زیست پالایی خاک آلوده به گازوئیل با استفاده از تقویت و تحریک زیستی همزمان

سمیرا کریم[۱]، نادر مختارانی[۲،۳*] و سیده بهاره عظیمی[۴]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد مهندسی محیط زیست، دانشکده مهندسی عمران و محیط زیست، دانشگاه تربیت مدرس

۲- دانشیار، دانشکده مهندسی عمران و محیط زیست، دانشگاه تربیت مدرس

۳- دانشیار، پژوهشکده محیط زیست، دانشگاه تربیت مدرس

۴- استادیار، پژوهشکده محیط زیست و توسعه پایدار، سازمان حفاظت محیط زیست

پست الکترونیکی نویسندگان:

۱- s.karim@modares.ac.ir

۲- mokhtarani@modares.ac.ir

۳- azimib@rcesd.ac.ir

چکیده:

آلاینده‌های نفتی از طریق عوامل متعددی وارد محیط‌زیست می‌گردند. هدف از انجام این تحقیق، بررسی اثر عوامل مختلف شامل میزان رطوبت، مواد مغذی و میکروارگانیسم تلقیحی بر پالایش زیستی خاک ماسه‌ای آلوده به $۴۰۰۰\ mg/kg$ گازوئیل بود. در این پژوهش از سویه *Pseudomonas putida* کشت یافته در محیط مایع به عنوان گونه میکروبی و آمونیوم نیترات و پتاسیم دی هیدروژن فسفات به‌ترتیب به‌عنوان منبع نیتروژن و فسفر استفاده شد. نتایج نشان داد که افزایش مواد مغذی در دسترس گونه باکتری، موجب بهبود نرخ رشد جمعیت میکروبی خاک و به دنبال آن افزایش راندمان حذف آلاینده نفتی می‌شود. باتوجه به راندمان بالای حذف کل هیدروکربن‌های نفتی (TPH)، نرخ مناسب تنفس میکروبی و نیز جمعیت میکروبی نهایی، رطوبت ۸٪ وزنی، نسبت مواد مغذی $C:N:P$ = ۱۰۰:۱۰:۱ و تلقیح باکتری به میزان ۵٪ حجمی به‌عنوان مقادیر بهینه جهت پاکسازی خاک به روش مذکور تعیین شد. در این شرایط طی هفتاد روز، راندمان حذف TPH به میزان ۸۶ درصد حاصل گردید.

واژگان کلیدی: پالایش زیستی، پاکسازی خاک، تقویت زیستی، تحریک زیستی، *سودوموناس پوتیدا*.

Bioremediation of diesel-contaminated soil using simultaneous Bio-augmentation and Bio-stimulation processes

Samira Karim [۱], Nader Mokhtarani [۲،۳], Seyedeh Bahareh Azimi[۴]

۱- MSc of Environmental Eng., Civil and Environmental Engineering Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

۲- Associate Professor, Civil and Environmental Engineering Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

۳- Modares Environmental Research Institute, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

۴-Assistant Professor, Environment and Sustainable Development Research Institute, Iran Environmental Protection Organization, Tehran, Iran

Abstract:

Petroleum-based products are the primary energy source for industry and daily life. However, leakage and spillage frequently occur during the exploration, production, refining, transportation, and storage of these compounds. Soil contamination caused by crude oil is a significant concern with worldwide impacts on ecosystems and human health. Various biological and non-biological methods have been developed to remove oil pollutants in situ or ex situ. Meanwhile, bioremediation, in which microorganisms break down organic pollutants, is one of the most efficient techniques for cleaning soils contaminated with chemical compounds. Bioremediation is an emerging sustainable and economical technology to maximize the metabolism of organic pollutants, especially petroleum compounds, and minimize the ecological effects caused by their spills. The objective of this study, which was conducted on a laboratory scale, was to investigate the impact of different factors such as soil humidity, nutrient ratio, and inoculum of microorganisms, on the biological treatment of sandy soil contaminated with ۴۰۰۰ mg of diesel per kilogram of soil. The performance of the process was evaluated in terms of total petroleum hydrocarbons (TPH) removal efficiency, soil microbial respiration, and soil microbial population. Three doses of Pseudomonas Putida were added to the soil as a pre-adapted pure bacterial strain. The soil was also stimulated with three levels of ammonium nitrate and potassium dihydrogen phosphate as nutrients. The obtained results indicate that the increase in nutrients available to the bacterial species improves the growth rate of the soil microbial population and subsequently increases the oil pollutant removal efficiency. Due to the high TPH removal efficiency, the appropriate rate of microbial respiration, and sufficient final microbial population, ۸٪ by weight humidity, the nutrient ratio of ۱۰۰:۱۰:۱, and ۵٪ by volume bacterial inoculation was determined as the optimal value for the biological cleaning of diesel-contaminated soil by Bioaugmentation and Biostimulation process. Under the given conditions, after seventy days of the cleaning operation, the TPH removal efficiency reached ۸۶٪.

Keywords: bioremediation, soil, diesel, Bioaugmentation, Biostimulation, *Pseudomonas Putida*,

۱ ـ مقدمه و تاریخچه تحقیقات

در حین اکتشاف، بهره برداری، پالایش، ذخیره سازی و حمل و نقل نفت، ممکن است خاک به دلیل عملیات نادرست و یا نشت تصادفی به این ترکیبات آلوده شود[۱]. با توجه به اینکه نفت خام و مشتقات آن حاوی هیدروکربن‌های آلیفاتیک و آروماتیک، رزین‌ها، آسفالتین‌ها و همچنین مواد شیمیایی خطرناکی نظیر بنزن، تولوئن، اتیل بنزن و نفتالن می‌باشند، انتشار آلاینده‌های نفتی خطری بالقوه برای سلامت انسان، حیوانات و گیاهان به‌حساب می‌آید[۳-۲]. این ترکیبات به دلیل دارا بودن ملکول‌های پیچیده، سمیت، قابلیت سرطان‌زایی، ماندگاری طبیعی و پراکندگی گسترده، موجب نگرانی‌های جدی در حوزه بهداشت و محیط زیست می‌شوند [۴]. از میان مشتقات نفتی، گازوئیل، نفت گاز یا سوخت دیزل به عنوان مهم‌ترین آلاینده نفتی، همواره در گزارش‌های محیط زیستی مورد توجه بوده است[۵] گازوئیل ترکیب پیچیده‌ای از آلکان‌های نرمال، شاخه‌ای، حلقوی و ترکیبات آروماتیک حاصل از کسر میان‌تقطیر در هنگام جداسازی نفت می‌باشد[۶]. آلکان‌ها بخش اعظم این فرآورده نفتی را تشکیل می‌دهند ولی حدود ۴ درصد از آن نیز مربوط به ترکیبات آروماتیک می‌باشد[۵]. گازوئیل تجاری عمدتاً شامل ۸۰ درصد آلکان بوده که نیمی از آن‌ها، آلکان‌های نرمال و نیمی دیگر آلکان‌های حلقوی می‌باشند[۷].

برای برطرف نمودن آلاینده‌های نفتی راه‌حل‌های زیستی و غیرزیستی متنوعی وجود داشته که به‌صورت خارج از محل و یا درجا قابل انجام می‌باشند[۸]. در این میان زیست پالایی که در آن از میکروارگانیسم‌ها برای تجزیه آلاینده‌های آلی استفاده می‌شود، یکی از تکنیک‌های بسیار کارآمد پاکسازی خاک‌های آلوده به ترکیبات شیمیایی بشمار می‌رود[۹]. زیست پالایی یک فناوری نوظهور پایدار و اقتصادی برای به حداکثر رساندن متابولیسم آلاینده‌های آلی به خصوص ترکیبات نفتی و به حداقل رساندن اثرات اکولوژیکی ناشی از نشت آنها است. این فرایند متکی بر فعالیت‌های متابولیک میکروبی در حضور عوامل اکولوژیکی بهینه و مواد مغذی لازم برای تبدیل آلاینده‌های آلی مانند هیدروکربن‌های پتروژنیک به ترکیبات بی خطر می‌باشد[۱۰]. از مزایای این روش، به نسبت دیگر روش‌های پاکسازی، می‌توان به ساده بودن نسبی تکنولوژی، امکان استفاده هم‌زمان با سایر روش‌های فیزیکی و شیمیایی، پایین‌بودن نسبی هزینه‌های جاری اولیه، امکان تخریب کامل آلاینده‌ها و عدم نیاز به تجهیزات تخصصی اشاره نمود[۱۳-۱۱].

امروزه به دلیل انتشار مقادیر زیادی هیدروکربن‌های نفتی در محیط‌زیست، چه به طور تصادفی از طریق صنایع نفت و یا در اثر فعالیت‌های انسانی، پاکسازی سایت‌های آلوده به یک چالش جهانی تبدیل شده است. اگرچه پاکسازی زیستی رویکردی مناسب جهت پالایش خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی محسوب می‌شود با این حال، هنوز موارد زیادی در این زمینه نیاز به بررسی و تحقیقات دارد[۱۴].

پاکسازی موفق زیستی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی نیازمند به‌کار بستن راهبردی متناسب با محیط آلوده می‌باشد. محققان تاکنون روش‌ها و تکنیک‌های متعددی را جهت تجزیه زیستی آلاینده‌های نفتی موجود در خاک پیشنهاد داده‌اند. از مهم‌ترین فرایندهای مرسوم در پاکسازی زیستی خاک می‌توان به تقویت زیستی (زیست فزونی)[۱]، تحریک زیستی[۲]، تهویه زیستی[۳]، گیاه پالایی[۴]، پاکسازی به‌شیوه کشت و کار[۵] (اصلاح به صورت زمین کشاورزی)، فرایند کمپوست[۶] و بیوراکتورهای فاز دوغابی[۷] اشاره نمود[۱۷-۱۵].

میکروارگانیسم‌های دارای ژن‌های کاتابولیک مرتبط عمدتاً در تمامی محیط‌ها، اعم از محیط‌های غیر آلوده، وجود دارند. اما معمولا در شرایط عادی، فراوانی نسبی میکروارگانیسم‌های کربن‌خوار در یک جمعیت میکروبی خاص بسیار ناچیز و اندک می‌باشد. این مسئله منجر به افت پتانسیل تجزیه زیستی خاک و به تبع آن نرخ پایین پالایش زیستی می‌شود. یکی از راهبردهای مؤثر غلبه بر این مشکل،

[۱] Bioaugmentation
[۲] Biostimulation
[۳] Bioventing
[۴] Phytoremediation
[۵] Land Farming
[۶] Composting
[۷] Slurry Phase Bioreactors

تلقیح میکروارگانیسم‌های انتخاب‌شده به محیط آلوده است. ایده تلقیح خاک با میکروب‌های با قابلیت بالای تجزیه، با هدف افزایش راندمان فرایند را «تقویت زیستی» می‌نامند[۱۵].

تقویت زیستی در حقیقت راهبردی است که با تأمین جمعیت میکروبی مناسب، تجزیه زیستی را تکمیل می‌نماید. در چند سال اخیر، آلاینده‌های متعددی نظیر حشره‌کش‌ها، ترکیبات نفتی و تعداد زیادی مواد شیمیایی آلی سمی به‌روش تقویت زیستی مورد تصفیه قرار گرفته‌اند[۱۶]. همانطور که اشاره شد، مبنای این روش اضافه کردن گونه‌های میکروبی و یا باکتریایی خاص به محیط آلوده می‌باشد. میکروارگانیسم‌های بومی موجود در خاک توانایی تجزیه محدوده وسیعی از مواد موجود در خاک را دارا بوده اما جمعیت و فعالیت آن‌ها در صورت وجود غلظت‌های زیاد مواد سمی تحت تأثیر قرار می‌گیرد. در این خصوص میکروارگانیسم‌های غنی‌شده بومی یا غیر بومی تحمل بسیار بالاتری در برابر سمیت از خود نشان داده و می‌توانند با راندمان به مراتب بالاتری آلاینده‌های موجود در محیط را تجزیه کنند. در بسیاری از موارد، تقویت زیستی راهبردی کارآمد در حذف آلاینده‌های خاک و پاکسازی محیط است. نکته کلیدی پاکسازی زیستی به‌روش تقویت زیستی، دست‌یابی به زیست توده با جمعیت باکتریایی فراوان است[۱۸]. مطالعات بسیاری مؤید این نکته است که افزایش زیست‌توده اولیه، با کاهش زمان موردنیاز برای سازگاری، موجب بهبود نرخ تجزیه زیستی آلاینده و به تبع آن افزایش راندمان تصفیه می‌گردد[۱۵].

در شرایطی که جمعیت تجزیه‌کننده آلاینده به اندازه کافی در محیط حضور دارد ولی شرایط برای فعالیت آنها مناسب نیست، با مساعد کردن شرایط محیطی می‌توان سرعت تجزیه زیستی آلاینده توسط میکروارگانیسم‌های موجود در محیط را افزایش داد که به آن «تحریک زیستی» گفته می‌شود. افزودن مواد مغذی نظیر نیتروژن و فسفر تکنیکی استاندارد در جهت افزایش راندمان تجزیه هیدروکربن‌ها به‌شمار می‌رود. در حقیقت با اضافه کردن این مواد مغذی، نسبت‌های $C:N$ و $C:P$ به مقادیر مورد نیاز برای میکروارگانیسم‌ها نزدیک شده و عملکرد سیستم بهبود می‌یابد[۱۹].

لازم به‌ذکر است که دو تکنیک تقویت زیستی و تحریک زیستی را می‌توان به‌صورت مجزا یا توام مورد استفاده قرار داد[۲۰-۲۱]. فن آوری‌های ترکیبی تقویت زیستی و تحریک زیستی نه تنها باکتری‌های فعال را به محیط خاک وارد می‌کند، بلکه می‌تواند میکروارگانیسم‌های بومی را تحریک کرده تا ویژگی خاک را بهبود بخشند[۲۲]. Sun و همکاران در پژوهشی کاربرد مجزا و همزمان تقویت زیستی و تحریک زیستی در تصفیه خاک آلوده به هیدروکربن آروماتیک چندحلقه‌ای ($PAHs$) را مورد ارزیابی قرار داده و نشان دادند که کاربرد همزمان این دو تکنیک موجب افزایش قابل توجه راندمان حذف هیدروکربن‌های آروماتیک از خاک آلوده می‌شود[۲۳].

در پاکسازی خاک‌های آلوده به گازوئیل اثر پارامترهای زمان، غلظت آلاینده، نوع باکتری و اثر تعاملی آن‌ها بر راندمان سیستم معنی دار تشخیص داده شده است[۲۴]. در حذف زیستی گازوئیل از خاک توسط تقویت زیستی، باسیل‌های گرم منفی اکسیداز مثبت (گونه پسودوموناس آئروژینوزا) به عنوان جمعیت غالب در فرایند شناسایی شده‌اند[۲۵]. ابراهیمی و همکاران نیز با جداسازی و شناسایی ۱۹ سویه باکتری گرم‌منفی به نام‌های $PDB1-19$ از نمونه‌های خاک آلوده به مواد نفتی نشان دادند که این باکتری‌ها در حضور ترکیبات نفتی به صورت چشم‌گیری رشد می‌کنند[۲۶]. در تحقیقی دیگر بکارگیری میکروارگانیسم‌های جدا شده از خاک‌های آلوده به مواد نفتی جهت پاکسازی مناطق آلوده به ترکیبات آروماتیک نفتی با استفاده از روش زیست پالایی موثر گزارش شده است[۲۷].

در زیست پالایی خاک آلوده به گازوئیل به روش تحریک زیستی در بیورآکتورهای حاوی ورمی‌کمپوست با غلظت ۲۰٪ وزنی، و لجن فعال با غلظت ۱۰٪ وزنی، میانگین راندمان حذف کل هیدروکربن‌های نفتی (TPH) به ترتیب به میزان ۴۰/۶۳٪ و ۳۲٪ حاصل شده است[۲۸]. خلاصه نتایج حاصل از تعداد دیگری از تحقیقات انجام شده در خصوص پاکسازی زیستی خاک‌های آلوده به مواد نفتی در جدول (۱) آورده شده است.

همانطور که اشاره شد هیدروکربن‌های نفتی از عمده‌ترین آلاینده‌های آلی در اکوسیستم‌های خاکی در سراسر دنیا محسوب می‌شوند. استفاده از ریزجانداران برای حذف یا کاهش آلودگی نفتی، یکی از راه‌های اقتصادی و دوستدار محیط زیست است، که جداسازی و ارزیابی کارایی باکتریهای تجزیه کننده نفت، نخستین گام در استفاده از این روش می باشد[۳۰]. در این میان گونه میکروبی *سودوموناس پوتیدا* از جمله باکتری‌های نفت‌خوار است که اغلب از

مکان‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی استخراج می‌شود. تعدادی از اعضای این خانواده میل شدیدی برای ترکیب با هیدروکربن‌ها دارند و قادر به تجزیه آلکان ها، آلیسیکلیک ها، تیوفن‌ها و ترکیبات آروماتیک هستند [۳۱]. سویه *سودوموناس پوتیدا* به دلیل فقدان برخی ژن‌ها، از جمله آنزیم های تجزیه کننده دیواره سلولی، در رده باکتری غیر بیماری‌زا برای به‌شمار می‌رود. این سویه از جمله باکتری های گرم منفی، کموارگانوتروف (انرژی لازم را از اکسیداسیون مواد آلی حاصل می‌کند) و هوازی اجباری با متابولیسم تنفس هوازی می‌باشد. شکل ظاهری آن به صورت میله‌ای صاف یا خمیده با ابعاد ۰/۵ و ۱ میکرومتر در ۱/۵ تا ۴ میکرومتر است. آرایش ظاهری *سودوموناس پوتیدا* اغلب به صورت تکی یا خوشه ها و زنجیره‌های کوچک است که در شرایط هوازی و در حضور مواد مغذی متداول رشد می‌کند. این سویه در برابر ترکیبات بیگانه‌زی به ویژه هیدروکربن‌های چند حلقه‌ای مقاوم بوده و نقش مهمی در تصفیه خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی ایفا می‌کند. این باکتری به دلیل متابولیسم چند منظوره و نیز نیاز اندک به مواد غذایی در محیط‌های طبیعی بسیاری یافت می‌شود[۳۲].

جدول ۱: نتایج سایرتحقیقات مربوط به پالایش زیستی خاک آلوده

آلاینده	غلظت اولیه mg/kg	فرایند	زمان (روز)	راندمان حذف (٪)	منبع
گازوئیل	۲۱۵۰	تقویت و تحریک زیستی	۲۸	۷۰	[۲۰]
نفت خام	۲۹۵۰۰	تحریک زیستی	۸۴	۶۱	[۱۸]
هیدروکربن نفتی	۱۴۰۰۰	تقویت و تحریک زیستی	۱۴۰	۸۰	[۲۱]
گازوئیل	۸۳۵۸	تقویت و تحریک زیستی	۱۲۰	۹۶	[۵]
گازوئیل	۱۰۰۰۰۰	تحریک و تهویه زیستی	۲۸	۹۱	[۱۷]
گازوئیل	۱۱۰۰	تقویت و تحریک زیستی	۳۰	۴۴/۵	[۲۹]

با توجه به مطالب فوق و با در نظر گرفتن اینکه اکثر کشورهای جهان از جمله کشورمان به نوعی درگیر پاکسازی خاک‌های آلوده به مواد نفتی می‌باشند، هدف از انجام تحقیق حاضر ارزیابی عملکرد پاکسازی زیستی خاک‌های آلوده به گازوئیل انتخاب شد. در این پژوهش برای اولین بار تصفیه زیستی خاک آلوده به روش تحریک و تقویت زیستی با استفاده از کشت خالص باکتری *سودوموناس پوتیدا* در دوره‌های زمانی مشخص مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور اثرات متقابل سه فاکتور رطوبت خاک، میزان ماده مغذی و مقدار باکتری تلقیحی بر راندمان حذف کل هیدروکربن‌های نفتی (TPH) مورد بررسی قرار گرفته و بهترین شرایط جهت حذف آلاینده از خاک تعیین شد. لازم به توضیح است نتایج این پژوهش در زمینه کارایی سنجی روش های زود بازده جهت پاکسازی خاک های آلوده به مواد نفتی در اطراف تاسیسات مربوطه دارای کاربرد می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- روش کار

این تحقیق در مقیاس آزمایشگاهی و به کمک راکتور های شیشه‌ای با حجم ۲/۱ لیتر که جزئیات آن در شکل (۱) آورده شده انجام پذیرفت. در هر آزمایش ابتدا وزن مشخصی از خاک آلوده به سوخت دیزل با غلظت $4000\ mg\ Diesel/kg\ Soil$ به درون راکتور منتقل و با تنظیم رطوبت و نسبت مواد مغذی $(C:N:P)$ و همچنین تلقیح میزان مشخصی از باکتری *سودوموناس پوتیدا*، در طی یک دوره ۷۰ روزه به روش تحریک و تقویت زیستی مورد پاکسازی قرار گرفت. به منظور ارزیابی فعالیت بیوراکتور ها، هر ده روز یک بار پارامتر های، TPH، تنفس میکروبی و جمعیت باکتری های محیط خاک اندازه گیری شد. لازم به توضیح است به منظور عدم نشت دی‌اکسید کربن ناشی از تنفس میکروارگانیسم‌ها به بیرون از راکتور، درب آنها به‌وسیله واشرهایی از جنس فوم عایق شد. اندازه‌گیری تنفس میکروبی نیز به روش تیتراسیون، توسط ویال حاوی ۲۰ میلی لیتر محلول $NaOH$ که در کنار هر راکتور قرار داشت، صورت پذیرفت. همچنین به کمک شلنگ پلی یورتان به قطر ۶ میلی‌متر مسیری برای انتقال گاز دی اکسید کربن ناشی از فعالیت میکروبی به درون محلول $NaOH$، تعبیه شد. در این پژوهش در کنار راکتورهای اصلی از یک راکتور شاهد (بدون تلقیح سویه میکروبی و بدون افزودن مواد مغذی) با مشخصات ذکر شده استفاده گردید. گفتنی است به کمک یک دستگاه ترموستات حرارتی و منبع

گرما، دمای محیط قرار گیری پایلوت در محدوده ۲۵ تا ۳۰ درجه سلسیوس حفظ شد. همچنین کلیه آزمایش‌ها در محدوده pH خنثی (۶/۵ تا ۷/۵) انجام پذیرفت.

شکل ۱- تصویر و شماتیک پایلوت مورد استفاده

۲-۲ . خاک مورد استفاده

اطلاعات دقیقی در خصوص تاریخچه، نحوه و مدت زمان آلودگی خاک های آلوده به هیدروکربن های نفتی در طبیعت در اختیار نمی باشد، لذا به منظور تهیه نمونه خاک آلوده به گازوییل از روش آزمایشگاهی و اضافه نمودن مواد آلاینده به خاک استفاده شد. خاک مورد استفاده در این پژوهش، ترکیب ماسه و رس به نسبت ۹ به ۱ می باشد. ماسه یاد شده از مصالح رودخانه ای استان تهران تهیه شده که پس از انتقال به آزمایشگاه، اقدام به الک کردن آن گردید. در نهایت، مصالح بین الک های استاندارد ۸# (۲/۳۶ میلی‌متر) و ۲۰۰# (۰/۰۷۵ میلی‌متر) به عنوان بخش ماسه استفاده شد. بافت این خاک بر اساس تقسیم بندی سازمان کشاورزی ایالات متحده ($USDA$) از نوع ماسه لومی طبقه بندی شد[۳۳]. همچنین با توجه به نتایج حاصل از توزین مصالح مانده روی الک و منحنی دانه‌بندی، اندازه ذرات خاک مورد استفاده در این تحقیق در دامنه وسیعی توزیع شده و خاک از دانه بندی خوبی برخوردار بود. در این تحقیق از مصالح ریزدانه آزمایشگاهی نیز به عنوان رس استفاده شد.

پس از اختلاط ماسه و رس با نسبت مورد نظر، مخلوط با استفاده از آب مقطر به‌طور کامل شست و شو داده شد. همچنین به منظور اطمینان از حذف کامل هرگونه آلاینده احتمالی، خاک موردنظر به مدت ۲۰ دقیقه در کوره با دمای ۵۸۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. به منظور ترکیب یکنواخت و همگن خاک و آلاینده، هر کیلوگرم خاک پاکیزه با دانه‌بندی یاد شده، با مقدار مشخصی گازوئیل حل شده در ۵۰۰ میلی لیتر استن آزمایشگاهی آغشته گردید. در ادامه به ترکیب فوق ۷۲ ساعت زمان داده شد تا استن تبخیر و گازوئیل در خاک تثبیت شود. در نهایت نیز با به دست آوردن مقادیر ناچیز تقلیل وزن حرارتی[۸] و TPH خاک این اطمینان حاصل شد که آلاینده افزوده شده تنها منبع کربنی موجود در محیط خاک می باشد.

۲-۳ انتخاب باکتری

[۸] Loss of Ignition (LOI)

سویه باکتری مورد استفاده در این تحقیق *Pseudomonas putida PTCC 1649* بوده که از مجموعه میکروارگانیسم های سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. محیط کشت انتخاب شده برای این میکروب نیز نوترینت براث[۹] (حاوی ۱ گرم عصاره گوشت، ۲ گرم عصاره مخمر، ۵ گرم پپتون و ۵ گرم نمک طعام در یک لیتر آب) بود. با رسم منحنی رشد این سویه زمان بهینه رشد این باکتری نیز حدود ۱۸ ساعت برآورد شد.

۴.۲. سازگاری گونه میکروبی

به‌منظور جلوگیری از ایجاد شوک و از بین رفتن میکروارگانیسم‌های در تماس با غلظت بالای گازوئیل اقدام به سازگاری آن‌ها در یک راکتور مجزا با آلاینده نفتی شد. بدین منظور محلول گلوکز با غلظت $۲۰۰۰\ mg/L$ به عنوان منبع کربن برای شروع فرایند سازگاری مورد استفاده قرار گرفت. در این فرایند در طی یک دوره ۶۰ روزه، به‌تدریج از غلظت کلوگز کاسته و بر غلظت گازوئیل افزوده شد به‌نحوی که در انتهای دوره سازگاری، مقدار گلوکز به صفر و غلظت گازوئیل به $۴۰۰۰\ mg/L$ رسید. لازم به توضیح است غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم گازوئیل در گیلوگرم خاک بر اساس نتایج آزمایش‌های اولیه (نتایج در این مقاله ارائه نشده) و به منظور حصول راندمان قابل قبول در بازه زمانی مناسب انتخاب شده است.

۵.۲. شمارش باکتری‌ها

از جمله روش‌های غیرمستقیم سنجش تعداد سلول برای ارزیابی رشد باکتری‌های هتروتروفیک هوازی، شیوه «شمارش سلول زنده» یا «شمارش پلیت» می‌باشد[۵]. به‌منظور استخراج باکتری‌ها از محیط خاک به رقیق‌کننده (سرم فیزیولوژی)، ۱۰ گرم نمونه خاک به ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل‌شده اضافه گردید. مخلوط فوق به مدت ۱۵ دقیقه روی شیکر با سرعت۱۹۰ دور بر دقیقه (RPM) قرار گرفته و سپس با استفاده از پیپت استریل، یک میلی‌لیتر از مایع روی محلول استخراج، به ویال اول که حاوی ۹ میلی‌لیتر محلول رقیق‌کننده بود، اضافه شد. در مرحله بعد، ۱ میلی‌لیتر از محلول ویال اول به ویال دوم اضافه شده و این روند به همین ترتیب تا ویال هشتم تکرار و با رقیق‌سازی متوالی سری رقت‌های مورد نیاز برای شمارش باکتری آماده شد. در ادامه ۰/۱ میلی‌لیتر از هر یک از رقّت‌های تهیه شده به پلیت‌های از قبل آماده شده، حاوی محیط کشت نوترینت آگار منتقل گردید. حجم تلقیح‌شده به هر پلیت، به‌وسیله میله شیشه‌ای استریل به‌طور یکنواخت روی محیط جامد پخش و در نهایت پس از انکوباسیون به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، اقدام به شمارش کلنی‌های تشکیل شده در سطح محیط کشت آگار گردید (چنانچه کشت بر روی یک محیط مناسب صورت پذیرد، هر واحد زنده رشد کرده و یک کلنی را پدید می‌آورد).

هر کلنی که بتوان آن را شمارش نمود یک «واحد تشکیل‌دهنده کلنی» یا CFU نامیده می‌شود (تعداد CFUها متناسب با تعداد باکتری‌های زنده در نمونه است). در نهایت نیز با درنظر گرفتن تعداد کلنی‌ها، فاکتور رقّت هر پلیت و نیز استفاده از رابطه (۱) تعداد واحدهای تشکیل‌دهنده کلنی در هر گرم خاک خشک محاسبه شد[۵].

$$\text{تعداد کلنی در هر گرم خاک خشک} = \frac{\text{تعداد کلنی های تشکیل شده در پلیت}}{\text{وزن خاک خشک} \times \text{فاکتور رقت} \times \text{حجم نمونه}} \quad (۱)$$

که در آن وزن خاک خشک مطابق رابطه (۲) محاسبه می‌شود.

$$\text{وزن خاک خشک} = \text{وزن خاک مرطوب} \times \left(1 - \frac{\text{درصد رطوبت}}{۱۰۰}\right) \quad (۲)$$

۶.۲. تنفس میکروبی خاک

اندازه‌گیری تنفس میکروبی معیار مناسبی برای ارزیابی فعالیت میکروارگانیسم‌های موجود در خاک می‌باشد. در این تحقیق CO_2 حاصل از تنفس باکتری‌های تلقیحی به محیط خاک به روش تیتراسیون اندازه‌گیری شد. بدین منظور، نمونه خاک به درون راکتوری دربسته که تبادل گازی با محیط بیرون نداشت منتقل شد. با تعبیه مسیری کاملاً عایق، CO_2 ناشی از تنفس میکروبی خاک به ویال حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۰۵ مولار سدیم هیدروکسید هدایت گردید. پس از ۱۰ روز، ویال محتوی سود از سیستم خارج

[۹] Nutrient Broth

شده و به کمک هیدروکلریک اسید ۰/۱ مولار تیتر و میزان CO_2 تولیدی محاسبه شد[۳۴].

۷.۲. پارامترهای مورد بررسی

در این پژوهش، تأثیر پارامترهای مختلف شامل میزان ماده مغذی، درصد رطوبت و درصد حجمی باکتری تلقیحی در سه سطح بر راندمان حذف TPH از خاک آلوده به $4000\ mg\ Diesel / kg\ Soil$ به‌روش تقویت و تحریک زیستی مطابق جدول (۲) مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول ۲- سطوح پارامترهای مورد بررسی

متغیر	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳
$C:N:P$	۱۰۰:۰:۰	۱۰۰:۵:۱	۱۰۰:۱۰:۱
درصد وزنی رطوبت	۸	۱۲	۲۰
درصد حجمی باکتری تلقیحی	۲/۵	۵	۱۰
غلظت آلاینده نفتی ($mg / kg\ Soil$)	۴۰۰۰	۴۰۰۰	۴۰۰۰

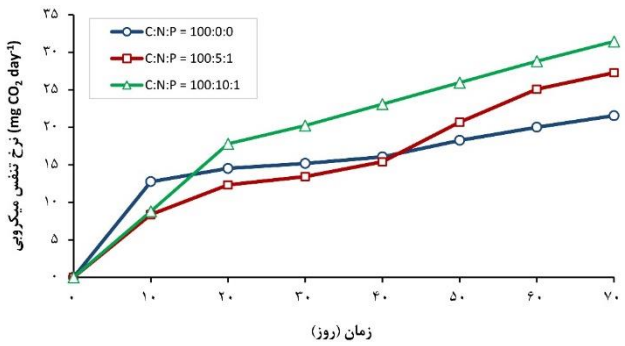
به‌منظور تأمین مواد مغذی مورد نیاز باکتری‌ها از آمونیوم نیترات (NH_4NO_3) با خلوص ۹۵٪ و پتاسیم دی هیدروژن فسفات (KH_2PO_4) با خلوص ۱۰۰٪ به‌ترتیب به‌عنوان منبع نیتروژن و فسفر استفاده شد. با توجه به نوع آلاینده، در این پژوهش اندازه‌گیری پارامتر "کل هیدروکربن‌های نفتی" به‌عنوان شاخص عملکرد فرایند مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور از تتراکلرواتیلن از درجه بدون هیدروکربن به عنوان حلال و از دستگاه $InfraCal\ TOG / TPH\ Analyzer$ مدل CVH ساخت کشور آمریکا جهت اندازه گیری TPH استفاده شد. لازم به ذکر است کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش از نوع آزمایشگاهی و از طریق شرکت‌های معتبر تامین گردید.

۳- نتایج و بحث

چنانچه بیان شد در تحقیق حاضر، در یک دوره هفتاد روزه اقدام به تصفیه بیولوژیکی خاک آلوده به $4000\ mg\ Diesel / kg\ Soil$ به روش تحریک و تقویت زیستی در محدوده pH خنثی شد. در این تحقیق، مقدار مناسب پارامترهای مؤثر (رطوبت محیط، میزان ماده مغذی و درصد باکتری تلقیحی) با تغییر یک عامل و ثابت نگه‌داشتن سایر پارامترها تعیین گردید که نتایج مربوطه در ادامه آورده شده است.

۳-۱ تأثیر ماده مغذی و تلقیح میکروبی بر عملکرد فرایند

از آنجایی‌که شمارش میکروارگانیسم های زنده خاک به تنهایی نمی‌تواند معیار دقیقی از فرایندهای تصفیه بیولوژیکی باشد [۳۵-۳۶]، لذا در این بخش در ابتدا تأثیر میزان ماده مغذی افزوده شده به خاک بر نرخ تنفس میکروبی (روند تولید CO_2) در رطوبت ثابت ۱۲٪ وزنی و تلقیح اولیه ۵٪ حجمی باکتری *سودوموناس پوتیدا* مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در شکل (۲) مشاهده می‌شود با افزایش میزان مواد مغذی از نسبت ۱۰۰:۰:۰ به ۱۰۰:۵:۱ و در نهایت ۱۰۰:۱۰:۱ در پایان دوره هفتاد روزه نرخ تنفس میکروبی با افزایش همراه بوده است. در تحقیقی مشابه، با تحریک زیستی میکروارگانیسم های خاک توسط افزودن نیتروژن و فسفر به عنوان ماده مغذی نیز افزایش راندمان حذف سوخت دیزل از خاک گزارش شده است [۱۹].



شکل ۲: تأثیر میزان ماده مغذی بر نرخ تنفس میکروبی تجمعی خاک
(mg_{Diesel} / kg_{Soil} ۴۰۰۰، رطوبت ۱۲٪ وزنی، ۵٪ حجمی باکتری)

مطابق شکل (۲) در کلیه آزمایش ها، در روزهای ابتدایی میزان CO_2 تولیدی با شدت بیشتری تولید شده اما به مرور زمان از نرخ آن کاسته می‌شود. توجه به این نکته ضروری است که در ابتدا میکروارگانیسم های تجزیه‌کننده سوخت دیزل توسط منابع هیدروکربنی ناپایدار، نظیر هیدروکربن‌های خطی و راست زنجیر، فعال شده‌اند که این امر منجر به افزایش فعالیت باکتری و به دنبال آن افزایش نرخ تنفس میکروبی خاک می‌گردد با اتمام

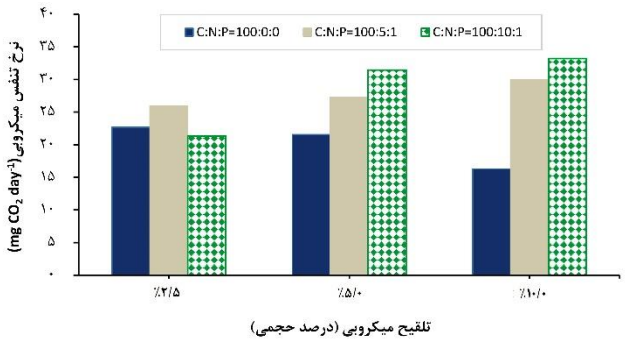
هیدروکربن‌های سبک، میکروارگانیسم‌ها ملزم به مصرف ترکیبات پیچیده‌تر نظیر هیدروکربن‌های آروماتیک با وزن مولکولی بالا بوده که منجر به کاهش راندمان می‌شود. همچنین ممکن است تجزیه هیدروکربن‌های سنگین‌تر منجر به تولید عناصر واسطه سمی شده به نحوی که عملکرد میکروارگانیسم‌های نفت‌خوار را مختل نماید[۱۹].

دلیل کاهش محسوس شیب منحنی نرخ تنفس میکروبی نسبت به زمان در هنگام استفاده از مواد مغذی با نسبت ۱۰۰:۰:۰ بعد از گذشت ۱۰ دقیقه را می‌توان به ناکافی بودن مواد مغذی در مقایسه با دو مورد دیگر نسبت داد.

در پاکسازی خاک آلوده به ترکیبات نفتی، در ۱۵ روز اول فرایند، بخش قابل‌توجهی از هیدروکربن‌های خطی و مقدار کمی از آلکان‌های ایزوپرنوید $(i-C_{15} to\ i-C_{18})$ توسط میکروارگانیسم‌های نفت‌خوار تجزیه گردیده و پس از آن افتی در تولید CO_2 و فعالیت میکروبی حاصل شده است[۱۶].

در ادامه به منظور بررسی تاثیر میزان تلقیح میکروبی اولیه بر عملکرد فرایند، آزمایش‌ها در سه سطح مختلف این پارامتر (۲/۵، ۵ و ۱۰ درصد حجمی) تکرار شد که نتایج مربوطه در پایان یک دوره هفتاد روزه در شکل (۳) با یکدیگر مقایسه شده‌اند.

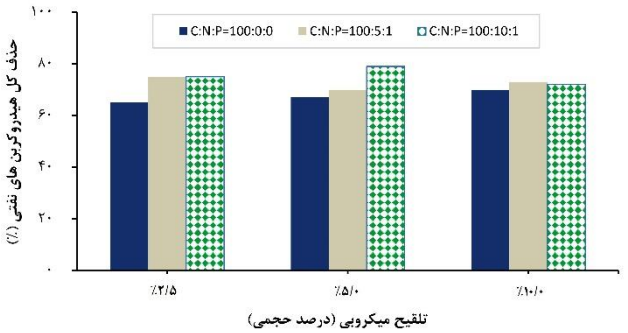
همانطور که مشاهده می‌شود با افزایش میزان باکتری تلقیح شده به خاک نرخ تنفس برای اکثر آزمایش‌ها با افزایش همراه بوده است. در هنگام تلقیح به میزان ۲/۵٪ با افزایش میزان مواد مغذی در ابتدا نرخ تنفس افزایش و سپس کاهش یافته که دلیل آن را می‌توان به مناسب بودن میزان مواد مغذی مورد نیاز جمعیت میکروبی در هنگام استفاده از نسبت ۱۰۰:۵:۱ در مقایسه با دو نسبت دیگر مرتبط دانست. در ادامه با افزایش میزان تلقیح و به تبع آن افزایش جمعیت میکروبی، نیاز به مواد مغذی افزایش یافته و بنابراین با افزایش نسبت مواد مغذی، نرخ تنفس میکروبی نیز با افزایش همراه بوده است. عدم تناسب افزایش نرخ تنفس میکروبی در هنگام افزایش تلقیح میکروبی از ۵٪ به ۱۰٪ را می‌توان به محدودیت در منبع کربن قابل دسترس توسط جمعیت میکروبی مرتبط دانست.



شکل ۳: تأثیر میزان تلقیح بر نرخ تنفس میکروبی تجمعی در طی ۷۰ روز
($4000\ mg_{Diesel}/kg_{Soil}$ و رطوبت ٪۱۲ وزنی)

از آنجائیکه حذف کل هیدروکربن‌های نفتی به عنوان مبنای پاکسازی خاک در این تحقیق مد نظر بوده بنابراین راندمان حذف TPH از خاک در پایان دوره هفتاد روزه نیز مورد اندازه‌گیری قرار گرفت که نتایج مربوطه در شکل (۴) آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود بیشترین راندمان حذف به میزان ٪۷۹ مربوط به هنگام استفاده از مواد مغذی با نسبت ۱۰۰:۱۰:۱ و تلقیح میکروبی اولیه ٪۵ بوده که با نتایج مربوط به نرخ تنفس میکروبی در شکل‌های ۲ و ۳ مطابقت دارد. در تحقیقی مشابه افزایش راندمان حذف TPH از خاک آلوده با افزودن مواد مغذی گزارش شده است[۳۷].

در تحقیقی دیگر در پاکسازی میکروبی خاک آلوده به ترکیبات نفتی، تحریک زیستی با استفاده از مواد مغذی و گیرنده‌های الکترون باعث تغییرات عمیق در جوامع باکتریایی، آرکی‌باکترها و قارچی خاک از نظر فعالیت، فراوانی و تنوع زیستی و در نهایت بهبود فعالیت میکروبی خاک شده است[۳۸].

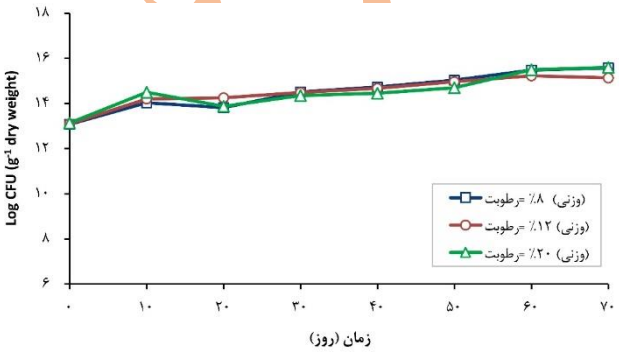


شکل ۴: تأثیر میزان تلقیح اولیه بر راندمان حذف TPH در طی ۷۰ روز

(mg_{Diesel} / kg_{Soil} ۴۰۰۰ و رطوبت ٪۱۲ وزنی)

۳-۲ تأثیر رطوبت بر عملکرد فرایند

به منظور بررسی تأثیر رطوبت محیط بر راندمان حذف بیولوژیکی سوخت دیزل، آزمایش‌ها در سه سطح رطوبت ٪۸، ٪۱۲ (ظرفیت نگه‌داری آب در خاک[۱۰]) و ٪۲۰ وزنی تکرار شد که نتایج مربوطه در شکل‌های (۵) تا (۷) آورده شده است. همانطور که در شکل (۵) مشاهده می‌شود در تمامی درصد رطوبت های مورد آزمایش، رشد نسبی جمعیت باکتری‌ها یکسان بوده و افزایش میزان رطوبت محیط خاک، در طی دوره آزمایش تاثیر قابل توجهی بر جمعیت میکروبی نداشته است.

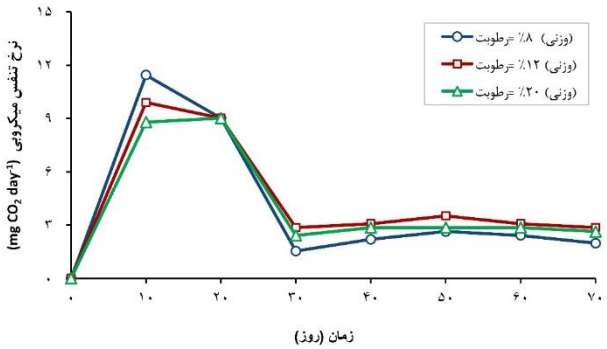


شکل ۵: تأثیر میزان رطوبت بر جمعیت میکروبی

($C:N:P$ =۱۰۰:۱۰:۱، ٪۵ حجمی باکتری، ۴۰۰۰ mg_{Diesel} / kg_{Soil})

تنفس میکروبی خاک پارامتر دیگری است که در خلال بررسی اثر رطوبت بر تجزیه زیستی سوخت دیزل مورد بررسی قرار گرفت. چنانچه در شکل (۶) ملاحظه می‌شود، در ابتدای فرایند (۱۰ روز اول)، با افزایش رطوبت محیط، میزان تنفس میکروبی خاک کاهش یافته است. احتمال می‌رود با افزایش رطوبت محیط و پر شدن منافذ خاک از آب، میزان نفوذ اکسیژن در ماتریس خاک کاهش یافته و به دنبال آن تنفس میکروارگانیسم های موجود در خاک کاهش یافته باشد. در ادامه از روز بیستم به بعد، میزان CO_2 تولیدی هر سه نمونه تقریباً به یک اندازه رسیده و در ۵۰ روز بعدی روندی مشابه را طی کرده است. دلیل کاهش جزئی نرخ تنفس میکروبی در رطوبت ٪۸ از روز سی‌ام به بعد در مقایسه با سایر رطوبت‌ها را می‌توان به مصرف بیشتر مواد آلی در ۳۰ روز اول فرایند و کاهش مواد آلی قابل تجزیه موجود در محیط در ادامه فرایند مرتبط دانست.

همچنین از روز دهم به مدت ۲۰ روز، نرخ تنفس میکروبی خاک با افت شدیدی مواجه شده است. چنانچه قبلا نیز بیان شد، در ۲۰ روز اول فرایند، بخش قابل توجهی از هیدروکربن‌های ساده و راست‌زنجیر توسط میکروارگانیسم‌های نفت‌خوار تجزیه شده و پس از آن میکروارگانیسم‌ها ملزم به مصرف ترکیبات پیچیده‌تری نظیر هیدروکربن های آروماتیک با وزن مولکولی بالا هستند که این امر موجب اختلال در متابولیسم میکروب و در نتیجه افت تولید CO_2 می‌شود. در زیست پالایی خاک‌های آلوده به گازوئیل در بیوراکتور حاوی لجن فعال خام و ورمی کمپوست، حذف کامل هیدروکربن‌های سبک و حذف ٪۷۰ و ٪۶۸ به ترتیب هیدروکربن‌های متوسط و سنگین در بازه زمانی ۹۰ روزه گزارش شده است[۳۹].



شکل ۶: تأثیر میزان درصد رطوبت بر نرخ تنفس میکروبی خاک

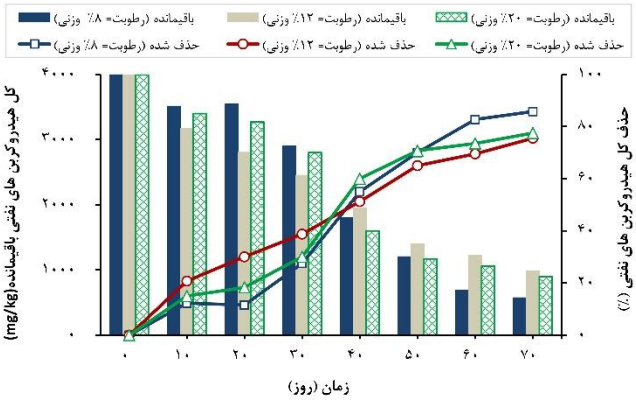
($C:N:P$ =۱۰۰:۱۰:۱، ٪۵ حجمی باکتری، ۴۰۰۰ mg_{Diesel} / kg_{Soil})

تأثیر میزان رطوبت بر حذف TPH از خاک نیز در شکل (۷) با یکدیگر شده است. همانطور که مشاهده می‌شود بیشترین راندمان حذف TPH پس از هفتاد روز به میزان ٪۸۶ مربوط به رطوبت ٪۸ وزنی می‌باشد. به طور کلی رطوبت بهینه فرایند های میکروبی در محدوده ٪۶۰-٪۴۰ حداکثر ظرفیت نگهداری آب در خاک می باشد [۴۰]. کمبود رطوبت محیط، متابولیسم و رشد میکروبی را محدود می‌کند. مقادیر بالای آب نیز نفوذ جریان هوا در خاک را کاهش می‌دهد [۴۱]. در تحقیق حاضر نیز بهترین عملکرد سیستم در

[۱۰] Field Capacity

رطوبت ۸٪ که نزدیک‌تر به ۶۰٪ ظرفیت نگهداری آب در خاک مورد استفاده در مقایسه با دو حالت دیگر می‌باشد حاصل شده است.

با توجه به راندمان بالای حذف TPH، نرخ مناسب تنفس میکروبی و نیز جمعیت میکروبی نهایی کافی، رطوبت ۸٪ وزنی، مقدار ماده مغذی $C:N:P$ =۱۰۰:۱۰:۱ و تلقیح باکتری به میزان ۵٪ حجمی به عنوان مقادیر بهینه پالایش بیولوژیکی خاک آلوده به گازوئیل به روش تقویت و تحریک زیستی انتخاب شد.

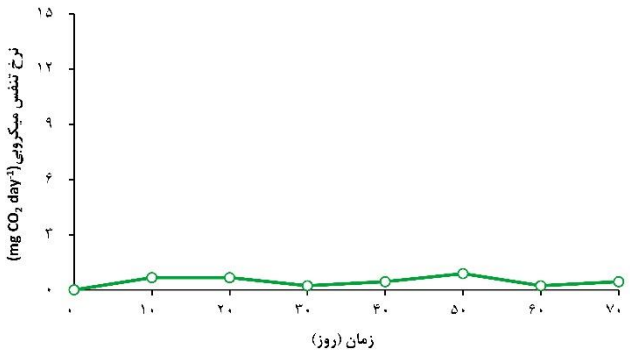


شکل ۷: تأثیر میزان رطوبت بر حذف TPH ازخاک

(mg_{Diesel} / kg_{Soil} ۴۰۰۰، ٪۵ حجمی باکتری، $C:N:P$ =۱۰۰:۱۰:۱)

۳-۳ آزمایش‌های شاهد

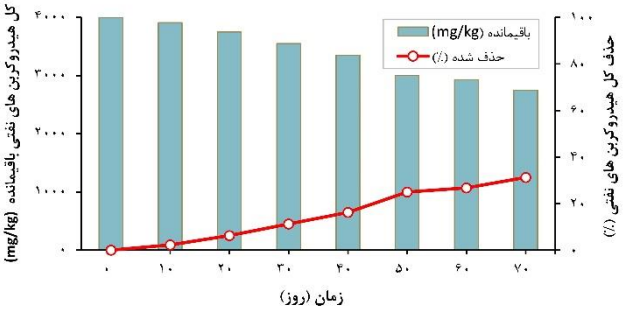
به منظور تعیین سهم تقویت و تحریک زیستی در عملکرد سیستم و ارزیابی افت های احتمالی ناشی از تبخیر و نیز بررسی اثر تضعیف طبیعی آلاینده، آزمایش در شرایط بهینه بدست آمده از مراحل قبل و بدون تلقیح باکتری *سودوموناس پوتیدا* (بدون تقویت زیستی) و بدون افزودن مواد مغذی (بدون تحریک زیستی) تکرار شد. همانطور که در شکل (۸) نشان داده شده در طی انجام این آزمایش‌ها تنفس میکروبی سیستم ناچیز و کمتر از $mg\ CO_2 / day$ ۱ بود است (حداکثر مقدار تنفس میکروبی نمونه برابر با $mg\ CO_2 / day$ ۰/۸۸ و در روز پنجاهم حاصل شد)، که این میزان فعالیت را می‌توان به آلوده شدن خاک به میکروارگانیسم‌های بومی در طی انجام آزمایش‌ها نسبت داد.



شکل ۸: نرخ تنفس میکروبی نمونه شاهد بیولوژیکی

(mg_{Diesel} / kg_{Soil} ۴۰۰۰، $C:N:P$ =۱۰۰:۰:۰ ، رطوبت ۱۲٪ وزنی)

در ادامه، روند تغییرات میزان آلودگی خاک در طی فرایند نیز مورد بررسی قرار گرفت که نتایج مربوطه در شکل (۹) ارائه شده است. همانطور که مشاهده می‌شود بر اثر فعالیت میکرو ارگانیسم‌های ناچیز بومی خاک، تبخیر احتمالی آلاینده و همچنین جذب آلاینده به ذرات خاک، TPH نمونه شاهد در طی هفتاد روز، به میزان ۳۰٪ کاهش داشته که با راندمان ۸۶ درصدی در هنگام استفاده همزمان از تقویت و تحریک زیستی اختلاف قابل توجهی دارد.



شکل ۹: تغییرات TPH نمونه شاهد بیولوژیکی

(mg_{Diesel} / kg_{Soil} ۴۰۰۰، $C:N:P$ =۱۰۰:۰:۰ ، رطوبت ۱۲٪ وزنی)

با توجه به نتایج بدست آمده فرایند تقویت و تحریک زیستی همزمان با استفاده از سویه *سودوموناس پوتیدا* روشی مناسب جهت پاکسازی خاک‌های آلوده به گازوئیل ارزیابی می‌شود.

۴- نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر اثر عوامل مختلف بر تصفیه زیستی خاک آلوده

به گازوئیل، به روش تقویت و تحریک زیستی با استفاده از کشت میکروبی خالص مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه که در مقیاس آزمایشگاهی انجام پذیرفت تاثیر میزان رطوبت، مواد مغذی و میکروارگانیسم تلقیحی به محیط خاک بر راندمان حذف کل هیدروکربن های نفتی (TPH) از خاک ارزیابی شد. بدین منظور از میکروارگانیسم *سودوموناس پوتیدا* کشت یافته در محیط مایع به عنوان گونه میکروبی و آمونیوم نیترات و پتاسیم دی هیدروژن فسفات به ترتیب به عنوان منبع نیتروژن و فسفر استفاده شد. نتایج بدست آمده حاکی از آن است که افزایش مواد مغذی در دسترس گونه باکتری، موجب بهبود نرخ رشد جمعیت میکروبی خاک و به دنبال آن افزایش راندمان حذف آلاینده نفتی می‌شود. با توجه به نرخ مناسب تنفس میکروبی و نیز جمعیت میکروبی نهایی کافی، رطوبت ۸٪ وزنی، نسبت مواد مغذی ($C:N:P$) معادل ۱۰۰:۱۰:۱ و تلقیح باکتری به میزان ۵٪ حجمی به‌عنوان مقادیر بهینه پاکسازی بیولوژیکی خاک آلوده به گازوئیل به‌روش تقویت و تحریک زیستی انتخاب شد. در این شرایط پس از هفتاد روز راندمان حذف TPH از خاک آلوده به $4000\ mg/kg$ گازوئیل، معادل با ۸۶ درصد حاصل شد. مقایسه نتایج بدست آمده در شرایط بهینه با نتایج آزمایش‌های شاهد بیانگر افزایش راندمان ۱۸۷ درصدی حذف آلاینده از طریق تقویت و تحریک زیستی می‌باشد. با توجه به نتایج بدست آمده فرایند تقویت و تحریک زیستی همزمان با استفاده از سویه *سودوموناس پوتیدا* روشی مناسب جهت پاکسازی خاک‌های آلوده به گازوئیل ارزیابی می‌شود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس و در آزمایشگاه محیط زیست دانشکده مهندسی عمران و محیط‌زیست این دانشگاه انجام پذیرفته است. بدینوسیله از دانشگاه تربیت مدرس به جهت در اختیار قرار دادن امکانات اجرای این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

[۱] Lee, J., Kim, H.S., Jo, H.Y. and Kwon, M.J., ۲۰۲۱. Revisiting soil bacterial counting methods: optimal soil storage and pretreatment methods and comparison of culture-dependent and-independent methods. PLoS One, ۱۶(۲), p.e۰۲۴۶۱۴۲. https://doi.org/۱۰,۱۳۷۱/journal.pone.۰۲۴۶۱۴۲

[۲] Sarkar, D., Ferguson, M., Datta, R. and Birnbaum, S., ۲۰۰۵. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. Environmental pollution, ۱۳۶(۱), pp.۱۸۷-۱۹۵. https://doi.org/۱۰,۱۰۱۶/j.envpol.۲۰۰۴,۰۹,۰۲۵

[۳] Wolicka, D., Suszek, A., Borkowski, A. and Bielecka, A., ۲۰۰۹. Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products. Bioresource Technology, ۱۰۰(۱۳), pp.۳۲۲۱-۳۲۲۷.https://doi.org/۱۰,۱۰۱۶/j.biortech.۲۰۰۹,۰۲,۰۲۰

[۴] Abdollahinejad, B., Pasalari, H., Jafari, A.J., Esrafili, A. and Farzadkia, M., ۲۰۲۰. Bioremediation of diesel and gasoline-contaminated soil by co-vermicomposting amended with activated sludge: Diesel and gasoline degradation and kinetics. Environmental Pollution, ۲۶۳, p.۱۱۴۵۸۴. https://doi.org/۱۰,۱۰۱۶/j.envpol.۲۰۲۰,۱۱۴۵۸۴

[۵] Taccari, M., Milanovic, V., Comitini, F., Casucci, C. and Ciani, M., ۲۰۱۲. Effects of biostimulation and bioaugmentation on diesel removal and bacterial community. International Biodeterioration & Biodegradation, ۶۶(۱), pp.۳۹-۴۶. https://doi.org/۱۰,۱۰۱۶/j.ibiod.۲۰۱۱,۰۹,۰۱۲

[۶] Gallego, J.L., Loredo, J., Llamas, J.F., Vázquez, F. and Sánchez, J., ۲۰۰۱. Bioremediation of diesel-contaminated soils: evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. Biodegradation, ۱۲, pp.۳۲۵-۳۳۵.https://doi.org/۱۰,۱۰۲۳/A:۱۰۱۴۳۹۷۷۳۲۴۳۵

[۷] Yu, D.Y., Kang, N., Bae, W. and Banks, M.K., ۲۰۰۷. Characteristics in oxidative degradation by ozone for saturated hydrocarbons in soil contaminated with diesel fuel. Chemosphere, ۶۶(۵), pp.۷۹۹-۸۰۷.https://doi.org/۱۰,۱۰۱۶/j.chemosphere.۲۰۰۶,۰۶,۰۵۳

[۸] Scullion, J., ۲۰۰۶. Remediating polluted soils. Naturwissenschaften, ۹۳(۲), pp.۵۱-۶۵.https://doi.org/۱۰,۱۰۰۷/s۰۰۱۱۴-۰۰۵-۰۰۷۹-۵

[۹] Brejea, R., Boroș, M., Roșca, S., Traian, J.E., Budău, R., Borza, I.M. and Păcurar, I., ۲۰۲۳. Bioremediation of Oil Contaminated Soil and Restoration of Land Historically Polluted with Oil Products in the Agricultural Circuit in the Plain and Western Hills, Romania. Applied Sciences, ۱۳(۱۸), p.۱۰۲۴۵.. https://doi.org/۱۰,۳۳۹۰/app۱۳۱۸۱۰۲۴۵

[۱۰] Koshlaf, E. and Ball, A.S., ۲۰۱۷. Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments. AIMS microbiology, ۳(۱), p.۲۵. https://doi.org/۱۰,۳۹۳۴/microbiol.۲۰۱۷,۱,۲۵

[۱۱] National Research Council, Global Affairs, Technology for Sustainability Program and Committee on Incorporating Sustainability in the US Environmental

bioremediation of oil-contaminated soil. Journal of Hazardous Materials, ۱۷۶(۱-۳), pp.۲۷-۳۴. https://doi.org/۱۰,۱۰۱۶/j.jhazmat.۲۰۰۹,۱۰,۰۸۰

[۲۱] Liu, P.W.G., Chang, T.C., Whang, L.M., Kao, C.H., Pan, P.T. and Cheng, S.S., ۲۰۱۱. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: effects of strategies and microbial community shift. International Biodeterioration & Biodegradation, ۶۵(۸), pp.۱۱۱۹-۱۱۲۷. https://doi.org/۱۰,۱۰۱۶/j.ibiod.۲۰۱۱,۰۹,۰۰۲

[۲۲] Zhang, B., Zhang, L. and Zhang, X., ۲۰۱۹. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by petroleum-degrading bacteria immobilized on biochar. RSC advances, ۹(۶۰), pp.۳۵۳۰۴-۳۵۳۱۱.https://doi.org/۱۰,۱۰۳۹/C۹RA۰۶۷۲۶D

[۲۳] Sun, G.D., Xu, Y., Jin, J.H., Zhong, Z.P., Liu, Y., Luo, M. and Liu, Z.P., ۲۰۱۲. Pilot scale ex-situ bioremediation of heavily PAHs-contaminated soil by indigenous microorganisms and bioaugmentation by a PAHs-degrading and bioemulsifier-producing strain. Journal of hazardous materials, ۲۳۳, pp.۷۲-۷۸.https://doi.org/۱۰,۱۰۱۶/j.jhazmat.۲۰۱۲,۰۶,۰۶۰

[۲۴] Mohsenzadeh, F. and Ahmadi Masoud, N., ۲۰۱۲. A Study on potential microbial removal of diesel oil from contaminated soil in Hamedan city. Biological Journal of Microorganism, ۱(۲), pp.۷۷-۸۶. [In Persian]

[۲۵] Hosseini, M., Akhavan Sepahi, A., and Salehi, M., (۲۰۱۶). Evaluation of the Bio-Augmentation technique in the bioremediation process of diesel contaminated soils. Petroleum research, ۲۵(۸۵-۲), ۱۲۳-۱۳۱. [In Persian] http://doi.org/۱۰,۲۲۰۷۸/pr.۲۰۱۶,۶۰۲

[۲۶] Ebrahimi, M., Fallah, A. and Sarikhani, M.R., ۲۰۱۳. Isolation and identification of oil-degrading bacteria from oil-polluted soils and assessment of their growth in the presence of gas oil. Water and soil science, ۲۳(۱), pp.۱۰۹-۱۲۱. [In Persian]

[۲۷] Sadighbayan, K.H., Assadi, M.M., Farazmand, A., Monadi, A.R. and Aliasgharzad, N., ۲۰۱۶. Evaluation of biodegradation of petroleum aromatic compounds with soil microorganisms in Tabriz city. Journal of Natural Environment, ۶۹(۳), pp.۷۵۷-۷۷۱. [In Persian]

[۲۸] Momeni, M., Farzadkia, M., Esrafili, A. and Kermani, M., ۲۰۱۸. Bioremediation of Soils Contaminated with Diesel Using Bio-stimulation Method in the Bioreactors of Vermicompost and Activated Sludge. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences, ۲۷(۱۵۸), pp.۱۷۹-۱۹۲.[In Persian]

[۲۹] Feng, L., Jiang, X., Huang, Y., Wen, D., Fu, T., & Fu, R. (۲۰۲۱). Petroleum hydrocarbon-contaminated soil bioremediation assisted by isolated bacterial consortium and sophorolipid. Environmental Pollution, ۲۷۳, ۱۱۶۴۷۶.https://doi.org/۱۰,۱۰۱۶/j.envpol.۲۰۲۱,۱۱۶۴۷

Protection Agency, ۲۰۱۱. Sustainability and the US EPA. National Academies Press.

[۱۲] Liu, C.J., Deng, S.G., Hu, C.Y., Gao, P., Khan, E., Yu, C.P. and Ma, L.Q., ۲۰۲۳. Applications of bioremediation and phytoremediation in contaminated soils and waters: CREST publications during ۲۰۱۸–۲۰۲۲. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, ۵۳(۶), pp.۷۲۳-۷۳۲. https://doi.org/۱۰,۱۰۸۰/۱۰۶۴۳۳۸۹,۲۰۲۳,۲۱۶۸۳۶۵

[۱۳] Ajona, M. and Vasanthi, P., ۲۰۲۱. Bioremediation of petroleum contaminated soils–A review. Materials Today: Proceedings, ۴۵, pp.۷۱۱۷-۷۱۲۲. https://doi.org/۱۰,۱۰۱۶/j.matpr.۲۰۲۱,۰۱,۹۴۹

[۱۴Mekonnen, B.A., Aragaw, T.A. and Genet, M.B., ۲۰۲۴. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: a review on principles, degradation mechanisms, and advancements. Frontiers in Environmental Science, ۱۲, p.۱۳۵۴۴۲۲. https://doi.org/۱۰,۳۳۸۹/fenvs.۲۰۲۴,۱۳۵۴۴۲۲

[۱۵] Szulc, A., Ambrożewicz, D., Sydow, M., Ławniczak, Ł., Piotrowska-Cyplik, A., Marecik, R. and Chrzanowski, Ł., ۲۰۱۴. The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: feasibility during field studies. Journal of environmental management, ۱۳۲, pp.۱۲۱-۱۲۸.https://doi.org/۱۰,۱۰۱۶/j.jenvman.۲۰۱۳,۱۱,۰۰۶

[۱۶] Alisi, C., Musella, R., Tasso, F., Ubaldi, C., Manzo, S., Cremisini, C. and Sprocati, A.R., ۲۰۰۹. Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance. Science of the Total Environment, ۴۰۷(۸), pp.۳۰۲۴-۳۰۳۲.https://doi.org/۱۰,۱۰۱۶/j.scitotenv.۲۰۰۹,۰۱,۰۱۱

[۱۷] Agarry, S. and Latinwo, G.K., ۲۰۱۵. Biodegradation of diesel oil in soil and its enhancement by application of bioventing and amendment with brewery waste effluents as biostimulation-bioaugmentation agents. Journal of Ecological Engineering, ۱۶(۲).https://doi.org/۱۰,۱۲۹۱۱/۲۲۹۹۸۹۹۳/۱۸۶۱

[۱۸] Xu, Y. and Lu, M., ۲۰۱۰. Bioremediation of crude oil-contaminated soil: comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. Journal of hazardous materials, ۱۸۳(۱-۳), pp.۳۹۵-۴۰۱.https://doi.org/۱۰,۱۰۱۶/j.jhazmat.۲۰۱۰,۰۷,۰۳۸

[۱۹] Bento, F.M., Camargo, F.A., Okeke, B.C. and Frankenberger, W.T., ۲۰۰۵. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. Bioresource technology, ۹۶(۹), pp.۱۰۴۹-۱۰۵۵. https://doi.org/۱۰,۱۰۱۶/j.biortech.۲۰۰۴,۰۹,۰۰۸

[۲۰] Lin, T.C., Pan, P.T. and Cheng, S.S., ۲۰۱۰. Ex situ

۶
[۳۰] Sarikhani, M.R., Afsharnia, M. and Zarei, M., ۲۰۲۲. Isolation of oil degrading bacteria from oil contaminated soil around the oil refinery and petrochemical plants of Tabriz and identification of the efficient bacteria. Water and Soil Science, ۳۲(۴), pp.۹۱-۱۰۴. https://doi.org/۱۰,۲۲۰۳۴/ws.۲۰۲۱,۴۵۰۲۳,۲۴۰۸ [In Persian]
[۳۱] Obayori, O.S., Ilori, M.O., Adebusoye, S.A., Oyetibo, G.O., Omotayo, A.E. and Amund, O.O., ۲۰۰۹. Degradation of hydrocarbons and biosurfactant production by Pseudomonas sp. strain LP۱. World Journal of Microbiology and Biotechnology, ۲۵, pp.۱۶۱۵-۱۶۲۳. https://doi.org/۱۰,۱۰۰۷/s۱۱۲۷۴-۰۰۹-۰۰۵۳-z
[۳۲] Sunar, N.M., Emparan, Q., Abdul Karim, A.T., Noor, S.F.M., Maslan, M., Mustafa, F. and Khaled, N., ۲۰۱۴. The effectiveness of bioremediation treatment for diesel-soil contamination. Advanced Materials Research, ۸۴۵, pp.۱۴۶-۱۵۲. https://doi.org/۱۰,۴۰۲۸/www.scientific.net/AMR.۸۴۵.۱۴۶
[۳۳] United States. Division of Soil Survey, ۱۹۹۳. Soil survey manual (No. ۱۸). US Department of Agriculture.
[۳۴] Hung, Y.T., Wang, L.K. and Shammas, N.K. eds., ۲۰۱۲. Handbook of environment and waste management: air and water pollution control (Vol. ۱). World Scientific.
[۳۵] Margesin, R., Zimmerbauer, A. and Schinner, F., ۲۰۰۰. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. Chemosphere, ۴۰(۴), pp.۳۳۹-۳۴۶. https://doi.org/۱۰,۱۰۱۶/S۰۰۴۵-۶۵۳۵(۹۹)۰۰۲۱۸-۰
[۳۶] Becker, S., Böger, P., Oehlmann, R. and Ernst, A., ۲۰۰۰. PCR bias in ecological analysis: a case study for quantitative Taq nuclease assays in analyses of microbial communities. Applied and Environmental Microbiology, ۶۶(۱۱), pp.۴۹۴۵-۴۹۵۳. https://doi.org/۱۰,۱۱۲۸/AEM.۶۶,۱۱,۴۹۴۵-۴۹۵۳,۲۰
[۳۷] Dadrasnia, A.R.E.Z.O.O. and Agamuthu, P.A.R.I.A.T.A.M.B.Y., ۲۰۱۳. Dynamics of diesel fuel degradation in contaminated soil using organic wastes. International Journal of Environmental Science and Technology, ۱۰, pp.۷۶۹-۷۷۸. https://doi.org/۱۰,۱۰۰۷/s۱۳۷۶۲-۰۱۳-۰۲۲۴-۱
[۳۸] Abdollahinejad, B., Pasalari, H. and Farzadkia, M., ۲۰۲۳. Bioaugmentation and biostimulation methods for the decontamination of soils contaminated with petroleum compounds: a systematic review. Iranian Journal of Health and Environment, ۱۶(۱), pp.۱۹۵-۲۲۸. [In Persian] https://dorl.net/dor/۲۰,۱۰۰۱,۱,۲۰۰۸۲۰۲۹,۱۴۰۲,۱۶,۱,۱۲,۸
[۳۹] Abdollahinejad, B., Farzadkia, M., Jafari, A.J. and Esrafili, A., ۲۰۱۹. Bioremediation of soils contaminated with gasoline in bioreactors containing earthworms Eisenia Fetida and mixture of vermicompost and raw activated sludge. Journal of Environmental Health Engineering, ۷(۱), pp.۵۳-۶۸. [In Persian] https://doi.org/۱۰,۲۹۲۵۲/jehe.۷,۱,۵۳
[۴۰] Margesin, R. and Schinner, F. eds., ۲۰۰۵. Manual for soil analysis-monitoring and assessing soil bioremediation (Vol. ۵). Springer Science & Business Media.
[۴۱] Tyagi, M., da Fonseca, M.M.R. and de Carvalho, C.C., ۲۰۱۱. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. Biodegradation, ۲۲, pp.۲۳۱-۲۴۱. https://doi.org/۱۰,۱۰۰۷/s۱۰۵۳۲-۰۱۰-۹۳۹۴-۴

ویرایشگاری نشده