

HY

中华人民共和国海洋行业标准

HY/T XXXXX—XXXX

海洋岸滩石油污染微生物修复指南

Guidelines for the bioremediation of petroleum pollution on marine shorelines

(报批稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中华人民共和国自然资源部 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 微生物修复流程.....	2
5 现状调查与评估.....	2
5.1 海洋岸滩类型分类.....	2
5.2 石油污染现状分析.....	3
5.3 污染区域营养盐分析.....	3
5.4 温度因素.....	3
6 微生物修复方法选择.....	3
6.1 微生物修复方法选择原则.....	3
6.2 外源营养物质的选择与施加.....	3
6.3 石油烃降解菌的选择与施加.....	4
7 监测与分析.....	4
8 微生物修复效果评估.....	4
8.1 表观监视.....	5
8.2 石油降解率计算.....	5
9 微生物修复终止判断.....	5
附录 A（规范性附录） 石油烃降解菌数量检测——油平板法.....	6
参考文献.....	7

前 言

本标准按照 GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由国家海洋环境监测中心提出。

本标准由全国海洋标准化技术委员会（SAC/TC283）归口。

本标准主要起草单位：国家海洋环境监测中心、自然资源部第一海洋研究所。

本标准主要起草人：樊景凤、苏洁、李倩、郑立、明红霞、石婷婷、金媛。

海洋岸滩石油污染微生物修复指南

1 范围

本标准规定了海洋岸滩石油污染微生物修复的流程、技术要求和方法等内容。
本标准适用于我国受石油污染的海洋岸滩的微生物修复。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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/T 12763.4 海洋调查规范 第4部分：海水化学要素调查

GB/T 14914 海滨观测规范

GB 17378.3 海洋监测规范 第3部分：样品采集、储存与运输

GB 17378.4 海洋监测规范 第4部分：海水分析

GB 17378.5 海洋监测规范 第5部分：沉积物分析

GB/T 17378.7 海洋监测规范 第7部分：近海污染生态调查和生物监测

GB/T 21247 海面溢油鉴别系统规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

微生物修复 **microbial remediation**

利用微生物的吸收降解作用清除环境中污染物的一个自发或受控的过程。

注：可分为原位微生物修复和异位微生物修复。原位微生物修复指在污染的原地点进行的微生物修复。异位微生物修复指移动污染物到临近地点或反应器内进行的微生物修复。

3.2

外源营养物质 **external nutrients**

在微生物生活环境中，为促进其生长代谢人为添加的营养盐物质。

注：可分为水溶性和缓释型两种。水溶性营养物质指易溶解在水中的有机或无机营养物质。缓释型营养物质指具有合适的释放速率，在水溶液中可缓慢释放的营养物质。

3.3

海洋岸滩 **marine shoreline**

被岩石、沙、砾石、泥、生物遗骸覆盖的海洋沿岸堆积地面，由海水的侵蚀、堆积而成。

注：海洋岸滩可分为暴露岩岸/岩礁、港口区域/防冲乱石、砾石质海滩和沙滩等类型。

3.4

石油烃降解菌 *Petroleum-degrading bacteria*

能将石油烃类化合物氧化（辅氧化）成为低分子化合物或完全分解为二氧化碳和水的细菌。

4 微生物修复流程

微生物修复流程见图1。

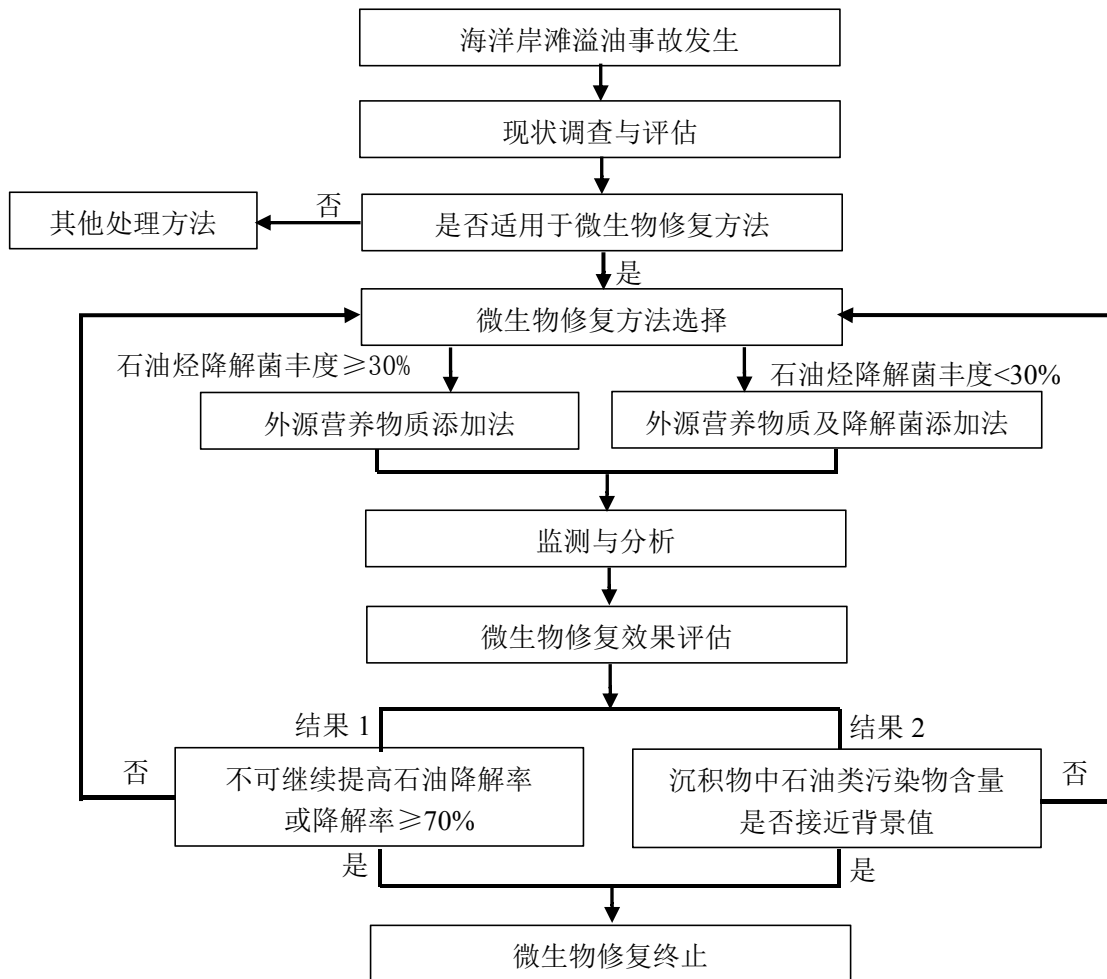


图1 海洋岸滩石油污染微生物修复流程图

5 现状调查与评估

5.1 海洋岸滩类型分类

对石油污染海洋岸滩进行分类，确定海洋岸滩类型：根据我国海岸特点，可将石油污染海洋岸滩分为暴露岩岸/岩礁、港口区域/防冲乱石、砾石质海滩和沙滩等类型。分类标准见表1：

表 1 海洋岸滩分类标准

海洋岸滩类型	海洋岸滩分类标准
暴露岩岸/岩礁	多石块海岸，石块大小不一，且形状不规则
港口区域/防冲乱石	港口附近防波堤区域，多为人工石块，坡度大
砾石质海滩	多为砾石小块，海洋岸滩较为平整
沙滩	砂质组成包括细、中、粗砂

暴露沿岸/岩礁区域、港口区域/防冲乱石区域由于多为大型石块，并且坡度大，难以进行石油烃降解菌喷洒，因此不适用原位微生物修复方法；而砾石质海滩和沙滩多为小石块和沙质，地势平坦，石油污染物易渗入沉积物，适合喷洒石油烃降解菌和外源营养物质进行微生物修复。

5.2 石油污染现状分析

海洋岸滩石油污染的样品采集主要是沉积物样品(含间隙水)。样品采集按照GB/T 21247的相关规定执行，样品保存及运输方法执行GB 17378.3的规定。确定被石油污染的海洋岸滩区域面积、石油渗透至沉积物的深度、石油污染物来源和浓度，初步测定石油的粘度和密度，判断是否可采用微生物修复降解。

5.3 污染区域营养盐分析

海洋岸滩石油污染物的微生物降解主要发生在油-水界面，其降解效果依赖于沉积物间隙水中的营养浓度。通过测量间隙水背景营养盐的含量，确定是否需要人为施加外源营养物质。

5.4 温度因素

微生物修复技术在温暖的季节（春、夏、秋季节）或15℃以上时更有效。

6 微生物修复方法选择

6.1 微生物修复方法选择原则

根据污染区域沉积物间隙水中石油烃降解菌丰度调查结果，如果石油烃降解菌的丰度不小于30%时，可只采用外源营养物质添加法；石油烃降解菌丰度小于30%时，外源营养物质及石油烃降解菌添加法结合使用。

6.2 外源营养物质的选择与施加

6.2.1 外源营养物质的选择

水溶性和缓释型营养物质都适合于砾石质海滩及沙滩。水溶性外源营养物质在细、中砂沙滩上更有效，缓释型营养物质在砾石质海滩及粗砂沙滩上更有效。此外，当环境温度较高时，缓释型外源营养物质比水溶性外源营养物质将更有效地增加沉积物中的营养盐浓度；当环境温度较低时，水溶性外源营养物质的效果优于缓释型外源营养物质。

6.2.2 外源营养物质的施加

外源营养物质的施加频率取决于石油污染修复区的潮汐波浪特点。宜在低潮期时对砾石质海滩每3 d~4 d施加1次外源营养物质，沙滩每7 d施加1次外源营养物质。施加的外源营养物质为氮、磷两种营养盐元素，氮盐的初始浓度宜为100 mg/L，氮、磷营养盐浓度比范围为5:1~10:1，并确保其在污染区域

中均匀分布。根据外源营养物质的物理形态，选择不同的施加方式：均匀撒播缓释型营养物质颗粒，使用手持或背式喷雾器喷洒液体水溶性营养物质。

6.3 石油烃降解菌的选择与施加

6.3.1 石油烃降解菌的选择

从石油污染修复区进行现场样品采集，在实验室内进行石油烃降解菌的筛选和石油降解率的测定，选出降解率最高的1种~3种石油烃降解菌扩大培养后进行原位微生物修复。

6.3.2 石油烃降解菌的施加

将石油烃降解菌配成液体，用手持或背式喷雾器直接喷洒至石油污染区域。在低潮期进行石油烃降解菌的施加，石油烃降解菌的初始浓度宜为 10^5 CFU/L；在石油烃降解菌施加频率上，微生物修复前期，施加频率为1 d~3 d一次，1周后施加频率降低为5 d~7 d一次，每周在菌剂喷洒前进行石油烃降解菌分析，若污染区域石油烃降解菌的丰度显著提高，则施加频率降低为一个月一次，直至微生物修复终止。

7 监测与分析

石油污染微生物修复的监测项目和分析方法见表2。微生物修复开始后，应分时段采集岸滩沉积物样品，根据当地潮汐在低潮时段进行采样。

表2 微生物修复的监测项目和分析方法

序号	监测项目	观测、分析方法	引用标准	备注
1	细菌总数	平板计数法	GB17378.7	
2	石油烃降解菌数量	油平板法	见附录 A	
3	pH	pH 计	GB17378.4	测定间隙水的 pH
4	盐度	盐度计	GB17378.4	测定间隙水的盐度
5	溶解氧	碘量法	GB 17378.4	测定间隙水的溶解氧
6	油类	重量法	GB 17378.5	
7	石油烃组分	GC-MS 分析	GB/T 21247	
8	总氮	过硫酸钾氧化法	GB 12763.4	测定间隙水中总氮
9	总磷	过硫酸钾氧化法	GB 12763.4	测定间隙水中总磷

8 微生物修复效果评估

8.1 表观监视

对比观察受石油污染区域和未受污染区域,如果微生物修复区域比未修复区域的海洋岸滩表面石油污染面积明显减小,表明微生物修复有效。

8.2 石油降解率计算

检测受石油污染区域和未受石油污染区域、微生物修复区域和未修复区域沉积物中石油污染物浓度。根据沉积物中石油污染物浓度,按下式计算石油降解率,

$$D_r = (C_0 - C_n) / C_0 \times 100\%$$

式中:

D_r —石油降解率;

C_0 —修复前石油污染物浓度,单位为毫克/升(mg/L);

C_n —修复第n天石油污染物浓度,单位为毫克/升(mg/L)。

9 微生物修复终止判断

当检测分析的结果同时或者出现以下任何一种情况时,微生物修复可终止:

- a) 当沉积物中石油污染物浓度检测值接近污染前的背景值时;
- b) 当微生物修复方法的使用不能继续提高石油降解率或降解率达到70%以上时。

附录 A

(规范性附录)

石油烃降解菌数量检测——油平板法

A.1 培养基的配置

柴油无机盐固体培养基成分及其配置方法如下：

a) 成分：NaCl 22.0g；MgSO₄·7H₂O 2.0 g；NH₄NO₃ 1.0 g；KCl 0.5 g；KH₂PO₄ 1.0 g；Na₂HPO₄ 3.0 g；CaCl₂ 0.1 g；FeCl₃ 0.005 g；MnSO₄ 0.002 g；ZnCl₂ 0.002 g；琼脂 15 g；重柴油 10 mL；蒸馏水 1000 mL。

b) 制法：将上述成分（重柴油除外）混匀，调整pH至7.5，121℃高压湿热灭菌15 min；将100 mL重柴油单独装于250 mL三角瓶，121℃高压湿热灭菌15 min。然后取10 mL灭菌重柴油至上述灭菌培养基中混匀，将此培养基倒入经灭菌的各平皿中，每平皿约20 mL，待其冷却凝固，置4℃冰箱内保存备用。

A.2 检测步骤

石油烃降解菌数量检测步骤如下：

a) 将无菌称取的 1 g 沉积物样品加入到装有 99 mL 无菌陈海水的三角瓶中，室温 200 r/min，振荡 30 min；

b) 将振荡均匀的样品进行10倍稀释，根据采样季节与溢油区距离等环境因素选取适当稀释度的样品进行分离培养；

c) 选取适当稀释梯度样品0.1 mL到灭菌柴油无机盐平板上，无菌涂布均匀，每个稀释度重复3次；

d) 待样品均匀渗透到培养基后，将接种后的灭菌柴油无机盐平板置28℃恒温培养箱中培养7 d~14 d；

e) 选择菌落数在30个~300个之间的平皿，以平均菌落数乘其稀释倍数，即为样品中的石油烃降解菌数。

参 考 文 献

- [1] 牟颖, 严良政. 近岸海域石油污染生物修复技术的研究进展[J]. 工业安全与环保, 2012, 38(5): 61-63.
- [2] 郑立, 崔志松, 高伟, 韩彬, 杨佰娟, 王绍良, 李倩, 周文俊, 张魁英, 曹磊. 海洋石油降解菌剂在大连溢油污染岸滩修复中的应用研究[J]. 海洋学报, 2012, 34(3): 163-172.
- [3] 何云馨. 不同类型溢油污染潮间带生物修复可行性现场中试研究[D]. 山东: 中国海洋大学, 2010.
- [4] 夏文香, 郑西来, 李金成, 宋志文. 海滩石油污染的生物修复[J]. 海洋环境科学, 2003, 22(3): 74-79.
- [5] 王丽娜. 海洋近岸溢油污染微生物修复技术的应用基础研究[D]. 山东: 中国海洋大学, 2013.
- [6] 毛天宇, 刘宪斌, 李亚娟. 海洋石油污染生物修复技术[J]. 海洋信息, 2008, 3: 12-13.
- [7] 蔡锋. 华南沙质海滩动力地貌过程[D]. 山东: 中国海洋大学, 2004.
- [8] 李金成, 郑西来, 夏文香, 宋志文, 李淑清. 石油污染海滩的生物修复实践及营养施加策略[J]. 海洋湖沼通报, 2008, 4: 109-115.
- [9] 唐晨光. 营养盐对微生物降解海水中石油污染物的影响及条件优化[D]. 山东: 青岛理工大学, 2008.
- [10] 杨仕美. 高效石油烃降解菌剂的制备及其在溢油污染海岸线生物修复中的应用[D]. 中国海洋大学, 2009.
- [11] X Zhu, AD Venosa, MT Suidan, K Lee. Guidelines for the bioremediation of marine shorelines and freshwater wetlands, 2001 [R]. Cincinnati, OH: US Environmental Protection Agency, 2001 .
- [12] Environment Protection Authority. The Environment Protection Authority Guidelines-Soil bioremediation, 2005[R]. Government South Australia, 2005.
- [13] Australian Maritime Safety Authority. National Plan for Maritime Environmental Emergencies-Oil Spill Control Agents Guideline Two, 2013[R]. Australian Government, 2013.
-