Sharif Civil Engineering Journal (2025), **41**(3), 13-23

Sharif University of Technology

Sharif Civil Engineering Journal

https://sjce.journals.sharif.edu



Research Article

Bioremediation of Diesel-Contaminated Soil Using Simultaneous Bioaugmentation and Bio-Stimulation Processes

Samira Karim[1], Nader Mokhtarani*[1,2] and Seyedeh Bahareh Azimi[3]

[1]Faculty of Civil and Environmental Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[2] Environmental Research Institute, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[3] Environment and Sustainable Development Research Institute, Iran Environmental Protection Organization, Tehran, Iran.
* corresponding author:(mokhtarani@modares.ac.ir)

Article Info

Article history:

Received: 16 June 2024

Revised: 27 August 2024

Accepted: 10 September 2024

Keywords:

Bioremediation,
soil,
diesel,
bioaugmentation,
biostimulation,
pseudomonas putida.

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 4000 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, 8% by weight humidity, the nutrient ratio of 100:10:1, and 5% 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 86%.

Funding: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Author Contributions: All authors contributed to the reported work for conceptualization, methodology, validation, writing-review and editing, and supervision.

To Cite this article:
Karim, S., Mokhtarani, N. and Azimi, S.B. 2025. Bioremediation of diesel-contaminated soil using simultaneous bioaugmentation and bio-stimulation processes, Sharif Civil Engineering Journal, **41**(3), 13-23.
https://doi.org/10.24200/j30.2024.64744.3340

E-ISSN: 2676-4776 © 2025 The Author(s). Sharif Civil Engineering Journal, Published by Sharif University of Technology

This is an open access article under the CC-BY 4.0 license.

مجله علمی مهندسی عمران شریف

https://sjce.journals.sharif.edu

مقاله‌ی پژوهشی

زیست‌پالایی خاک آلوده به گازوئیل با استفاده از تقویت و تحریک‌زیستی هم‌زمان

سمیرا کریم[۱]، نادر مختارانی*[۱و۲] و سیده بهاره عظیمی[۳]

[۱] دانشکده‌ی مهندسی عمران و محیط‌زیست، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

[۲] پژوهشکده‌ی محیط‌زیست، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

[۳] پژوهشکده‌ی محیط‌زیست و توسعه‌ی پایدار، سازمان حفاظت محیط‌زیست، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول (mokhtarani@modares.ac.ir)

اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت : ۱۴۰۳/۰۳/۲۷

تاریخ اصلاحیه : ۱۴۰۳/۰۶/۰۶

تاریخ پذیرش : ۱۴۰۳/۰۶/۲۰

واژگان کلیدی:

پالایش زیستی،

پاک‌سازی خاک،

تقویت‌زیستی،

تحریک‌زیستی،

سودوموناس پوتیدا.

چکیده

آلاینده‌های نفتی از طریق عوامل متعددی وارد محیط‌زیست می‌شوند. هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی اثر عوامل مختلف، شامل: میزان رطوبت، مواد مغذی، و میکروارگانیسم تلقیحی در پالایش‌زیستی خاک ماسه‌ای آلوده به ۴۰۰۰ (mg/kg) گازوئیل بوده است. در پژوهش حاضر، از سویه‌ی سودوموناس پوتیدا کشت‌یافته در محیط مایع به‌عنوان گونه‌ی میکروبی و آمونیوم نیترات و پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات به‌ترتیب به‌عنوان منبع نیتروژن و فسفر استفاده شده است. نتایج نشان داده است که افزایش مواد مغذی در دسترس گونه‌ی باکتری، موجب بهبود نرخ رشد جمعیت میکروبی خاک و به دنبال آن، افزایش راندمان حذف آلاینده‌ی نفتی شده است. با توجه 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 شده است. در شرایط ذکرشده طی ۷۰ روز، راندمان حذف TPH به میزان ۸۶٪ به‌دست آمده است.

۱. مقدمه

در حین اکتشاف، بهره‌برداری، پالایش، ذخیره‌سازی، و حمل‌ونقل نفت، ممکن است خاک به دلیل عملیات نادرست و یا نشت تصادفی به ترکیب‌های نفتی آلوده شود.[۱] با توجه به اینکه نفت خام و مشتق‌های آن حاوی هیدروکربن‌های آلیفاتیک و آروماتیک، رزین‌ها، آسفالتین‌ها، و همچنین مواد شیمیایی خطرناکی نظیر: بنزن، تولوئن، اتیل بنزن، و نفتالن هستند؛ انتشار آلاینده‌های نفتی، خطری بالقوه برای سلامت انسان، حیوانات، و گیاهان به‌حساب می‌آید.[۲ و ۳] ترکیب‌های مذکور به‌دلیل داشتن مولکول‌های پیچیده، سمّیت، قابلیت سرطان‌زایی، ماندگاری طبیعی، و پراکندگی گسترده، موجب نگرانی‌های جدی در حوزه‌ی بهداشت و محیط‌زیست می‌شوند.[۴] از میان مشتق‌های نفتی، گازوئیل، نفت گاز، یا سوخت دیزل به‌عنوان مهم‌ترین آلاینده‌های نفتی، همواره در گزارش‌های محیط‌زیستی مورد توجه بوده‌اند.[۵] گازوئیل ترکیب پیچیده‌ای از آلکان‌های نرمال، شاخه‌ای، حلقوی، و ترکیب‌های آروماتیک حاصل از کسر میان‌تقطیر در هنگام جداسازی نفت است.[۶] آلکان‌ها بخش اعظم گازوئیل را تشکیل می‌دهند، ولی حدود ۴٪ از آن نیز مربوط به ترکیب‌های آروماتیک است.[۵] گازوئیل تجاری، عمدتاً شامل ۸۰٪ آلکان است، که نیمی از آن‌ها، آلکان‌های نرمال و نیمی دیگر آلکان‌های حلقوی هستند.[۷]

برای برطرف‌ساختن آلاینده‌های نفتی، راه‌حل‌های زیستی و غیرزیستی متنوعی وجود دارند، که به‌صورت خارج از محل و یا درجا انجام‌پذیر هستند.[۸] در این میان، زیست‌پالایی که در آن از میکروارگانیسم‌ها برای تجزیه‌ی آلاینده‌های آلی استفاده می‌شود، یکی از روش‌های بسیار کارآمد پاک‌سازی خاک‌های آلوده به ترکیب‌های شیمیایی به‌شمار می‌رود.[۹] زیست‌پالایی یک فناوری نوظهور پایدار و اقتصادی برای بیشینه‌ساختن متابولیسم آلاینده‌های آلی به‌خصوص ترکیب‌های نفتی و کمینه‌سازی آثار اکولوژیکی ناشی از نشت آن‌هاست. فرایند اخیر متکی بر فعالیت‌های متابولیک میکروبی در حضور عوامل اکولوژیکی بهینه و مواد مغذی لازم برای تبدیل آلاینده‌های آلی، مانند هیدروکربن‌های پتروژنیک به ترکیب‌های بی‌خطر است.[۱۰] از مزایای روش زیست‌پالایی به نسبت دیگر روش‌های پاک‌سازی، می‌توان به ساده‌بودن نسبی تکنولوژی، امکان استفاده‌ی هم‌زمان با سایر روش‌های فیزیکی و شیمیایی، پایین‌بودن نسبی هزینه‌های جاری اولیه، امکان تخریب کامل آلاینده‌ها، و بی‌نیازی به تجهیزات تخصصی اشاره کرد.[۱۱-۱۳]

امروزه به‌دلیل انتشار مقادیر زیادی هیدروکربن‌های نفتی در محیط‌زیست، چه به‌طورتصادفی از طریق صنایع نفت و یا در اثر فعالیت‌های انسانی، پاک‌سازی سایت‌های آلوده به یک چالش جهانی تبدیل شده است. اگرچه پاک‌سازی

استناد به این مقاله:

کریم، سمیرا، مختارانی، نادر و عظیمی، سید بهاره، ۱۴۰۴. زیست‌پالایی خاک آلوده به گازوئیل با استفاده از تقویت و تحریک‌زیستی هم‌زمان. مهندسی عمران شریف، ۴۱(۳)، صص.۱۳-۲۳. https://doi.org/10.24200/j30.2024.64744.3340

حق مولف © نویسندگان

ناشر: دانشگاه صنعتی شریف

شاپا الکترونیکی: ۲۶۷۶-۴۷۷۶

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 پژوهش دارد.[۱۴]

پاک‌سازی زیستی موفق خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی نیازمند استفاده‌ی راهبردی متناسب با محیط آلوده است. پژوهشگران تاکنون روش‌های متعددی را جهت تجزیه‌ی زیستی آلاینده‌های نفتی موجود در خاک پیشنهاد داده‌اند. از مهم‌ترین فرایندهای مرسوم در پاک‌سازی زیستی خاک می‌توان به تقویت‌زیستی (زیست‌فزونی)[۱]، تحریک‌زیستی[۲]، تهویه‌زیستی[۳]، گیاه‌پالایی[۴]، پاک‌سازی به روش کشت و کار زمین[۵] (اصلاح به‌صورت زمین کشاورزی)، فرایند کمپوست[۶]، و بیوراکتورهای فاز دوغابی[۷] اشاره کرد.[۱۵-۱۷]

میکروارگانیسم‌های دارای ژن‌های کاتابولیک مرتبط عمدتاً در تمامی محیط‌ها، اعم از محیط‌های غیرآلوده، وجود دارند. اما معمولاً در شرایط عادی، فراوانی نسبی میکروارگانیسم‌های کربن‌خوار در یک جمعیت میکروبی خاص، بسیار ناچیز و اندک است. این مسئله منجر به افت پتانسیل تجزیه‌زیستی خاک و به تبع آن نرخ پایین پالایش‌زیستی می‌شود. یکی از راهبردهای مؤثر غلبه بر مشکل اخیر، تلقیح میکروارگانیسم‌های انتخاب‌شده به محیط آلوده است. ایده‌ی تلقیح خاک با میکروب‌های با قابلیت بالای تجزیه، با هدف افزایش راندمان فرایند را «تقویت‌زیستی» می‌نامند.[۱۵]

تقویت‌زیستی در حقیقت راهبردی است که با تأمین جمعیت میکروبی مناسب، تجزیه‌زیستی را تکمیل می‌سازد. در چند سال اخیر، آلاینده‌های متعددی، نظیر: حشره‌کش‌ها، ترکیب‌های نفتی، و تعداد زیادی مواد شیمیایی آلی سمی به‌روش تقویت‌زیستی تصفیه شده‌اند.[۱۶] همان‌طور که اشاره شد، مبنای روش تقویت‌زیستی، اضافه‌کردن گونه‌های میکروبی و یا باکتریایی خاص به محیط آلوده است. میکروارگانیسم‌های بومی موجود در خاک، توانایی تجزیه‌ی محدوده‌ی وسیعی از مواد موجود در خاک را دارند، اما جمعیت و فعالیت آن‌ها در صورت وجود غلظت‌های زیاد مواد سمی تحت تأثیر قرار می‌گیرد. در این خصوص، میکروارگانیسم‌های غنی‌شده‌ی بومی یا غیربومی، تحمل بسیار بالاتری در برابر سمّیت از خود نشان می‌دهند و می‌توانند با راندمان به‌مراتب بالاتری، آلاینده‌های موجود در محیط را تجزیه کنند. در بسیاری از موارد، تقویت‌زیستی، راهبردی کارآمد در حذف آلاینده‌های خاک و پاک‌سازی محیط است. نکته‌ی کلیدی پاک‌سازی زیستی به‌روش تقویت‌زیستی، دست‌یابی به زیست‌توده با جمعیت باکتریایی فراوان است.[۱۸] مطالعات بسیاری مؤید این نکته است که افزایش زیست‌توده‌ی اولیه، با کاهش زمان موردنیاز برای سازگاری، موجب بهبود نرخ تجزیه‌زیستی آلاینده و به‌تبع آن افزایش راندمان تصفیه می‌شود.[۱۵]

در شرایطی که جمعیت تجزیه‌کننده‌ی آلاینده به اندازه‌ی کافی در محیط حضور دارد، ولی شرایط برای فعالیت آن‌ها مناسب نیست، با مساعدکردن شرایط محیطی می‌توان سرعت تجزیه‌زیستی آلاینده توسط میکروارگانیسم‌های موجود در محیط را افزایش داد، که به آن «تحریک‌زیستی» گفته می‌شود. افزودن مواد مغذی، نظیر نیتروژن و فسفر، روشی استاندارد در جهت افزایش راندمان تجزیه‌ی هیدروکربن‌ها به‌شمار می‌رود. درحقیقت، با اضافه‌کردن مواد مغذی مذکور، نسبت‌های $C:N$ و $C:P$ به مقادیر موردنیاز برای میکروارگانیسم‌ها نزدیک می‌شوند و عملکرد سیستم بهبود می‌یابد.[۱۹]

این تذکر لازم است که دو روش تقویت‌زیستی و تحریک‌زیستی را می‌توان به‌صورت مجزا یا توأم استفاده کرد.[۲۰ و ۲۱] فناوری‌های ترکیبی تقویت‌زیستی و تحریک‌زیستی نه فقط باکتری‌های فعال را به محیط خاک وارد می‌کنند، بلکه می‌توانند میکروارگانیسم‌های بومی را تحریک کنند، تا ویژگی خاک را بهبود بخشند.[۲۲] سان[۸] و همکاران (۲۰۱۲)، در پژوهشی کاربرد مجزا و هم‌زمان روش‌های تقویت‌زیستی و تحریک‌زیستی در تصفیه‌ی خاک آلوده به هیدروکربن آروماتیک چندحلقه‌ای (PAHs) را ارزیابی کرده و نشان داده‌اند که کاربرد هم‌زمان دو روش مذکور، موجب افزایش قابل‌توجه 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 در راندمان سیستم معنی‌دار تشخیص داده شده است.[۲۴] در حذف زیستی گازوئیل از خاک توسط تقویت‌زیستی، باسیل‌های گرم منفی اکسیداز مثبت (گونه‌ی پسودوموناس آئروژینوزا[۹]) به‌عنوان جمعیت غالب در فرایند شناسایی شده‌اند.[۲۵] ابراهیمی و همکاران (۲۰۱۳)، نیز با جداسازی و شناسایی ۱۹ سویه‌ی باکتری گرم منفی به نام‌های PDB۱-۱۹ از نمونه‌های خاک آلوده به مواد نفتی نشان داده‌اند، که باکتری‌های مذکور در حضور ترکیب‌های نفتی به‌صورت چشم‌گیری رشد می‌کنند.[۲۶] صدیق‌بایان[۱۰] و همکاران (۲۰۱۶)، به‌کارگیری میکروارگانیسم‌های جداشده از خاک‌های آلوده به مواد نفتی را جهت پاک‌سازی مناطق آلوده به ترکیب‌های آروماتیک نفتی با استفاده از روش زیست‌پالایی، مؤثر گزارش کرده‌اند.[۲۷]

در زیست‌پالایی خاک آلوده به گازوئیل به روش تحریک‌زیستی در بیورآکتورهای حاوی ورمی‌کمپوست با غلظت ۲۰٪ وزنی و لجن فعال با غلظت ۱۰٪ وزنی، میانگین راندمان حذف کل هیدروکربن‌های نفتی (TPH) به‌ترتیب به میزان ۴۰/۶۳ و ۳۲ درصد حاصل شده است.[۲۸] خلاصه‌ی نتایج حاصل از تعداد دیگری از مطالعات انجام‌شده درخصوص پاک‌سازی زیستی خاک‌های آلوده به مواد نفتی در جدول ۱ ارائه 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 محیط‌زیست است، و جداسازی و ارزیابی کارایی باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی نفت، نخستین گام در استفاده از روش اخیر است.[۳۰] در این میان، گونه‌ی میکروبی *سودوموناس پوتیدا* از جمله باکتری‌های نفت‌خوار است، که اغلب از مکان‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی استخراج می‌شود. تعدادی از اعضاء خانواده‌ی ذکرشده، میل شدیدی برای ترکیب با هیدروکربن‌ها دارند و قادر به تجزیه‌ی آلکان‌ها، آلیسیکلیک‌ها، تیوفن‌ها، و ترکیب‌های آروماتیک هستند.[۳۱] سویه‌ی *سودوموناس پوتیدا* به‌دلیل فقدان برخی ژن‌ها، از جمله آنزیم‌های تجزیه‌کننده‌ی دیواره‌ی سلولی، در رده‌ی باکتری غیربیماری‌زا به‌شمار می‌رود.

[1] Bioaugmentation
[2] Biostimulation
[3] Bioventing
[4] Phytoremediation
[5] Land Farming
[6] Composting
[7] Slurry Phase Bioreactors
[8] Sun
[9] Pseudomonas putida
[10] Sadighbayan

جدول ۱: نتایج سایر تحقیقات مربوط به پالایش زیستی خاک آلوده.

Pollutant	Initial Concentration (mg/kg)	Used Process	Time (day)	Removal Efficiency (%)	Reference
Diesel	2150	Bioaugmentation & Biostimulation	28	70	[20]
Crude oil	29500	Biostimulation	84	61	[18]
Petroleum hydrocarbon	14000	Bioaugmentation & Biostimulation	140	80	[21]
Diesel	8358	Bioaugmentation & Biostimulation	120	96	[5]
Diesel	100000	Biostimulation & Bioventing	28	91	[17]
Diesel	1100	Bioaugmentation & Biostimulation	30	44.5	[29]

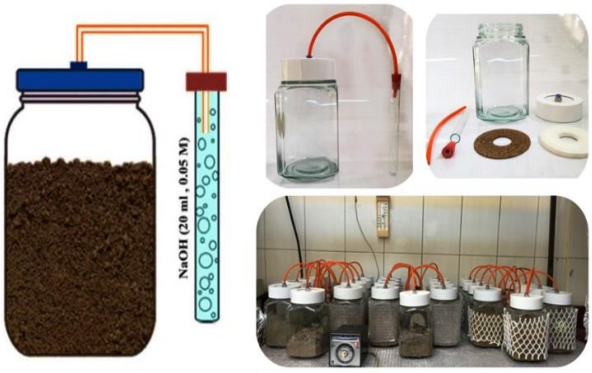
سویه‌ی اخیر، از جمله باکتری‌های گرم منفی، کموارگانوتروف (انرژی لازم را از اکسیداسیون مواد آلی حاصل می‌کند) و هوازی اجباری با متابولیسم تنفس هوازی است. شکل ظاهری آن به‌صورت میله‌ای صاف یا خمیده با ابعاد ۰/۵ و ۱ میکرومتر در ۱/۵ تا ۴ میکرومتر است. آرایش ظاهری *سودوموناس پوتیدا* اغلب به صورت تکی یا خوشه‌ها و زنجیره‌های کوچک است، که در شرایط هوازی و در حضور مواد مغذی متداول رشد می‌کند. سویه‌ی *سودوموناس پوتیدا* در برابر ترکیب‌های بیگانه‌زی به ویژه هیدروکربن‌های چندحلقه‌ای مقاوم است و نقش مهمی در تصفیه‌ی خاک‌های آلوده به ترکیب‌های نفتی ایفا می‌کند؛ و به دلیل متابولیسم چندمنظوره و نیز نیاز اندک به مواد غذایی در محیط‌های طبیعی بسیاری یافت می‌شود.[۳۲]

با توجه به مطالب ذکرشده و با درنظرگرفتن اینکه بیشتر کشورهای جهان، از جمله ایران، به نوعی درگیر پاک‌سازی خاک‌های آلوده به مواد نفتی هستند، هدف از انجام پژوهش حاضر، ارزیابی عملکرد پاک‌سازی زیستی خاک‌های آلوده به گازوئیل بوده است. در پژوهش حاضر، برای اولین بار تصفیه‌زیستی خاک آلوده به روش تحریک و تقویت‌زیستی با استفاده از کشت خالص باکتری *سودوموناس پوتیدا* در دوره‌های زمانی مشخص ارزیابی شده است. بدین منظور، آثار متقابل ۳ عامل: رطوبت خاک، میزان ماده‌ی مغذی، و مقدار باکتری تلقیحی در راندمان حذف کل هیدروکربن‌های نفتی (TPH) بررسی و بهترین شرایط جهت حذف آلاینده از خاک تعیین شده است. این توضیح لازم است که نتایج پژوهش حاضر در زمینه‌ی کارایی‌سنجی روش‌های زودبازده جهت پاک‌سازی خاک‌های آلوده به مواد نفتی در اطراف تأسیسات مرتبط، کاربرد دارد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. روش کار

پژوهش حاضر در مقیاس آزمایشگاهی و به کمک راکتورهای شیشه‌ای با حجم ۲/۱ لیتر، که جزئیات آن در شکل ۱ مشاهده می‌شود، انجام شده است. در هر آزمایش، ابتدا وزن مشخصی از خاک آلوده به سوخت دیزل با غلظت ۴۰۰۰ (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 دوره‌ی ۷۰ روزه به روش تحریک و تقویت‌زیستی، پاک‌سازی شده است. به‌منظور ارزیابی فعالیت بیوراکتورها، هر ۱۰ روز یک بار پارامترهای: TPH، تنفس میکروبی، و جمعیت باکتری‌های محیط خاک اندازه‌گیری شده است. لازم به توضیح است به منظور عدم نشت دی‌اکسیدکربن ناشی از تنفس میکروبی به بیرون از راکتور، درب آن‌ها



شکل ۱. تصویر و شماتیک پایلوت استفاده‌شده.

به‌وسیله‌ی واشرهایی از جنس فوم عایق شد. اندازه‌گیری تنفس میکروبی نیز به روش تیتراسیون، توسط ویال حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محلول NaOH، که در کنار هر راکتور قرار داشت، صورت پذیرفته است. همچنین به کمک شلنگ پلی‌یورتان به قطر ۶ میلی‌متر مسیری برای انتقال گاز دی‌اکسیدکربن ناشی از فعالیت میکروبی به درون محلول NaOH، تعبیه شده است. در پژوهش حاضر، در کنار راکتورهای اصلی از یک راکتور شاهد (بدون تلقیح سویه‌ی میکروبی و بدون افزودن مواد مغذی) با مشخصات ذکرشده استفاده شده است. گفتنی است به کمک یک دستگاه ترموستات حرارتی و منبع گرما، دمای محیط قرارگیری پایلوت در محدوده‌ی ۲۵ تا ۳۰ درجه‌ی سلسیوس حفظ شده است. همچنین کلیه‌ی آزمایش‌ها در محدوده‌ی pH خنثی (۶/۵ تا ۷/۵) انجام شده است.

۲.۲. خاک استفاده‌شده

اطلاعات دقیقی درخصوص تاریخچه، نحوه، و مدت زمان آلودگی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی در طبیعت در اختیار نیست. لذا، به‌منظور تهیه‌ی نمونه‌ی خاک آلوده به گازوئیل از روش آزمایشگاهی و اضافه‌کردن مواد آلاینده به خاک استفاده شده است؛ که در پژوهش حاضر، ترکیب ماسه و رس به نسبت ۹ به ۱ بوده است. ماسه‌ی استفاده‌شده از مصالح رودخانه‌ای استان تهران تهیه شده است؛ که پس از انتقال به آزمایشگاه، اقدام به الک‌کردن آن شده است. درنهایت، مصالح بین الک‌های استاندارد ۸# (۲/۳۶ میلی‌متر) و ۲۰۰# (۰/۰۷۵ میلی‌متر) به‌عنوان بخش ماسه استفاده شده است. بافت خاک استفاده‌شده براساس تقسیم‌بندی سازمان کشاورزی ایالات متحده (USDA) از نوع ماسه‌ی لومی طبقه‌بندی شده است.[۳۳] همچنین با توجه به نتایج حاصل از توزین مصالح مانده روی الک و منحنی دانه‌بندی، اندازه‌ی ذرات خاک استفاده‌شده در

پژوهش حاضر، در دامنه‌ی وسیعی توزیع شده و خاک دانه‌بندی خوبی داشته است. در پژوهش حاضر، از مصالح ریزدانه‌ی آزمایشگاهی نیز به‌عنوان رس استفاده شده است.

پس از اختلاط ماسه و رس با نسبت موردنظر، مخلوط با استفاده از آب مقطر کاملاً شستشو داده شد. همچنین به‌منظور اطمینان از حذف کامل هرگونه آلاینده‌ی احتمالی، خاک موردنظر به مدت ۲۰ دقیقه در کوره با دمای ۵۸۰ درجه‌ی سلسیوس قرار گرفت. به‌منظور ترکیب یکنواخت و همگن خاک و آلاینده، هر کیلوگرم خاک پاکیزه با دانه‌بندی یادشده، با مقدار مشخصی گازوئیل حل‌شده در ۵۰۰ میلی‌لیتر استن آزمایشگاهی آغشته شده است. در ادامه، به ترکیب اخیر ۷۲ ساعت زمان داده شد تا استن تبخیر و گازوئیل در خاک تثبیت شود. درنهایت، با به‌دست‌آوردن مقادیر ناچیز تقلیل وزن حرارتی (LOI)[11] و TPH خاک، این اطمینان حاصل شد که آلاینده‌ی افزوده‌شده، یگانه منبع کربنی موجود در محیط خاک است.

۳.۲. انتخاب باکتری

سویه‌ی باکتری استفاده‌شده در پژوهش حاضر، Pseudomonas putida PTCC ۱۶۴۹ بوده است، که از مجموعه‌ی میکروارگانیسم‌های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شده است. محیط کشت انتخاب‌شده برای میکروب مذکور نیز نوترینت براث[12] (حاوی ۱ گرم عصاره‌ی گوشت، ۲ گرم عصاره‌ی مخمر، ۵ گرم پپتون، و ۵ گرم نمک‌طعام در یک لیتر آب) بوده است. با رسم منحنی رشد سویه‌ی باکتری ذکرشده، زمان بهینه‌ی رشد آن نیز حدود ۱۸ ساعت برآورد شد.

۴.۲. سازگاری گونه‌ی میکروبی

به‌منظور جلوگیری از ایجاد شوک و از بین‌رفتن میکروارگانیسم‌های در تماس با غلظت بالای گازوئیل اقدام به سازگاری آن‌ها در یک راکتور مجزا با آلاینده‌ی نفتی شده است. بدین منظور، محلول گلوکز با غلظت ۲۰۰۰ (mg/L) به‌عنوان منبع کربن برای شروع فرایند سازگاری استفاده شده است. در این فرایند، در طی یک دوره‌ی ۶۰ روزه، بتدریج از غلظت کلوگز کاسته و بر غلظت گازوئیل افزوده شده است، به‌نحوی که در انتهای دوره‌ی سازگاری، مقدار گلوکز به صفر و غلظت گازوئیل به ۴۰۰۰ (mg/L) رسیده است. شایان ذکر است که غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم گازوئیل در کیلوگرم خاک براساس نتایج آزمایش‌های اولیه (نتایج در نوشتار حاضر ارائه نشده است) و به‌منظور حصول راندمان قابل‌قبول در بازه‌ی زمانی مناسب انتخاب شده است.

۵.۲. شمارش باکتری‌ها

از جمله روش‌های غیرمستقیم سنجش تعداد سلول برای ارزیابی رشد باکتری‌های هتروتروفیک هوازی، شیوه‌ی «شمارش سلول زنده» یا «شمارش پلیت» است.[۵] به‌منظور استخراج باکتری‌ها از محیط خاک به رقیق‌کننده (سرم فیزیولوژی)، ۱۰ گرم نمونه‌ی خاک به ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل‌شده اضافه شده است. مخلوط اخیر به مدت ۱۵ دقیقه روی شیکر با سرعت ۱۹۰ 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 شده است. در مرحله‌ی بعد، ۱ میلی‌لیتر از محلول ویال اول به ویال دوم اضافه و این روند به همین ترتیب تا ویال هشتم تکرار و با رقیق‌سازی متوالی، سری رقّت‌های موردنیاز برای شمارش باکتری آماده شد. در ادامه، ۰/۱ میلی‌لیتر از هر یک از رقّت‌های تهیه‌شده به پلیت‌های از قبل آماده‌شده، حاوی محیط کشت نوترینت آگار منتقل شده است. حجم تلقیح‌شده به هر پلیت، به‌وسیله‌ی میله‌ی شیشه‌ای استریل به‌طوریکنواخت روی محیط جامد پخش و درنهایت پس از انکوباسیون به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس، اقدام به شمارش کلنی‌های تشکیل‌شده در سطح محیط کشت آگار شده است (چنانچه کشت بر روی یک محیط مناسب صورت پذیرد، هر واحد زنده رشد می‌کند و یک کلنی را پدید می‌آورد).

هر کلنی که بتوان آن را شمارش کرد، یک «واحد تشکیل‌دهنده‌ی کلنی» یا CFU نامیده می‌شود (تعدادCFU ها متناسب با تعداد باکتری‌های زنده در نمونه است). درنهایت نیز با درنظرگرفتن تعداد کلنی‌ها، عامل رقّت هر پلیت و نیز استفاده از رابطه‌ی ۱، تعداد واحدهای تشکیل‌دهنده‌ی کلنی در هر گرم خاک خشک محاسبه شده است.[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 رابطه‌ی ۲ محاسبه می‌شود.

$$\text{وزن خاک مرطوب} = \text{وزن خاک خشک} \times \left(1 - \frac{\text{درصد رطوبت}}{100}\right) \quad (۲)$$

۶.۲. تنفس میکروبی خاک

اندازه‌گیری تنفس میکروبی، معیار مناسبی برای ارزیابی فعالیت میکروارگانیسم‌های موجود در خاک است. در پژوهش حاضر، CO_2 حاصل از تنفس باکتری‌های تلقیحی به محیط خاک به روش تیتراسیون اندازه‌گیری شده است. بدین منظور، نمونه‌ی خاک به درون راکتوری دربسته، که تبادل گازی با محیط بیرون نداشت، منتقل شد. با تعبیه‌ی مسیری کاملاً عایق، CO_2 ناشی از تنفس میکروبی خاک به ویال حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۰۵ مولار سدیم‌هیدروکسید هدایت شد. پس از ۱۰ روز، ویال محتوی سود از سیستم خارج و به کمک هیدروکلریک اسید ۰/۱ مولار تیتر و میزان CO_2 تولیدی محاسبه شده است.[۳۴]

۷.۲. پارامترهای بررسی‌شده

در پژوهش حاضر، تأثیر پارامترهای مختلف، شامل: میزان ماده‌ی مغذی، درصد رطوبت، و درصد حجمی باکتری تلقیحی در سه سطح بر راندمان حذف TPH از خاک آلوده به ۴۰۰۰ ($mg\ Diesel / kg\ Soil$) به‌روش تقویت و تحریک‌زیستی مطابق جدول ۲ ارزیابی شده است.

به‌منظور تأمین مواد مغذی موردنیاز باکتری‌ها از آمونیوم نیترات (NH_4NO_3

جدول ۲. سطوح پارامترهای بررسی‌شده.

Parameter	Level 1	Level 2	Level 3
$C:N:P$	100:0:0	100:5:1	100:10:1
Moisture (W %)	8	12	20
Inoculum bacteria (V %)	2.5	5	10
Oil ($mg / kg\ Soil$) Content	4000	4000	4000

[11] Loss Of Ignition

[12] Nutrient Broth

) با خلوص ۹۵٪ و پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات (KH_2PO_4) با خلوص ۱۰۰٪ به‌ترتیب به‌عنوان منبع نیتروژن و فسفر استفاده شده است. با توجه به نوع آلاینده، در پژوهش حاضر، اندازه‌گیری پارامتر "کل هیدروکربن‌های نفتی" به‌عنوان شاخص عملکرد فرایند استفاده شده است. بدین منظور از تتراکلرواتیلن از درجه‌ی بدون هیدروکربن به عنوان حلال و از دستگاه *InfraCal TOG / TPH Analyzer* مدل *CVH* ساخت کشور آمریکا جهت اندازه‌گیری TPH استفاده شده است. این تذکر لازم است که کلیه‌ی مواد شیمیایی استفاده‌شده در پژوهش حاضر از نوع آزمایشگاهی و از طریق شرکت‌های معتبر تأمین شده است.

۳. نتایج و بحث

چنانچه بیان شد، در پژوهش حاضر، در یک دوره‌ی ۷۰ روزه اقدام به تصفیه‌ی بیولوژیکی خاک آلوده به ۴۰۰۰ (*mg Diesel / kg Soil*) به روش تحریک و تقویت‌زیستی در محدوده‌ی *pH* خنثی شد. همچنین، مقدار مناسب پارامترهای مؤثر (رطوبت محیط، میزان ماده‌ی مغذی، و درصد باکتری تلقیحی) با تغییر یک عامل و ثابت نگه‌داشتن سایر پارامترها تعیین شده است، که نتایج مرتبط در ادامه ارائه شده است.

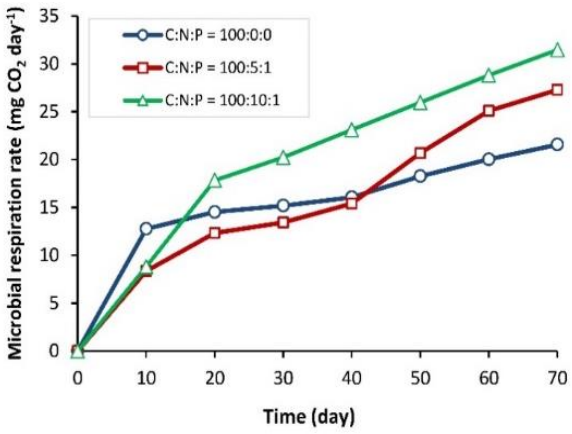
۳.۱. تأثیر ماده‌ی مغذی و تلقیح میکروبی در عملکرد فرایند

از آنجایی‌که شمارش میکروارگانیسم‌های زنده‌ی خاک به تنهایی نمی‌تواند معیار دقیقی از فرایندهای تصفیه‌ی بیولوژیکی باشد،[۳۵ و ۳۶] لذا در بخش کنونی، در ابتدا تأثیر میزان ماده‌ی مغذی افزوده‌شده به خاک در نرخ تنفس میکروبی (روند تولید CO_2) در رطوبت ثابت ۱۲٪ وزنی و تلقیح اولیه‌ی ۵٪ حجمی باکتری *سودوموناس پوتیدا* بررسی شده است. مطابق شکل ۲ مشاهده می‌شود که با افزایش میزان مواد مغذی از نسبت ۱۰۰:۰:۰ به ۱۰۰:۵:۱ و درنهایت ۱۰۰:۱۰:۱ در پایان دوره‌ی ۷۰ روزه‌ی نرخ تنفس میکروبی با افزایش همراه بوده است. در پژوهشی مشابه، با تحریک‌زیستی میکروارگانیسم‌های خاک توسط افزودن نیتروژن و فسفر به‌عنوان ماده‌ی مغذی نیز افزایش راندمان حذف سوخت دیزل از خاک گزارش شده است.[۱۹]

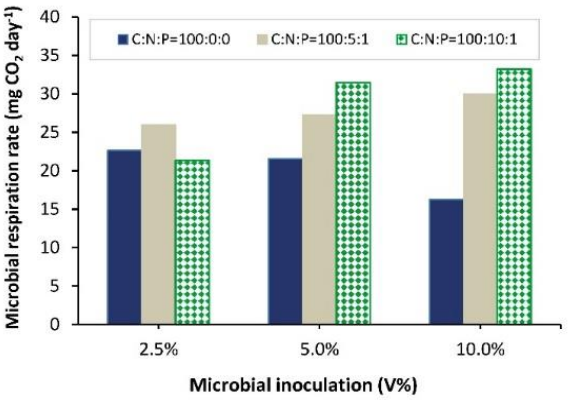
مطابق شکل ۲، در کلیه‌ی آزمایش‌ها، در روزهای ابتدایی، میزان CO_2 تولیدی با شدت بیشتری تولید شده است، اما به مرور زمان از نرخ آن کاسته شده است. توجه به این نکته ضروری است که در ابتدا میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده‌ی سوخت دیزل توسط منابع هیدروکربنی ناپایدار، نظیر هیدروکربن‌های خطی و راست‌زنجیر فعال شده‌اند، که این امر منجر به افزایش فعالیت باکتری و به‌دنبال آن افزایش نرخ تنفس میکروبی خاک شده است. با اتمام هیدروکربن‌های سبک، میکروارگانیسم‌ها ملزم به مصرف ترکیب‌های پیچیده‌تر، نظیر هیدروکربن‌های آروماتیک با وزن مولکولی بالا شده‌اند، که به کاهش راندمان منجر شده است. همچنین ممکن است تجزیه‌ی هیدروکربن‌های سنگین‌تر منجر به تولید عناصر واسطه‌ی سمی شود، به نحوی که عملکرد میکروارگانیسم‌های نفت‌خوار را مختل کند.[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 ناکافی‌بودن مواد مغذی در مقایسه با دو مورد دیگر نسبت داد.

در پاک‌سازی خاک آلوده به ترکیب‌های 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 و پس از آن افتی در تولید CO_2 و فعالیت میکروبی حاصل شده است.[۱۶]



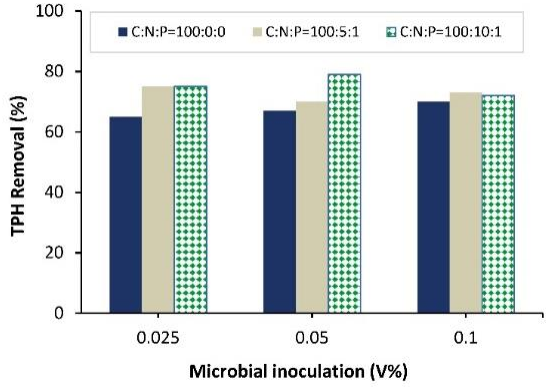
شکل ۲. تأثیر میزان ماده‌ی مغذی در نرخ تنفس میکروبی تجمعی خاک. (۴۰۰۰ (mg_{Diesel} / kg_{Soil})، رطوبت ۱۲٪ وزنی، ۵٪ حجمی باکتری)



شکل ۳. تأثیر میزان تلقیح در نرخ تنفس میکروبی تجمعی در طی ۷۰ روز. (۴۰۰۰ (mg_{Diesel} / kg_{Soil}) و رطوبت ۱۲٪ وزنی).

در ادامه، به‌منظور بررسی تأثیر میزان تلقیح میکروبی اولیه در عملکرد فرایند، آزمایش‌ها در سه سطح مختلف پارامتر مذکور (۲/۵، ۵، و ۱۰ درصد حجمی) تکرار شده است، که نتایج مرتبط در پایان یک دوره‌ی ۷۰ روزه در شکل ۳ با یکدیگر مقایسه شده‌اند؛ که مطابق آن، با افزایش میزان باکتری تلقیح‌شده به خاک، نرخ تنفس برای بیشتر 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 است، که دلیل آن را می‌توان به مناسب‌بودن میزان مواد مغذی موردنیاز 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 به‌تبع 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 درصد را می‌توان به محدودیت در منبع کربن قابل‌دسترس توسط جمعیت میکروبی مرتبط دانست.

از آنجائی که حذف کل هیدروکربن‌های نفتی به‌عنوان مبنای پاک‌سازی خاک در پژوهش حاضر مد نظر بوده است، بنابراین راندمان حذف TPH از خاک در پایان دوره‌ی ۷۰ روزه نیز اندازه‌گیری شده است، که نتایج مرتبط در شکل ۴ مشاهده می‌شود؛ که مطابق آن، بیشترین راندمان حذف به میزان ۷۹٪ مربوط



شکل ۴. تأثیر میزان تلقیح اولیه در راندمان حذف TPH در طی ۷۰ روز
(۴۰۰۰ mg_{Diesel} / kg_{Soil}) و رطوبت ۱۲٪ وزنی).

به هنگام استفاده از مواد مغذی با نسبت ۱۰۰:۱۰:۱ و تلقیح میکروبی اولیه‌ی ۵٪ بوده است، که با نتایج مربوط به نرخ تنفس میکروبی در شکل‌های ۲ و ۳ مطابقت دارد. در پژوهشی مشابه، افزایش راندمان حذف TPH از خاک آلوده با افزودن مواد مغذی گزارش شده است.[۳۷]

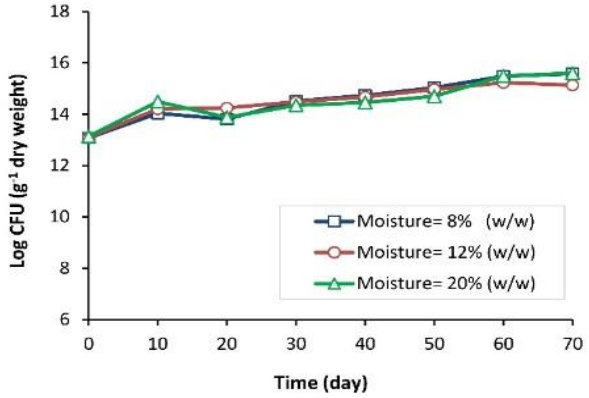
عبداللهی‌نژاد و همکاران (۲۰۲۳)، در پژوهش خود دریافته‌اند که در پاک‌سازی میکروبی خاک آلوده به ترکیب‌های نفتی، تحریک‌زیستی با استفاده از مواد مغذی و گیرنده‌های الکترون باعث تغییرات عمیق در جوامع باکتریایی، آرکی‌باکترها، و قارچی خاک از نظر فعالیت، فراوانی، و تنوع زیستی، و درنهایت بهبود فعالیت میکروبی خاک شده است.[۳۸]

۲.۳. تأثیر رطوبت در عملکرد فرایند

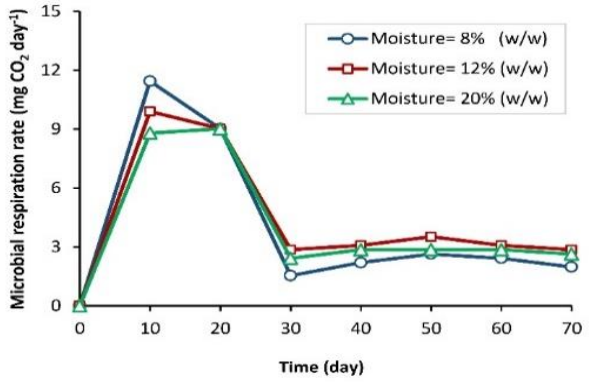
به منظور بررسی تأثیر رطوبت محیط در راندمان حذف بیولوژیکی سوخت دیزل، آزمایش‌ها در سه سطح رطوبت ۸، ۱۲ (ظرفیت نگهداری آب در خاک[۱۳])، و ۲۰ درصد وزنی تکرار شده‌اند، که نتایج مرتبط در شکل‌های ۵ الی ۷ مشاهده می‌شود. مطابق شکل ۵، در تمامی درصد رطوبت‌های آزمایش‌شده، رشد نسبی جمعیت باکتری‌ها یکسان بوده و افزایش میزان رطوبت محیط خاک، در طی دوره‌ی آزمایش، تأثیر قابل‌توجهی در جمعیت میکروبی نداشته است.

تنفس میکروبی خاک پارامتر دیگری است که در خلال بررسی اثر رطوبت در تجزیه‌زیستی سوخت دیزل بررسی شده است. مطابق شکل ۶، در ابتدای فرایند (۱۰ روز اول)، با افزایش رطوبت محیط، میزان تنفس میکروبی خاک کاهش یافته است. احتمال می‌رود با افزایش رطوبت محیط و پُرشدن منافذ خاک از آب، میزان نفوذ اکسیژن در ماتریس خاک کاهش و به دنبال آن تنفس میکروارگانیسم های موجود در خاک کاهش یافته است. 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 سی‌اُم به بعد در مقایسه با سایر رطوبت‌ها را می‌توان به مصرف بیشتر مواد آلی در ۳۰ روز اول فرایند و کاهش مواد آلی قابل‌تجزیه‌ی موجود در محیط در ادامه‌ی فرایند مرتبط دانست.

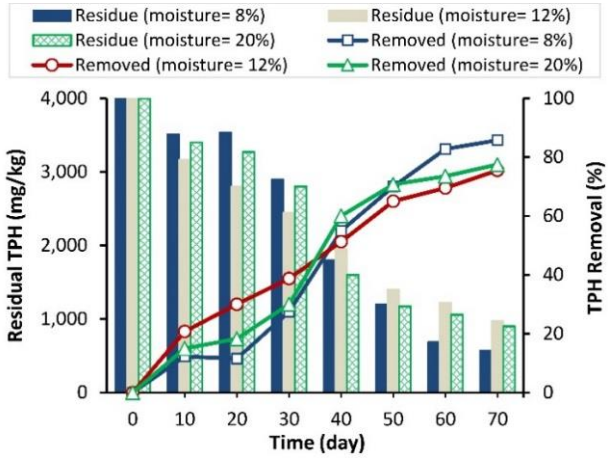
همچنین از روز دهم به مدت ۲۰ روز، نرخ تنفس میکروبی خاک با افت شدیدی مواجه شده است. چنانچه قبلاً نیز بیان شد، در ۲۰ روز اول فرایند، بخش قابل‌توجهی از هیدروکربن‌های ساده و راست‌زنجیر توسط میکروارگانیسم‌های نفت‌خوار تجزیه شده و پس از آن میکروارگانیسم‌ها، ملزم به مصرف ترکیب‌های



شکل ۵. تأثیر میزان رطوبت در جمعیت میکروبی.
(۴۰۰۰ mg_{Diesel} / kg_{Soil})، ۵٪ حجمی باکتری، $C:N:P$ =۱۰۰:۱۰:۱)



شکل ۶. تأثیر میزان درصد رطوبت در نرخ تنفس میکروبی خاک.
(۴۰۰۰ mg_{Diesel} / kg_{Soil})، ۵٪ حجمی باکتری، $C:N:P$ =۱۰۰:۱۰:۱)

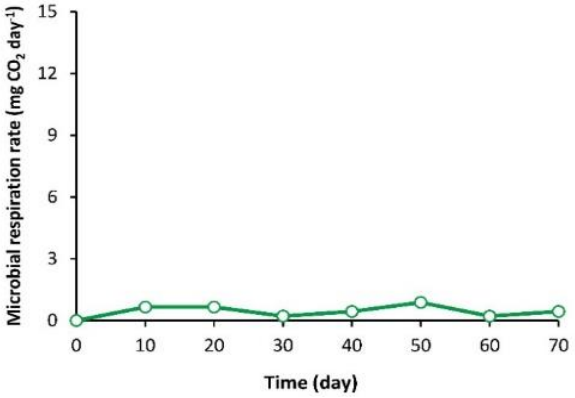


شکل ۷. تأثیر میزان رطوبت در حذف TPH از خاک.
(۴۰۰۰ mg_{Diesel} / kg_{Soil})، ۵٪ حجمی باکتری، $C:N:P$ =۱۰۰:۱۰:۱)

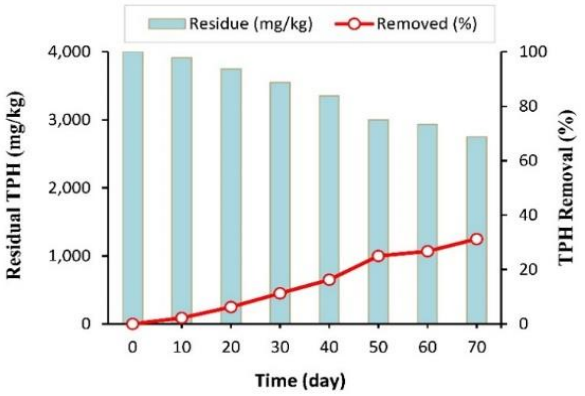
پیچیده‌تری نظیر هیدروکربن‌های آروماتیک با وزن مولکولی بالا شده‌اند، که این امر موجب اختلال در متابولیسم میکروب و در نتیجه افت تولید CO_2 شده است. در زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به گازوئیل در بیوراکتور حاوی لجن فعال خام و ورمی کمپوست، حذف کامل هیدروکربن‌های سبک و حذف ۷۰و ۶۸ درصد به ترتیب هیدروکربن‌های متوسط و سنگین در بازه‌ی زمانی ۹۰ روزه گزارش شده است.[۳۹]

تأثیر میزان رطوبت در حذف TPH از خاک نیز در شکل ۷ مشاهده می‌شود؛

[13] Field Capacity



شکل ۸. نرخ تنفس میکروبی نمونه‌ی شاهد بیولوژیکی.
(۴۰۰۰ mg_{Diesel}/kg_{Soil})، $C:N:P$ =۱۰۰:۰:۰، و رطوبت ۱۲٪ وزنی)



شکل ۹. تغییرات TPH نمونه‌ی شاهد بیولوژیکی.
(۴۰۰۰ mg_{Diesel}/kg_{Soil})، $C:N:P$ =۱۰۰:۰:۰، و رطوبت ۱۲٪ وزنی)

که مطابق آن، بیشترین راندمان حذف TPH پس از ۷۰ روز به میزان ۸۶٪ مربوط به رطوبت ۸٪ وزنی است. به‌طورکلی، رطوبت بهینه‌ی فرایندهای میکروبی در محدوده‌ی ۶۰-۴۰ درصد، بیشینه‌ی ظرفیت نگهداری آب در خاک است.[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 پژوهش حاضر نیز بهترین عملکرد سیستم در رطوبت ۸٪، که نزدیک‌تر به ۶۰٪ ظرفیت نگهداری آب در خاک استفاده‌شده در مقایسه با دو حالت دیگر است، به‌دست آمده است.

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

۳.۳. آزمایش‌های شاهد

به‌منظور تعیین سهم تقویت و تحریک‌زیستی در عملکرد سیستم و ارزیابی افت‌های احتمالی ناشی از تبخیر و نیز بررسی اثر تضعیف طبیعی آلاینده، آزمایش در شرایط بهینه‌ی به‌دست‌آمده از مراحل قبل و بدون تلقیح باکتری *سودوموناس پوتیدا* (بدون تقویت‌زیستی) و بدون افزودن مواد مغذی (بدون تحریک‌زیستی) تکرار شده است. مطابق شکل ۸، در طی انجام آزمایش‌های مذکور، تنفس میکروبی سیستم ناچیز و کمتر از ۱ (mg CO_2/day) بوده است (بیشینه‌ی مقدار تنفس میکروبی نمونه برابر با ۰/۸۸ (mg CO_2/day) و در روز ۵۰ اُم حاصل شده است)، که این میزان فعالیت را می‌توان به آلوده‌شدن خاک به میکروارگانیسم‌های بومی در طی انجام آزمایش‌ها نسبت داد.

در ادامه، روند تغییرات میزان آلودگی خاک در طی فرایند نیز بررسی شده است، که نتایج مرتبط در شکل ۹ مشاهده می‌شود؛ که مطابق آن، در اثر فعالیت میکروارگانیسم‌های ناچیز بومی خاک، تبخیر احتمالی آلاینده و همچنین جذب آلاینده به ذرات خاک، TPH نمونه‌ی شاهد در طی ۷۰ روز، به میزان ۳۰٪ کاهش داشته است، که با راندمان ۸۶ درصدی در هنگام استفاده‌ی هم‌زمان از تقویت و تحریک‌زیستی اختلاف قابل توجهی داشته است. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، فرایند تقویت و تحریک‌زیستی هم‌زمان با استفاده از سویه‌ی *سودوموناس پوتیدا*، روشی مناسب جهت پاک‌سازی خاک‌های آلوده به گازوئیل ارزیابی می‌شود.

۴. نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، اثر عوامل مختلف در تصفیه‌زیستی خاک آلوده به گازوئیل، به روش تقویت و تحریک‌زیستی با استفاده از کشت میکروبی خالص بررسی شده است. در مطالعه‌ی حاضر، که در مقیاس آزمایشگاهی انجام شده است، تأثیر میزان رطوبت، مواد مغذی، و میکروارگانیسم تلقیحی به محیط خاک در راندمان حذف کل هیدروکربن‌های نفتی (TPH) از خاک ارزیابی شده است. بدین منظور از میکروارگانیسم *سودوموناس پوتیدا* کشت‌یافته در محیط مایع به‌عنوان گونه‌ی میکروبی و آمونیوم نیترات و پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات به‌ترتیب به‌عنوان منبع نیتروژن و فسفر استفاده شده است. نتایج به‌دست‌آمده حاکی از آن است که افزایش مواد مغذی دردسترس گونه‌ی باکتری، موجب بهبود نرخ رشد جمعیت میکروبی خاک و به‌دنبال آن افزایش راندمان حذف آلاینده‌ی نفتی شده است. 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 بهینه‌ی پاک‌سازی بیولوژیکی خاک آلوده به گازوئیل به‌روش تقویت و تحریک‌زیستی انتخاب شده است. در این شرایط پس از ۷۰ روز راندمان حذف TPH از خاک آلوده به ۴۰۰۰ (mg/kg) گازوئیل، معادل با ۸۶٪ حاصل شده است. مقایسه‌ی نتایج به‌دست‌آمده در شرایط بهینه با نتایج آزمایش‌های شاهد، بیانگر افزایش راندمان ۱۸۷ درصدی حذف آلاینده از طریق تقویت و تحریک‌زیستی است. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، فرایند تقویت و تحریک‌زیستی هم‌زمان با استفاده از سویه‌ی *سودوموناس پوتیدا* روشی مناسب جهت پاک‌سازی خاک‌های آلوده به گازوئیل ارزیابی می‌شود.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس و در آزمایشگاه محیط‌زیست دانشکده‌های مهندسی عمران و محیط‌زیست دانشگاه تربیت مدرس انجام پذیرفته است. بدین‌وسیله از دانشگاه تربیت مدرس به جهت در اختیار قراردادن امکانات اجرای پژوهش حاضر، تشکر و قدردانی می‌شود.

References- منابع

1. Lee, J., Kim, H.S., Jo, H.Y. and Kwon, M.J., 2021. Revisiting soil bacterial counting methods: Optimal soil storage and pretreatment methods and comparison of culture-dependent and-independent methods. *PLoS One*, *16*(2), p.e0246142. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246142
2. Sarkar, D., Ferguson, M., Datta, R. and Birnbaum, S., 2005. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. *Environmental Pollution*, *136*(1), pp.187-195. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.09.025
3. Wolicka, D., Suszek, A., Borkowski, A. and Bielecka, A., 2009. Application of aerobic microorganisms in Bioremediation in Situ of Soil Contaminated by petroleum products. *Bioresource Technology*, *100*(13), pp.3221-3227. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.020
4. Abdollahinejad, B., Pasalari, H., Jafari, A.J., Esrafili, A. and Farzadkia, M., 2020. Bioremediation of diesel and gasoline-contaminated soil by co-vermicomposting amended with activated sludge: Diesel and gasoline degradation and kinetics. *Environmental Pollution*, *263*, p.114584. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114584
5. Taccari, M., Milanovic, V., Comitini, F., Casucci, C. and Ciani, M., 2012. Effects of biostimulation and bioaugmentation on diesel removal and bacterial community. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *66*(1), pp.39-46. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.09.012
6. Gallego, J.L., Loredo, J., Llamas, J.F., Vázquez, F. and Sánchez, J., 2001. Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. *Biodegradation*, *12*, pp.325-335. https://doi.org/10.1023/A:1014397732435
7. Yu, D.Y., Kang, N., Bae, W. and Banks, M.K., 2007. Characteristics in oxidative degradation by ozone for saturated hydrocarbons in soil contaminated with diesel Fuel. *Chemosphere*, *66*(5), pp.799-807. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.06.053
8. Scullion, J., 2006. Remediating polluted soils. Naturwissenschaften, *93*(2), pp.51-65. https://doi.org/10.1007/s00114-005-0079-5
9. Brejea, R., Boroș, M., Roșca, S., Traian, J.E., Budău, R., Borza, I.M. and Păcurar, I., 2023. 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, 13*(18), p.10245. https://doi.org/10.3390/app131810245
10. Koshlaf, E. and Ball, A.S., 2017. Soil Bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments. *AIMS Microbiology*, *3*(1), p.25. https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.1.25
11. USEPA, National Research Council, Global Affairs, Technology for sustainability program and committee on incorporating sustainability in the US Environmental Protection Agency, 2011. Sustainability and the US EPA. National Academies Press. Washington, DC.
12. Liu, C.J., Deng, S.G., Hu, C.Y., Gao, P., Khan, E., Yu, C.P. and Ma, L.Q., 2023. Applications of bioremediation and phytoremediation in contaminated soils and waters: CREST Publications during 2018–2022. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, *53*(6), pp.723-732. https://doi.org/10.1080/10643389.2023.2168365
13. Ajona, M. and Vasanthi, P., 2021. Bioremediation of petroleum contaminated soils–a review. *Materials Today: Proceedings*, *45*, pp.7117-7122. https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.01.949
14. Mekonnen, B.A., Aragaw, T.A. and Genet, M.B., 2024. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: a review on principles, degradation mechanisms, and advancements. *Frontiers in Environmental Science*, *12*, p.1354422. https://doi.org/10.3389/fenvs.2024.1354422
15. Szulc, A., Ambrożewicz, D., Sydow, M., Ławniczak, Ł., Piotrowska-Cyplik, A., Marecik, R. and Chrzanowski, Ł., 2014. The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: Feasibility during field studies. *Journal of Environmental Management*, *132*, pp.121-128. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.11.006
16. Alisi, C., Musella, R., Tasso, F., Ubaldi, C., Manzo, S., Cremisini, C. and Sprocati, A.R., 2009. 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*, *407*(8), pp.3024-3032. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.01.011
17. Agarry, S. and Latinwo, G.K., 2015. 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, 16*(2), pp.82-91. https://doi.org/10.12911/22998993/1861
18. Xu, Y. and Lu, M., 2010. Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of different

biostimulation and bioaugmentation treatments. *Journal of Hazardous Materials*, *183*(1-3), pp.395-401. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.07.038

19. Bento, F.M., Camargo, F.A., Okeke, B.C. and Frankenberger, W.T., 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*, *96*(9), pp.1049-1055. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.09.008

20. Lin, T.C., Pan, P.T. and Cheng, S.S., 2010. Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, *176*(1-3), pp.27-34. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.080

21. Liu, P.W.G., Chang, T.C., Whang, L.M., Kao, C.H., Pan, P.T. and Cheng, S.S., 2011. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: Effects of strategies and microbial community shift. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *65*(8), pp.1119-1127. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.09.002

22. Zhang, B., Zhang, L. and Zhang, X., 2019. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by petroleum-degrading bacteria immobilized on biochar. *RSC Advances*, *9*(60), pp.35304-35311. https://doi.org/10.1039/C9RA06726D

23. Sun, G.D., Xu, Y., Jin, J.H., Zhong, Z.P., Liu, Y., Luo, M. and Liu, Z.P., 2012. 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*, *233*, pp.72-78. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.06.060

24. Mohsenzadeh, F. and Ahmadi Masoud, N., 2012. A Study on potential microbial removal of diesel oil from contaminated soil in Hamedan City. *Biological Journal of Microorganism*, *1*(2), pp.77-86 [In Persian].

25. Hosseini, M., Akhavan Sepahi, A., and Salehi, M., 2016. Evaluation of the bio-augmentation technique in the bioremediation process of diesel contaminated soils. *Petroleum Research*, *25*(85-2), 123-131 [In Persian]. http://doi.org/10.22078/pr.2016.602

26. Ebrahimi, M., Fallah, A. and Sarikhani, M.R., 2013. 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*, *23*(1), pp.109-121 [In Persian].

27. Sadighbayan, K.H., Assadi, M.M., Farazmand, A., Monadi, A.R. and Aliasgharzad, N., 2016. Evaluation of biodegradation of petroleum aromatic compounds with soil microorganisms in Tabriz city. *Journal of Natural Environment*, *69*(3), pp.757-771 [In Persian].

28. Momeni, M., Farzadkia, M., Esrafili, A. and Kermani, M., 2018. 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*, *27*(158), pp.179-192 [In Persian].

29. Feng, L., Jiang, X., Huang, Y., Wen, D., Fu, T., & Fu, R. 2021. Petroleum hydrocarbon-contaminated soil bioremediation assisted by isolated bacterial consortium and sophorolipid. *Environmental Pollution, 273*, 116476. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116476

30. Sarikhani, M.R., Afsharnia, M. and Zarei, M., 2022. 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, 32*(4), pp.91-104 [In Persian]. https://doi.org/10.22034/ws.2021.45023.2408

31. Obayori, O.S., Ilori, M.O., Adebusoye, S.A., Oyetibo, G.O., Omotayo, A.E. and Amund, O.O., 2009. Degradation of hydrocarbons and biosurfactant production by pseudomonas sp. strain LP1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *25*, pp.1615-1623. https://doi.org/10.1007/s11274-009-0053-z

32. Sunar, N.M., Emparan, Q., Abdul Karim, A.T., Noor, S.F.M., Maslan, M., Mustafa, F. and Khaled, N., 2014. The effectiveness of bioremediation treatment for diesel-soil contamination. *Advanced Materials Research, 845*, pp.146-152. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.845.146

33. United States. Division of soil survey, 1993. Soil Survey Manual (No. 18). US Department of Agriculture.

34. Hung, Y.T., Wang, L.K. and Shammas, N.K. eds., 2012. *Handbook of Environment and Waste Management: Air and Water Pollution Control (Vol. 1)*. World Scientific. https://doi.org/10.1142/7971

35. Margesin, R., Zimmerbauer, A. and Schinner, F., 2000. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere, 40*(4), pp.339-346. https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00218-0

36. Becker, S., Böger, P., Oehlmann, R. and Ernst, A., 2000. PCR bias in ecological analysis: A case study for quantitative Taq nuclease assays in analyses of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(11), pp.4945-4953. https://doi.org/10.1128/AEM.66.11.4945-4953.20

37. Dadrasnia, A. and Agamuthu, P., 2013. Dynamics of diesel fuel degradation in contaminated soil using organic wastes. *International Journal of Environmental Science and Technology*, *10*, pp.769-778. https://doi.org/10.1007/s13762-013-0224-1

38. Abdollahinejad, B., Pasalari, H. and Farzadkia, M., 2023. Bioaugmentation and biostimulation methods for the decontamination of soils contaminated with petroleum compounds: A systematic review. Iranian Journal of Health and Environment, *16*(1), pp.195-228 [In Persian]. https://dorl.net/dor/20.1001.1.20082029.1402.16.1.12.8

39. Abdollahinejad, B., Farzadkia, M., Jafari, A.J. and Esrafili, A., 2019. 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*, *7*(1), pp.53-68 [In Persian]. https://doi.org/10.29252/jehe.7.1.53

40. Margesin, R. and Schinner, F., (Eds.) 2005. *Manual for Soil Analysis-Monitoring and Assessing Soil Bioremediation*, Springer, Berlin, 370 p. https://doi.org/10.1007/3-540-28904-6

41. Tyagi, M., da Fonseca, M.M.R. and de Carvalho, C.C., 2011. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation, 22*, pp.231-241. https://doi.org/10.1007/s10532-010-9394-4