样品，分析目标污染物浓度和次生代谢产物，评估污染物降解趋势和微生物菌剂修复效果。

9.3.2 微生物菌剂施用后，应对土壤理化性质（包括土壤质地、孔隙度、有机质含量、养分含量等）、土壤微生物群落的数量和多样性进行评估，具体参数见附录 A.2。

附 录 A
(资料性)

微生物菌剂应用设计与过程监测环境参数

表 A.1 微生物菌剂应用设计涉及的环境参数

参数	相关测量方法	单位	说明
土壤含水率	烘干法	%	在饱和持水度 80-90%范围内
菌剂微生物浓度	Q-PCR 法	%	菌剂微生物浓度达到 10^9 CFU/L 以上
温度	温度计	°C	用于菌剂工程参数设计单因素试验
pH、	pH 计	/	
氮源	分光光度法	mg/L	
磷源	过硫酸钾氧化法	mg/L	
溶解氧	碘量法	mg/L	
土壤渗透系数	含水层测试; 渗透测试	土壤水的重量占其 干土重的百分数 (%)	芳烃类降解菌剂的应用方式(原位或异位)可根据土壤的渗透系数确定,土壤渗透系数 $>6.0 \times 10^{-4}$ cm/s 时,适合进行原位修复
土壤有机质含量	燃烧法	重量百分数	确定污染物可能吸附到土壤的程度,为生物降解反应提供碳源
生物群落组成	高通量测序	/	用于判断菌剂扩培中功能菌株是否为优势菌

表 A.2 菌剂应用过程监测涉及的环境参数

参数	相关测量方法	单位	说明
土壤有机质含量	燃烧法	重量百分数	确定污染物可能吸附到土壤的程度,为生物降解反应提供碳源
有机污染物浓度	气相色谱-质谱法	mg/kg	菌剂作用效果、污染物降解效果评估
氧气含量	荧光法、电极法	mg/L	用于微生物菌剂和助剂配方调整、工艺效果调试
生物群落组成	高通量测序	/	用于判断菌剂工程应用中功能菌株是否为优势菌
微生物活性	吸氧速率分析; 使脱氢活性分析	在一定时间内消耗的氧气量	指示土壤环境条件是否有利于生物修复