

团 体 标 准

T/CSES XXXX—XXXX

有机污染场地土壤生物修复技术规范 漆酶制剂使用

Technical specifications for soil bioremediation at organics contaminated sites

-Use of laccase reagent

（征求意见稿）

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国生物工程学会 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 漆酶制剂选择 3

6 漆酶制剂施用 3

6.1 一般规定 3

6.2 原位修复 3

6.3 异位修复 4

7 运行与效果监测 5

附 录 A （规范性）漆酶活力测试方法6

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。

本文件由北京建筑大学、诺维信(中国)投资有限公司、南开大学、上海康恒环境股份有限公司和浙江科峰生物技术有限公司共同提出。

本文件由中国生物工程学会归口。

本文件起草单位：北京建筑大学、诺维信(中国)投资有限公司、南开大学、上海康恒环境股份有限公司和浙江科峰生物技术有限公司。

本文件主要起草人：高大文、王立涛、赖伟坚、邱华、梁红、刘维涛、王欢、胡佳晨、章亭洲。

有机污染场地土壤生物修复技术规范 漆酶制剂使用

1 范围

本文件规定了有机污染场地土壤生物修复中漆酶制剂使用的总体要求、漆酶制剂选择、酶制剂施用、运行与效果管理。

本文件适用于有机污染场地土壤生物修复的漆酶制剂的使用。

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 15618	土壤环境质量农用地土壤污染风险管控标准（试行）
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 25.5	污染地块风险管控与土壤修复效果评估技术导则
HJ/T 166	土壤环境监测技术规范
HJ/T 415	环保用微生物菌剂环境安全评价导则
HJ 682	建设用地土壤污染风险管控和修复术语
HJ 1283	污染土壤修复工程技术规范生物堆
QB/T 1803	工业酶制剂通用试验方法
QB/T 1804	工业酶制剂通用检验规则和标志、包装、运输、贮存

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

有机污染场地 organics contaminated site

因从事生产、经营、处理、贮存、使用有毒有害的有机物质，以及堆放或处理处置潜在的有机危险废物等活动造成污染，经过调查和风险评估后，确认有机污染危害超过人体健康或生态环境可接受风险水平的场地。

3.2

酶制剂 enzymic preparation

由微生物发酵并经过分离提取等加工工艺获得的具有催化活性的生物制品。

3.3

酶活力 enzyme activity

酶催化转化底物生成产物的能力。在30℃，pH为5.0条件下，1个酶活力单位（U）相当于使1微摩尔2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐（ABTS）底物在1分钟内被酶催化转化为产物所需的酶量。酶活力测试方法见附录A。

3.4

表面喷淋法 surface spraying method

将漆酶制剂喷淋至土壤表面，利用酶的催化氧化等作用将有机污染物去除的修复工艺。

3.5

生物堆 bio-piling

将污染土壤挖出并按一定要求堆积于装有渗滤液收集系统的防渗区域，提供适量的水分和氧气，并采用强制通风系统注入空气（补充氧气），利用土壤微生物将有机污染物去除的修复工艺。

[来源：HJ 1283-2023，3.1]

3.6

修复效果评估监测 appraisal monitoring of remedial performance

在地块修复工程完成后，考核和评价地块是否达到已确定的修复目标及工程设计所提出的相关要求。

3.7

回顾性评估监测 retrospective assessment monitoring

在修复效果评估后，特定时间范围内，为评价治理修复后地块对土壤、地下水、地表水及环境空气的环境影响所进行的监测，同时也包括针对地块长期原位治理修复工程措施效果开展的验证性监测。

4 总体要求

4.1 修复工程应因地制宜、科学合理地选择安全、有效的漆酶制剂，施用设施建设及运行过程应符合修复设计与实施方案的要求。

4.2 修复后土壤有机污染物含量应符合修复目标值要求。

4.3 漆酶制剂应具有环境安全性，环境安全评价应符合 HJ/T 415 的规定。

4.4 所选择漆酶制剂的酶固定化材料宜具有生物降解性，对土壤环境无二次污染风险。

4.5 施用过程中应采取必要的污染防治措施，所产生的废气、废水、废液以及固体废物应合理收集、妥善处理，防止生态环境污染。

4.6 如场地同时含重金属污染时，需要考虑重金属对有机污染物生物降解的影响，应经小试或中试确认污染土壤能够满足漆酶制剂使用的适用性与参数。

5 漆酶制剂选择

5.1 修复所用漆酶制剂应根据场地环境、土壤特征、污染物种类、修复方式、施用方法等确定。可选择液体漆酶制剂、固体漆酶制剂、固定化漆酶制剂。

5.2 所选择的漆酶制剂的性能宜符合表 1 的要求。

表1 漆酶制剂性能要求

项目	液体漆酶制剂	固体漆酶制剂	固定化漆酶制剂
酶活	≥1.5 U/mL 产品	≥3 U/g 产品	≥0.03 U/g 产品
外观	无明显悬浮物或者沉淀，无异味	色泽均匀的颗粒或粉末，无结块，无潮解，无异味	色泽均匀的颗粒或粉末，无结块，无异味

6 漆酶制剂施用

6.1 一般规定

- 6.1.1 漆酶制剂修复适用于红土、粘土等低腐殖质土壤，不适用于高腐殖质含量的土壤。
- 6.1.2 浅表层污染土壤（≤1m）宜采用原位修复，深层污染土壤（>1m）宜采用异位修复。
- 6.1.3 技术参数宜采用小试或中试方法确定。
- 6.1.4 漆酶制剂宜与反应介体配合适用，如 1-羟基苯并三唑（HBT）。
- 6.1.5 漆酶制剂宜在好氧环境、偏酸性（pH 4~6）土壤中使用，并在修复过程中宜保持目标土壤持水量在其饱和持水度的 90%左右。
- 6.1.6 漆酶制剂用量应根据实际污染土壤土方量、土壤污染程度、漆酶制剂的浓度确定。液体漆酶制剂（≥1.5 U/mL 产品）稀释倍数至少 5 倍，固体漆酶制剂（≥3 U/g 产品）溶解后稀释倍数至少 10 倍，固定化漆酶制剂（≥0.03 U/g 产品）投加量不低于土方量的 1%。
- 6.1.7 漆酶制剂宜均匀投加至目标修复土壤。漆酶制剂宜一次性投加使用，若污染场地未达到修复效果或污染物浓度出现反弹，需进行漆酶制剂补加。
- 6.1.8 使用过程中，应避免在开放环境中剧烈搅拌，以避免酶的泄露；在稀释酶产品及投加过程中，操作人员应佩戴好口罩、护目镜等个人防护用品。

6.2 原位修复

- 6.2.1 原位修复宜采用土壤耕作法。
- 6.2.2 在利用表面喷淋漆酶制剂进行修复前，宜基于前期场地调查确定污染浓度和空间分布等信息，根据污染物风险评估确定修复目标和区域。并通过试验确定漆酶制剂处理效果和投加量等设计参数。

6.2.3 漆酶制剂施用过程应符合以下规定：

- a) 目标区域土壤预处理，施用前应对污染场地土壤进行人工或机械破碎，尽可能打碎其中的土块，并去除大石块及其他杂物；
- b) 宜根据污染土壤理化性质调节土壤酸碱度、含水量等，酸碱度宜为 pH 4~6，土壤饱和持水度 90% 左右；
- c) 液体漆酶制剂及可溶解或可均匀分散的固体漆酶制剂用于原位修复时，宜采用表面喷淋漆酶制剂；
- d) 若使用配方中含有固体介体、表面活性剂等辅助药剂且采用喷淋方式时，应先将其溶解后，再与液态漆酶制剂或溶解后的固体漆酶制剂在现场混合后施用，单位面积的漆酶制剂喷淋量应根据漆酶制剂的渗入情况确定，以保证土壤表面无大面积积水或漆酶制剂外露为准；
- e) 修复过程中宜保持目标土壤的持水度在其饱和持水度的 90% 左右，并定期对土壤进行喷施补水和翻耕通风。

6.3 异位修复

6.3.1 异位修复宜采用生物堆法。

6.3.2 在利用生物堆法进行修复前，宜进行小试及中试，对其适用性和效果进行评估并获取相关修复工程设计参数，测试参数包括：土壤中污染物初始浓度、土壤酸碱度、土壤含水率、渗透系数、重金属含量以及漆酶制剂处理效果和投加量等。

6.3.3 漆酶制剂施用过程应符合以下规定：

- a) 目标区域土壤预处理，施用前应对挖掘后的污染土壤进行适当预处理，预处理系统包括筛分、破碎与混合调理等设施以及废气收集处理设施；
- b) 不可均匀分散至水相的固体漆酶制剂及固定化漆酶制剂用于异位生物堆修复时，宜采用将固体漆酶制剂及固定化漆酶制剂与污染土壤充分混合后建设堆体；
- c) 若使用配方中含有固体介体、表面活性剂等固体药剂且采用喷淋方式时，应先将其溶解后，再与液态漆酶制剂或溶解后的固体漆酶制剂在现场混合后施用；与不可均匀分散至水相的固体漆酶制剂及固定化漆酶制剂一起使用时，可将其与漆酶制剂、污染土壤直接混合建设堆体；
- d) 单个生物堆堆体尺寸与建设规模应综合考虑总体修复土方量、项目工期、单批次土壤修复周期、场地条件、共用设施（如道路、电力燃气、抽气与水分营养调理系统等）的一次性投资等确定；
- e) 为保证施工的可行性及通气效率，单个堆体宽度不宜超过 10m，高度宜控制在 2m~3m，堆体边坡坡度宜控制在 1:1~1:1.5 以保证稳定性。生物堆堆体建设应符合 HJ 1283 的规定；
- f) 堆体与抽气系统的砂砾石导气层之间应设置一层土工布，防止土壤颗粒进入导气层堵塞抽气支管；

g) 使用修复一体机，在尾部增加喷淋装置，可满足固、液两相药剂的添加混合。将漆酶制剂与污染土壤混合均匀后，堆积形成堆体。在堆体顶部铺设喷淋装置（与堆外的调配系统连接）以及进气口，采用防雨膜进行覆盖；

h) 采用抽气系统使新鲜空气通过顶部进气口进入堆内，并维持堆内土壤中氧气含量在一定浓度水平。

7 运行与效果监测

7.1 运行过程中需对抽气风机、管道阀门进行维护。为避免二次污染，应对尾气处理设施的效果进行监测，以便及时采取应对措施。

7.2 运行过程宜定期对土壤酸碱度、氧气含量、含水率、污染物浓度等指标进行监测，确保漆酶制剂处于最佳的催化环境。定期采集堆内土壤样品，了解污染物的去除速率。

7.3 采样宜符合以下规定：

a) 原位修复土壤取样点设置包括表层土壤和下层土壤，具体深度划分根据地块土壤污染调查确定，其中布点范围与位置根据污染地块的调查报告确定，每个样品代表的土壤体积不超过 500 m³；

b) 异位修复取样点宜在生物堆上部设置 2 个及侧面设置 4 个。采集土壤深度 10~90cm 的土壤样本，将 6 个采样点土壤样本合并为一个代表样本；

c) 设置土壤的采样频率为第 1 周 1 次/天，第 2~4 周 1 次/周，同时根据土壤目标污染物修复指标的变化规律实时调整。

7.4 监测指标的选择宜符合以下规定：

a) 根据污染场地调查情况，进行污染土壤生物修复及修复后的目标污染物浓度监测；

b) 若各样本点的检测结果显著优于修复目标值或与修复目标差异不显著，则认为达到修复效果；若某样本点的检测结果显著高于修复目标值，则认为未达到修复效果。未达标地块应在二次治理修复后再次进行效果评估。

7.5 后期管理宜符合以下规定：

a) 污染场地生物修复时，可能存在反弹现象，需要对场地进行回顾性监测；

b) 对土壤进行定期回顾性评估监测，监测点位布置应综合考虑环境调查详细采样监测、治理修复监测和工程验收过程监测；

c) 长期治理修复过程中可能影响的区域范围也应布置一定的监测点位。如果污染物浓度出现反弹，可能需要进行补充原位表面喷淋或生物堆表面喷淋添加漆酶制剂。

7.6 修复效果评估

污染土壤修复效果评估参照 HJ 25.5 污染地块风险管控与土壤修复效果评估技术导则执行。根据用地类型及要求，依据 GB 15618 和 GB 36600，判断修复效果是否符合用地要求。

附录 A

(规范性) 漆酶活力测试方法

A.1 试样和试剂

A.1.1 试样：漆酶制剂；

A.1.2 试剂：醋酸-醋酸钠缓冲溶液（0.2mM（A\B 液配制） pH 5.0）； 5mM ABTS；

A.2 仪器和设备

A.2.1 生化培养箱；紫外分光光度计；

A.3 测试步骤

A.3.1 游离漆酶活力测定：3.75mL 醋酸-醋酸钠缓冲溶液（0.2mM（A\B 液配制） pH 5.0），0.2mL 5mM ABTS，在 30℃条件下水浴 5min，加入 0.05mL 粗酶液，摇匀，倒入比色皿中，设置紫外分光光度计波长为 420nm，每隔 10s 测定一次吸光度，测定 90s 内吸光度变化，吸光度不高于 2.0。

游离漆酶活力计算公式如下：

$$\text{漆酶活力 (U/mL)} = \frac{\Delta D \times V_t \times 60 \times 10^3}{\Delta T \times V_e \times \epsilon_{420}} \dots\dots\dots (\text{A.1})$$

式中：

$\frac{\Delta D}{\Delta T}$ -90s 内，吸光度随时间变化的斜率；

V_t -反应溶液总体积，单位为 mL；

V_e -添加的漆酶溶液体积，单位为 mL；

ϵ_{420} - $3.6 \times 10^3 \text{ L} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ；

A.3.2 固定化漆酶活力测定：固定化酶后的载体材料通过尼龙网过滤掉残留酶液，并用去离子水冲洗干净，滤纸去除多余水分。称取 0.1g 固定化材料，加入 3.8mL 醋酸-醋酸钠缓冲溶液，0.2mL 5mM ABTS。摇匀，快速测定初始吸光度值，随后放入摇床，在 30℃环境下振荡 3min，再次测定吸光度值。

固定化漆酶活力计算公式如下：

$$\text{固定化漆酶活力 (U/g)} = \frac{\Delta D \times V_t \times 10^3}{\Delta T \times M_e \times \epsilon_{420}} \dots\dots\dots (\text{A.2})$$

$\frac{\Delta D}{\Delta T}$ -3min 内，吸光度随时间变化的斜率；

V_t -反应溶液总体积，单位为 mL；

M_e -添加的固定化漆酶质量，单位为 g；

ϵ_{420} - $3.6 \times 10^3 \text{ L} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ；

征求意见稿