

# Optimizing the Use of Biological Washing in Rehabilitating the Polluted Soil of South Tehran Oil Refinery

M. Tabatabai<sup>1</sup>, R. Mafigholami<sup>2\*</sup>, M. Borghei<sup>3</sup>, A. Esrafil<sup>4</sup>

1. PhD. Student, Dept. of Environment, West Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Assoc. Prof., Dept. of Water and Wastewater Environment, West Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran  
(Corresponding Author) r.mafigholami@wtiau.ac.ir
3. Prof., Dept. of Environmental Processes, Sharif University of Technology, Tehran, Iran
4. Prof., Dept. of Environmental Health Engineering, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received Nov. 2, 2023 Accepted Nov. 27, 2023)

**To cite this article:**

Tabatabai, M., Mafigholami, R., Borghei, M., Esrafil<sup>4</sup>. 2024. "Optimizing the use of biological washing in rehabilitating the polluted soil of South Tehran oil refinery" *Journal of Water and Wastewater*, 34(5), 89-101.  
<https://doi.org/10.22093/wwj.2023.423458.3380>.

## Abstract

Bio-leaching is a non-invasive, relatively affordable and environmentally friendly method through which toxic compounds are decomposed with the help of microorganisms and with the help of enzymatic reactions. This study was conducted in order to use biological leaching to rehabilitate soil contaminated and resistant to biological decomposition by heavy metal lead and phenanthrene around the south Tehran oil refinery. The design of the experiment was done with the response surface method. In the bioleaching method, the purified strain (*Pseudomonas aeruginosa*) was isolated from the soil of the refinery. Environmental pH (3, 5, 7, 9, 11), pollutant to biomass ratio (7.50, 15, 22.50, 30, 37.5 mg/g) and retention time (1, 2, 3, 4, 5 hours) were considered as main variables. pH was the most important parameter influencing the removal of lead and phenanthrene from soil. The highest percentage of lead removal with 96.79% pH is equal to 8, pollutant ratio to Live current is equal to 30 W/W and time of 2 hours was obtained. In the case of phenanthrene, the highest percentage of phenanthrene removal (97.4%) in pH was equal to 7, the pollutant to living organism ratio was equal to 22.5 W/W and the time was measured for 1 hour. The results of this study showed that the use of bacteria increased the efficiency of the removal process compared to the cleaning process without bacteria (42% for phenanthrene and 67% for lead).

**Keywords:** Bioleaching, Lead, Phenanthrene, Soil Reclamation, Response Level.



## Extended Abstract

### 1. Introduction

Bioleaching presents a non-invasive, relatively cost-effective, and environmentally favorable approach for the decomposition of petroleum compounds utilizing microorganisms and enzymatic reactions to generate carbon dioxide, biomass, and soluble compounds (Mambwe et al., 2021).

This method minimizes ecosystem alteration or damage, although its time-consuming nature serves as a limiting factor. The introduction of adapted species native to the region can enhance the cleaning speed of biological methods (Abolhasani Sooraki et al., 2020).

Currently, bio-refining methods are being increasingly regarded due to their environmental compatibility, utilization of water and soil microorganisms from petroleum compounds as carbon and energy sources, and their biological processing through biosurfactant production (Yadav and Sharma, 2023).

In light of these considerations, the present study was conducted to optimize the utilization of bioleaching for the remediation of contaminated soil at the South Tehran Oil Refinery.

### 2.2. Materials and Methods

Washed soil samples (100 g), collected from ten distinct points within the refinery, were individually distributed in 250 mL beakers. These samples were then exposed to a phenanthrene solution in acetone and a lead solution in distilled water, resulting in final concentrations of 500 mg/kg phenanthrene and 50 mg/kg lead. The polluted solutions were subsequently utilized to contaminate the soil samples. Separation of solid and liquid phases of pollution concentration in the washing solution was determined by conducting an absorption test using an HPLC device equipped with an analysis column C18 4.1 x 250 mm ID, with a flow rate of 1 mL/min, an injection volume of 20  $\mu$ , and a detector wavelength of 220 nm. During this process, a microbial consortium cultivated in soils contaminated with the pollutants, lead and phenanthrene, was prepared and concentrated in a laboratory. Environmental pH, pollutant-to-biomass ratio, and retention time were the primary variables considered in this phase.

### 3. Results

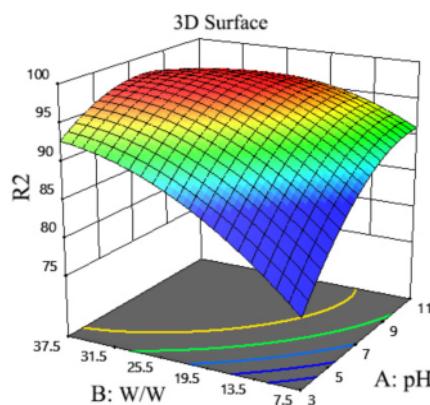
The findings of the biochemical diagnosis tests revealed the isolation and detection of *Pseudomonas aeruginosa* bacteria in the soil samples. The pollutant removal potential, as assessed through dilution tests, indicated that the quantity of 103 to 107 Logcfu/g was utilized. There was no significant variance observed between the quantities of 105, 106 and 107 Logcfu/g, but

a noteworthy distinction was evident in comparison to 103 to 105 Logcfu/g.

Regarding Pb removal, time exhibited a substantial and influential role ( $P < 0.05$ ). Furthermore, the pH (P-value 0.0081) and the pollutant-to-microorganism ratio (P-value 0.250) were identified as the most crucial parameters affecting the removal of Pb during the biological process. The enhanced model of Pb removal assumed the form of a quadratic equation (Eq. 1)

$$R_2 = 95.87 + 4.21A + 5.05B + 8.365C + 4.85AC - 4.02A^2 \quad (1)$$

In the analysis of individual parameters, the percentage of Pb removal displayed an ascending tendency with increasing pH, reaching its peak at pH 8. A similar trend was observed concerning the pollutant-to-microorganism ratio and time, with the maximum removal percentage achieved at 37.5 W/W and 3 hours. The optimal conditions for achieving the highest percentage of lead removal (96.79%) were determined to be a pH of 8, a pollutant-to-microorganism ratio of 30 W/W, and a duration of 2 hours (Figs. 1 and 2). In the control sample, the highest Pb removal percentage was recorded at 67%.



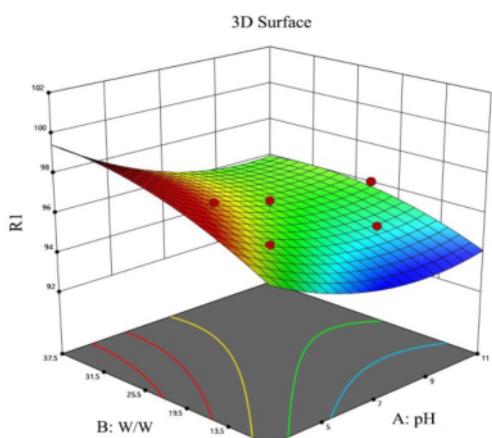
**Fig. 1.** Interaction effect of pH, time and pollutant-to-living ratio on lead removal using biological process

In the context of phenanthrene removal, time was insignificant ( $P > 0.05$ ), while both pH and the pollutant-to-microorganism ratio were identified as influential factors ( $P < 0.05$ ). According to the F-value, pH was determined to be the most significant parameter influencing phenanthrene removal from soil through the biological process. The enhanced model for phenanthrene removal followed a quadratic relationship pattern with an additional interference effect of the pollutant-to-living organism ratio (Eq. 2)

$$R_1 = 96.11 - 1.38A + 1.258B - 2.56BC - 1.40C^2 \quad (2)$$



The increase in pH from 3 led to a corresponding increase and subsequent decrease in the percentage of phenanthrene removal. Concurrently, increasing removal percentage with a gradual rise in the pollutant-to-living organism ratio was noted. The process of phenanthrene removal exhibited an upward trend up to 3 hours, after which it declined. The optimum conditions for achieving the highest percentage of phenanthrene removal (97.4%) were identified as a pH of 7, a pollutant-to-living organism ratio of 22.5 W/W, and a duration of 1 hour. In the control sample, the highest percentage of phenanthrene removal was recorded at 42%.



**Fig. 2.** Interaction effect of pH, time and pollutant-to-living ratio on phenanthrene removal using biological process

#### 4. Discussion

The efficacy of various parameters, including time, pH, and the ratio of pollutant to organism, was observed in influencing the percentage of Pb and phenanthrene removal. Increasing pH levels up to 3 resulted in a

decreasing trend in the removal of phenanthrene, while for Pb, removal initially increased up to a pH limit of 8 and then declined. However, when all conditions were considered together, a pH of 7 was found to be optimal for phenanthrene removal, and a pH of 8 was optimal for Pb removal. This tendency can be attributed to the bacteria's preference for a neutral pH range (Wirasnita and Hadibarata, 2016).

Under high pH conditions, absorbent cell wall components acquire a net negative charge, facilitating the attraction of metal cations to binding points on the adsorbent (Vijayaraghavan and Yun, 2008).

This phenomenon leads to the precipitation and removal of metal complexes in the case of phenanthrene, which makes it unavailable (Volesky, 1990).

Additionally, the absorption of both pollutants initially increased and then decreased over time. Furthermore, the percentage of Pb and phenanthrene removal was found to increase with higher pollutant-to-living organism ratios, indicating enhanced absorption due to the presence of metal or hydrocarbon ions around the active sites of bacteria. Nevertheless, excessively high pollutant-to-organism ratios (30 W/W for Pb and 22.5 W/W for phenanthrene) were observed to diminish the bacteria's capacity, highlighting the direct impact of concentration on bacterial structure and metabolism.

#### 5. Conclusions

In conclusion, *Pseudomonas aeruginosa* bacteria, isolated from soil, exhibited significant efficacy in removing phenanthrene and soil Pb, achieving removal percentages of 97.4% and 96.79%, respectively, compared to significantly lower removal rates (42% for phenanthrene and 67% for Pb) in the absence of bacteria (control sample).



مجله آب و فاضلاب، دوره ۳۴، شماره ۵، صفحه: ۸۹-۱۰۱

## بهینه‌سازی کاربرد فروشوبی زیستی در احیای خاک آلوده پالایشگاه نفت جنوب تهران

ملوس طباطبایی<sup>۱</sup>، رویا مافی غلامی<sup>۲\*</sup>، مهدی برقی<sup>۳</sup>، علی اسرافیلی<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی دکترا، گروه محیط‌زیست، واحد تهران غرب، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- دانشیار، محیط‌زیست آب و فاضلاب، واحد تهران غرب، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران  
(نویسنده مسئول)  
[r.mafigholami@wtiau.ac.ir](mailto:r.mafigholami@wtiau.ac.ir)

۳- استاد، گروه فرایندهای محیط‌زیست، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران

۴- استاد، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

(دریافت ۱۴۰۲/۸/۱۱) پذیرش (۱۴۰۲/۹/۶)

برای ارجاع به این مقاله به صورت زیر اقدام بفرمایید:  
طباطبایی، م، مافی غلامی، ر، برقی، م، اسرافیلی، ع، ۱۴۰۲، "بهینه‌سازی کاربرد فروشوبی زیستی در احیای خاک آلوده پالایشگاه نفت جنوب تهران"  
<https://doi.org/10.22093/wwj.2023.423458.3380>. ۸۹-۱۰۱. (۵)، (۲۴)، مجله آب و فاضلاب.

### چکیده

فروشوبی زیستی روشی غیرتھاجمی، نسبتاً مقرر به صرفه و سازگار با محیط‌زیست است که از طریق آن ترکیبات سمی، با کمک میکرووارگانیسم‌ها و با کمک واکنش‌های آنزیمی تجزیه می‌شوند. این پژوهش به منظور استفاده از فروشوبی زیستی برای احیای خاک آلوده و مقاوم به تجزیه بیولوژیکی به فلز سنگین سرب و فناتنرن اطراف پالایشگاه نفت جنوب تهران انجام شد. طراحی آزمایش با روش سطح پاسخ انجام شد. در روش فروشوبی زیستی، سویه خالص شده (سودوموناس آترووزینوزا) از خاک پالایشگاه جداسازی شد. pH محيط (۳، ۵، ۷، ۹، ۱۱)، نسبت آلاینده به زیست توده (۷/۵۰، ۱۵، ۲۲/۵۰، ۳۰، ۳۷/۵ میلی‌گرم به گرم) و زمان ماند (۱، ۲، ۳، ۴، ۵ ساعت) به عنوان متغیرهای اصلی در نظر گرفته شد. pH مهمنترین پارامتر تاثیرگذار بر روی حذف سرب و فناتنرن از خاک بود. بیشترین درصد حذف سرب با میزان ۹۶/۷۹ درصد pH برابر ۸، میزان نسبت آلاینده به موجوده زنده برابر با ۳۰ W/W و زمان ۲ ساعت به دست آمد. در مورد فناتنرن، بیشترین درصد حذف فناتنرن (۹۷/۴ درصد) در pH برابر ۷، نسبت آلاینده به موجوده زنده برابر با ۲۲/۵ W/W و زمان ۱ ساعت اندازه‌گیری شد. نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از باکتری در مقایسه با فرایند پاک‌سازی بدون باکتری (۴۲ درصد برای فناتنرن و ۶۷ درصد برای سرب)، کارآمدی فرایند حذف را افزایش داد.

**واژه‌های کلیدی:** فروشوبی زیستی، سرب، فناتنرن، احیای خاک، سطح پاسخ

### ۱- مقدمه

انسانی ناپایدار از نظر محیط‌زیستی، خاک با بی‌شمار ترکیبات معدنی و آلی سمی، آلوده شده است. نفت به دلیل سمیت بالا و حضور در مقدار زیاد در بیوسفر، یکی از خطرناک‌ترین آلاینده‌های محیط‌زیستی محسوب می‌شود (Stepanova et al., 2022).

خاک یکی از مهم‌ترین منابع طبیعی است، زیرا از عملکردهای حیاتی اکولوژیکی و اکوسيستمی زیادی پشتیبانی می‌کند. با این وجود در مقیاس جهانی به دلیل طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های



اکسیداسیون منگنز برای بیولوژیک خاک‌های آلوده به فلزات سنگین اشاره کرد (Li et al., 2020).

این پژوهش با هدف بهینه‌سازی کاربرد فروشوبی زیستی در احیا خاک آلوده پالایشگاه نفت جنوب تهران با تکیه بر توانایی بیولوژیکی خود انجام شد.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۱-۲- آماده‌سازی خاک

نمونه‌برداری این پژوهش به صورت تصادفی مرکب و به شکل نقطه‌ای، از ۱۰ نقطه که به شکل پیوسته در معرض آلودگی خاک بودند، انجام شد (شکل ۱). بر اساس دستورالعمل نمونه‌برداری از خاک LSW-10-00، عمق برداشت خاک صفر تا ۳۰ سانتی‌متری سطح زمین و سطح برداشت  $20 \times 20$  سانتی‌متری بود. نمونه خاک در دمای اتاق خشک و برای دستیابی به خاکی یکنواخت از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شد. به منظور حذف مواد آلی، خاک با استون صنعتی و سپس با استون با درجه خلوص بیش از ۹۹ درصد شسته و با آب مقطر برای حذف استون شستشو داده شد (Wu et al., 2022).

۱۰ گرم نمونه خاک شسته شده در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری توزیع و به ترتیب از محلول فنانترن در استون و محلول سرب در آب مقطر برای دستیابی به غلظت نهایی  $mg/kg$  ۵۰۰ فنانترن و سرب  $50 mg/kg$  در خاک، به نمونه‌های خاک اضافه شد.

پیش از شروع آزمایش و به منظور ارزیابی ترکیبات موجود در خاک پالایشگاه، مواد آلی موجود در خاک با استفاده از آزمایش تراوشن آلودگی<sup>۱</sup> و مطابق با استاندارد EPA-1311 بررسی شد (LaConde, 1983). به منظور انجام این آزمایش خاک خرد و از الک ۹۵/۰ میلی‌متر عبور داده شد. سپس با استفاده از محلول استون و با نسبت ۱ به ۲۰ به درون ظرف مخصوص تامبلر ترکیب و به مدت ۱۸ ساعت با سرعت ۳۰ دور بر دقیقه مخلوط شد. با جداسازی فاز جامد و مایع غلظت آلودگی در محلول شستشو با انجام آزمایش جذب (دستگاه HPLC<sup>۲</sup> با مشخصات ستون آنالیز  $250 mm ID \times 4.1 \text{ cm}_{18}$ ، سرعت جریان  $1 mL/min$ ، حجم

آلودگی نفتی بر ساختار خاک تاثیر منفی گذاشت و ترکیب شیمیایی، ساختار و خواص و حاصلخیزی خاک را به طور جدی تغییر می‌دهد. اغلب روش‌های پاک‌سازی و اصلاح خاک مبتنی بر اقتصادی بودن روش بوده و تکنیک‌های غیر قابل اجرا و یا از نظر محیط‌زیستی مخرب هستند. در نتیجه در سال‌ها و دهه‌های گذشته، روش‌های بیولوژیکی پایدارتر و نوآورانه‌تری برای اصلاح خاک ابداع شده که با استفاده از آنها، غلظت آلاینده‌ها با روش‌های زیستی به شکل کارآمدی کاهش پیدا کند (Lacalle et al., 2020).

ترمیم خاک با توجه به نوع خاک می‌تواند یک دوره ۱۰ تا ۳۰ سال یا بیشتر طول بکشد. اصلاح زمین‌های آلوده به نفت مستلزم یک سری اقدامات برای پاک‌سازی و احیای خاک به عنوان یک محیط طبیعی است (Stepanova et al., 2022).

روش‌های فیزیکی و شیمیایی پاک‌سازی خاک، محدودیت‌ها و معایب خاص خود را داشته و اثرات جانبی مختلفی را بر روی جانداران و محیط‌زیست نشان می‌دهند که روش‌های پایداری سازگار با محیط‌زیست است که از طریق آن ترکیبات نفتی، با کمک میکرووارگانیسم‌ها و با کمک واکنش‌های آنزیمی تجزیه شده و به دی‌اکسید کربن، زیست‌توده و ترکیبات محلول در آب تبدیل می‌شوند (Mambwe et al., 2021). در این روش هیچ تغییر و آسیبی به اکوسیستم تحمیل نمی‌شود، اما زمان بر بودن آن عاملی محدودکننده برای این استراتژی است. سرعت پاک‌سازی روش‌های بیولوژیکی را می‌توان از طریق معرفی گونه‌های سازگار و بومی منطقه تسريع کرد (Abolhasani Sooraki et al., 2020).

امروزه روش‌های پالایش بیولوژیکی به دلیل سازگاری با محیط‌زیست و استفاده میکرووارگانیسم‌های آب و خاک از ترکیبات نفتی به عنوان منبع کربن و انرژی و تجربه بیولوژیکی آنها از طریق تولید بیوسورفتکنات‌ها مورد توجه قرار گرفته است (Yadav and Sharma, 2023) که می‌توان به پژوهش‌های Subashchandrabose و همکاران در سال ۲۰۱۹، طی پژوهشی احیای زیستی خاک آلوده شده با PAHs توسط هم‌افزایی فعالیت گونه‌های جلبک *Rhodococcus* و گونه باکتری *Chlorella sp.* و گونه باکتری *wratislaviensis* (Subashchandrabose et al., 2019) و گونه باکتری *Providencia sp.* با قابلیت جذب بالا و توانایی بومی پژوهش لی و همکاران در سال ۲۰۲۰، روی شناسایی گونه باکتری *Providencia sp.* با قابلیت جذب بالا و توانایی

<sup>1</sup> Toxicity Characteristic Leading Procedure (TCLP)

<sup>2</sup> High Performance Liquid Chromatography (HPLC)



**Fig. 1.** Sampling points in Tehran refinery

شکل ۱- نقاط نمونهبرداری در پالایشگاه تهران

**جدول ۱- آنالیز خاک پالایشگاه تهران (mg/kg)**

**Table 1.** Soil analysis of Tehran Refinery (mg/kg)

Factor	Iron	Nickel	Copper	Zinc	Cadmium	Lead	TPH	Phenanthrene
Amount	354.6	11.75	14.67	241	100.3	466	11500	586

شد تا باکتری‌های رشد کرده جدا شوند. باکتری‌های رشد یافته در محیط کشت جدا شده با آزمون‌های بیوشیمیایی و رنگ‌آمیزی گرم، شناسایی شدند.

تزریق  $20\text{ }\mu\text{m}$  طول موج دتکتور ( $220\text{ mm}$ ) تعیین شد. با توجه به جدول ۱، سرب و فنانترن، بیشترین میزان را در خاک پالایشگاه تهران داشتند.

#### ۴-۲- انجام آزمایش

در این بخش، pH محیط، نسبت آلائینده به زیست‌توده و زمان ماند به عنوان متغیرهای اصلی در نظر گرفته شد. در جدول ۲، متغیرها و محدوده‌های بررسی شده در فرایند فروشویی زیستی حذف سرب و فنانترن بر اساس پژوهش‌های زندوکیلی و همکاران در سال ۱۳۸۳ و زاده نیلساز و همکاران در سال ۱۳۸۷ تعیین شد. در این مرحله با انجام ۲۰ آزمایش (جدول ۳)، کارایی فرایند فروشویی زیستی در جذب آلائینده تعیین شد.

شرایط آزمایش کاربرد فرایند فروشویی زیستی در احیای خاک‌های آلوده به فلز سنگین سرب و فنانترن مقاوم به تجزیه بیولوژیکی در جدول ۳ نشان داده شده است. در این مرحله با انجام ۲۰ آزمایش، کارایی فرایند فروشویی زیستی در جذب آلائینده تعیین شد.

#### ۲-۲- کاربرد فرایند بیولوژیکی در حذف فنانترن و سرب از خاک

در این فرایند، ابتدا یک کنسرسیوم میکروبی که در خاک‌های آلوده به این آلائینده‌ها (سرب و فنانترن) رشد کرده‌اند تهیه و در محیط آزمایشگاهی تغليظ شد. مراحل انجام آزمایشات در این مرحله به صورت زیر بود:

#### ۳-۲- نمونه‌برداری، جداسازی و شناسایی سویه‌های باکتریایی مقاوم به سرب و فنانترن

برای انجام این مرحله، از ۶ نقطه خاک اطراف پالایشگاه و از عمق صفر تا ۲۰ سانتی‌متری نمونه‌برداری انجام شد. برای برداشت نمونه خاک از بیلچه استریل استفاده و خاک در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شد. در آزمایشگاه، نمونه‌های همگن شده خاک با رقت ۱ تا ۱۰ در سرم فیزیولوژی استریل و روی محیط مکانیکی آگار کشت



## جدول ۲- متغیرها و محدوده‌های مورد بررسی در فرایند فروشوبی زیستی حذف سرب و فناترن

**Table 2.** Variables and limits investigated in the bioleaching process of lead and phenanthrene removal

	Name	Units	Low	High	-alpha	+alpha
A [Numeric]	pH	-	5	9	3	11
B [Numeric]	W/W	mg/g	15	30	7.5	37.5
C [Numeric]	Time	hr	2	4	1	5

## جدول ۳- شرایط آزمایش فرایند فروشوبی زیستی حذف سرب و فناترن از خاک پالایشگاه تهران

**Table 3.** Test conditions of the biological leaching process to remove lead and phenanthrene from the soil of Tehran Refinery

	Std	Run	Block	A:pH	B:W/W mg/g	C:Time hr
	17	1	Block 1	7.00	22.50	3.00
	6	2	Block 1	9.00	15.00	4.00
	5	3	Block 1	5.00	15.00	4.00
	19	4	Block 1	7.00	22.50	3.00
	11	5	Block 1	7.00	7.50	3.00
	20	6	Block 1	7.00	22.50	3.00
	8	7	Block 1	9.00	30.00	4.00
	10	8	Block 1	11.00	22.50	3.00
	15	9	Block 1	7.00	22.50	3.00
	14	10	Block 1	7.00	22.50	5.00
	13	11	Block 1	7.00	22.50	1.00
	16	12	Block 1	7.00	22.50	3.00
	2	13	Block 1	9.00	15.00	2.00
	7	14	Block 1	5.00	30.00	4.00
	12	15	Block 1	7.00	37.50	3.00
	18	16	Block 1	7.00	22.50	3.00
	9	17	Block 1	3.00	22.50	3.00
	4	18	Block 1	9.00	30.00	2.00
	3	19	Block 1	5.00	30.00	2.00
	1	20	Block 1	5.00	15.00	2.00

## ۳- نتایج

آزمایشات رقتی از میزان  $10^{-3}$  تا  $10^{-7}$  Logcfu/g برای پتانسیل حذف آلاینده استفاده شد و میزان  $10^{-5}$  بدون اختلاف معنی‌دار با  $10^{-6}$  Logcfu/g و اختلاف معنی‌دار با  $10^{-3}$  تا  $10^{-5}$  Logcfu/g انتخاب شد.

## ۳- سرب

با توجه به نتایج جدول ۴، در حذف سرب، زمان با مقدار P-value  $<0.0458$  عامل معنی‌دار و تأثیرگذاری بر روی حذف سرب بود ( $P<0.05$ ). همچنین pH با P-value  $<0.0081$  و نسبت آلاینده به موجوده زنده با  $<0.0250$  به ترتیب مهمترین

با توجه به تست‌های تشخیص بیوشیمیایی، در نمونه‌های خاک باکتری سودوموناس آئروژینوزا جداسازی و تشخیص داده شد. این باکتری هوایی اجباری بوده و روی آگار خوندار و آگار آبی آئوزین متیل تیوینی جداسازی شد. کلنجی‌های رشدیافته صاف و گرد با رنگ سفید بودند. شناسایی این باکتری بر پایه مورفولوژی گرم، بدون اسپور، تاژک‌دار، کاتالاز مثبت، متحرک، ناتوانی در تخمیر لاكتوز (یک واکنش اکسیداز مثبت)، بو (انگور) و توانایی رشد در دمای ۴۲ درجه سلسیوس شناسایی شد.

ویژگی فلوئورسانس زیر نور فرابنفش نیز به منظور تشخیص فوری کلنجی‌های سودوموناس آئروژینوزا استفاده شد. بر اساس



جدول ۴- تحلیل واریانس برای حذف فناترن و سرب مقاوم به تجزیه بیولوژیکی با استفاده از فرایند بیولوژیک

**Table 4.** Analysis of variance for the removal of phenanthrene and lead resistant to biological degradation using biological process

Source	df	Phenanthrene		Lead	
		F-value	P-value	F-value	P-value
Model	9	3.66	0.0277	5.47	0.0069
A-pH	1	12.95	0.0049	110.85	0.0081
B-W/W	1	4.97	0.0498	86.94	0.0250
C-Time	1	0.6392	0.4426	59.15	0.0457
AB	1	0.1044	0.7532	0.8111	0.3890
AC	1	0.0525	0.8234	7.49	0.0210
BC	1	9.68	0.0110	4.01	0.0730
A <sup>2</sup>	1	4.84	0.0524	5.66	0.0386
B <sup>2</sup>	1	1.89	0.1194	3.09	0.1093
C <sup>2</sup>	1	14.15	0.0037	3.51	0.0905
Residual	10				
Lack of fit	5	0.5971	0.7074	1.86	0.2558
Pure error	5				
Cor total	19				
R <sup>2</sup> -squared		0.9801			0.8311
Adj R <sup>2</sup> -squared		0.9568			0.9267
Pred R <sup>2</sup> -squared		0.9758			0.9455
Adeq precision		71.85			73.23

آمد (شکل ۳ و ۴). در نمونه شاهد، بیشترین درصد حذف سرب ۶۷ درصد اندازه‌گیری شد.

### ۲-۳- فناترن

در حذف فناترن (جدول ۴)، زمان عامل معنی‌داری نبود ( $P > 0.05$ ، اما pH و نسبت آلاینده به موجوده زنده عواملی تأثیرگذار بودند ( $P < 0.05$ ) که با توجه به میزان F-value، سطح pH مهمترین پارامتر تأثیرگذار بر روی حذف فناترن از خاک طی فرایند بیولوژیکی بود. مدل بهبودیافته حذف فناترن با استفاده از فرایند بیولوژیک از نوع رابطه درجه دوم بود که در معادله ۲ ارائه شده است. همچنین بر اساس این رابطه زمان  $\times$  نسبت آلاینده به موجوده زنده دارای اثر تداخلی بودند

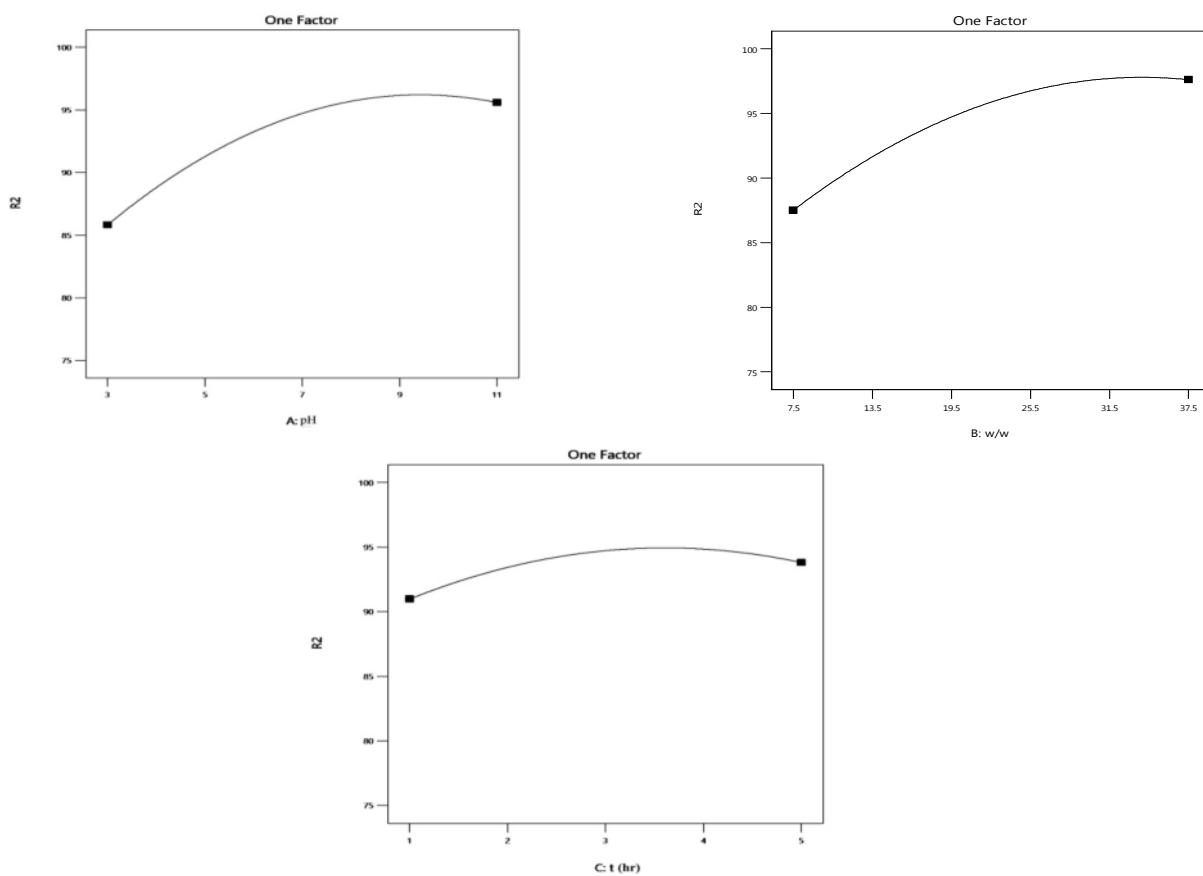
$$R_1 = 96.11 - 1.38A + 1.258B - 2.56BC - 1.40C^2 \quad (2)$$

پارامترهای تأثیرگذار بر روی حذف سرب از خاک طی فرایند بیولوژیکی بودند. مدل بهبودیافته حذف سرب تحت تأثیر فرایند بیولوژیکی با توجه به معادله ۱، از نوع معادله درجه دوم بود

$$R_2 = 95.87 + 4.21A + 5.05B + 8.365C + 4.85AC - 4.02A^2 \quad (1)$$

در حالت بررسی منفرد هر پارامتر، درصد حذف سرب با افزایش میزان pH (شکل ۲-A) روندی افزایشی داشت و در pH معادل ۸ بیشترین درصد حذف سرب را داشت. چنین روندی در مورد نسبت آلاینده به موجوده زنده (شکل ۲-B) و زمان (شکل ۲-C) نیز مشاهده شد و بیشترین درصد حذف سرب با میزان ۹۶/۷۹ درصد در شرایط pH برابر ۸، میزان نسبت آلاینده به موجوده زنده برابر با ۳۰ W/W و زمان ۲ ساعت به دست



**Fig. 2.** The influence curve of independent variables on the percentage of lead removal

A) pH, B) the ratio of pollutant to living organisms and C) time

شکل ۲- منحنی تاثیر متغیرهای مستقل بر میزان درصد حذف سرب (A) pH، (B) نسبت آلائینده به موجوده زنده و (C) زمان

۹۲۶۷/۰ و در مورد فلز فناتنرن ۹۸۰۱/۰ و ۹۵۶۸/۰ بود. ضریب رگرسیون پیش‌بینی شده توسط مدل  $R^2$  در مورد سرب و فناتنرن ۹۴۵۵/۰ و ۹۷۵۸/۰ بود که نشان‌دهنده آن است که مقدار به دست آمده تجربی با مقدار پیش‌بینی شده مدل تطابق زیادی دارد (جدول ۴).

#### ۴- بحث

زیست پالایی، روشی پایدار است و با تجزیه آلائیندها مانع از انتشار آنها در محیط‌زیست می‌شود. پژوهشگران به دلیل سازگار بودن با محیط و هزینه‌های کم روش زیست پالایی، روش‌های مختلف زیست پالایی را توسعه داده و مدل‌سازی کردند. با این حال به دلیل تنوع آلائینده‌های محیطی، هیچ روش زیست پالایی وجود ندارد که به تنها یک روش واحد برای احیای محیط‌های آلوده به کار رود، بنابراین میکروارگانیسم‌های بومی موجود در

با توجه به شکل ۴-۵، با افزایش میزان pH از ۳. درصد حذف افزایش و سپس کاهش پیدا کرد. با توجه به شکل ۴-۵ در خصوص نسبت آلائینده به موجوده زنده، روند افزایش میزان درصد حذف با افزایش این شاخص با شبیه ملایم قابل مشاهده بود. در شکل ۴-۵ روند حذف فناتنرن تا محدوده ۳ ساعت روندی افزایشی داشت و سپس کاهشی شد. به این ترتیب بهترین شرایط برای بیشترین درصد حذف فناتنرن (۹۷/۴ درصد) در pH برابر ۷، نسبت آلائینده به موجوده زنده برابر با ۲۲/۵ W/W و زمان ۱ ساعت به دست آمد (شکل ۴-۷). در نمونه شاهد، بیشترین درصد حذف فناتنرن ۴۲ درصد اندازه‌گیری شد.

مقدار ضریب رگرسیون ( $R^2$ ) و ضریب رگرسیون تصحیح شده<sup>۱</sup> برای مدل درجه دوم پیش‌بینی شده در فلز سرب ۸۳۱۱/۰ و

<sup>۱</sup> Adjusted R-Squared (AdjR<sup>2</sup>)



بودند. pH یکی از پارامترهای بسیار مهم در پاکسازی گونه‌های فلزی در قالب فرایندهای جذب زیستی به شمار می‌آید. زیرا pH محلول، رفتار گونه‌های فلزی را به واسطه نقشی که در امکان اتصال آنها به آگروپلی‌ساقاریدها دارد تحت تأثیر قرار می‌دهد. در حقیقت باز گروه‌های عامل موجود در آگروپلی‌ساقاریدها، به واسطه عمل پروتون‌گیری و پروتون‌زادایی تغییر یافته و به این دلیل، جذب و دفع گونه‌های فلزی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. (Silva et al., 2008)

در مورد درصد حذف فناتنرن با افزایش pH از محدوده ۳، روند کاهشی و در مورد سرب تا محدوده ۸ روند افزایشی داشت و سپس کاهش یافت. اما در حالت تلفیقی که تأثیر کلیه شرایط با هم بررسی می‌شود، pH برابر ۷ در مورد فناتنرن و pH برابر ۸ در مورد سرب بهترین محدوده را داشتند که این موضوع می‌تواند به توانایی زیست باکتری در محدوده pH خشی مریوط باشد (Wirasnita and Hadibarata, 2016).

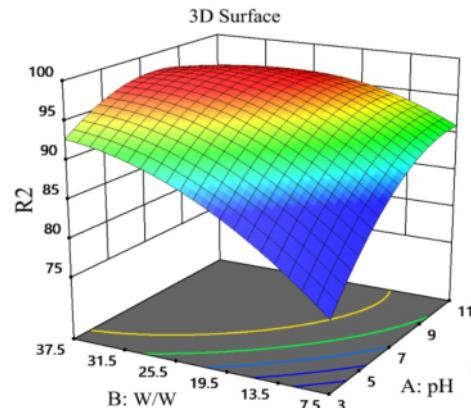
در pHهای بالا، باز منفی خالص بر روی اجزای دیواره سلولی جاذب حضور دارد. در نتیجه این باز منفی، کاتیون‌های فلزی به راحتی جذب نقاط اتصال روی جاذب می‌شوند (Vijayaraghavan and Yun, 2008).

پاور در سال ۲۰۱۵، با بررسی تأثیر pH خاک بر احیای بیولوژیکی هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای به این نتیجه رسید که pH برابر ۷/۵ برای احیای بیولوژیکی کلیه ترکیبات PAH مناسب است (Pawar, 2015).

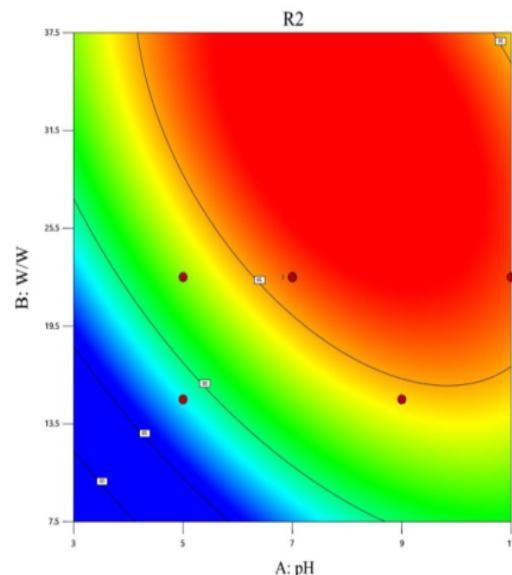
در pHهای بیش از ۵/۵ به علت افزایش غلظت یون‌های OH در محلول، سرب به صورت  $Pb(OH)_2$  رسوب می‌کند (Norton and D'Amore, 1994).

همچنین ممکن است به دلیل افزایش pH و قلیایی شدن محیط و رسوب کلسیم در خاک، فعالیت یون کلسیم کاهش یافته و در نتیجه حذف فلز سنگین توسط EDTA از خاک افزایش یابد (Wang et al., 2019).

همچنین در شرایط اسیدیته فلزات عمدهاً به ساختارهای مشبك پایدار متصل و بدون واکنش هستند (Chen et al., 2015) که این موضوع در مورد سرب قابل مشاهده است، اما در مورد فناتنرن به نظر می‌رسد مقدار pH بالا، باعث تهشیینی کمپلکس‌های فلزی و خارج شدن آنها از دسترس شده است (Volesky, 1990).



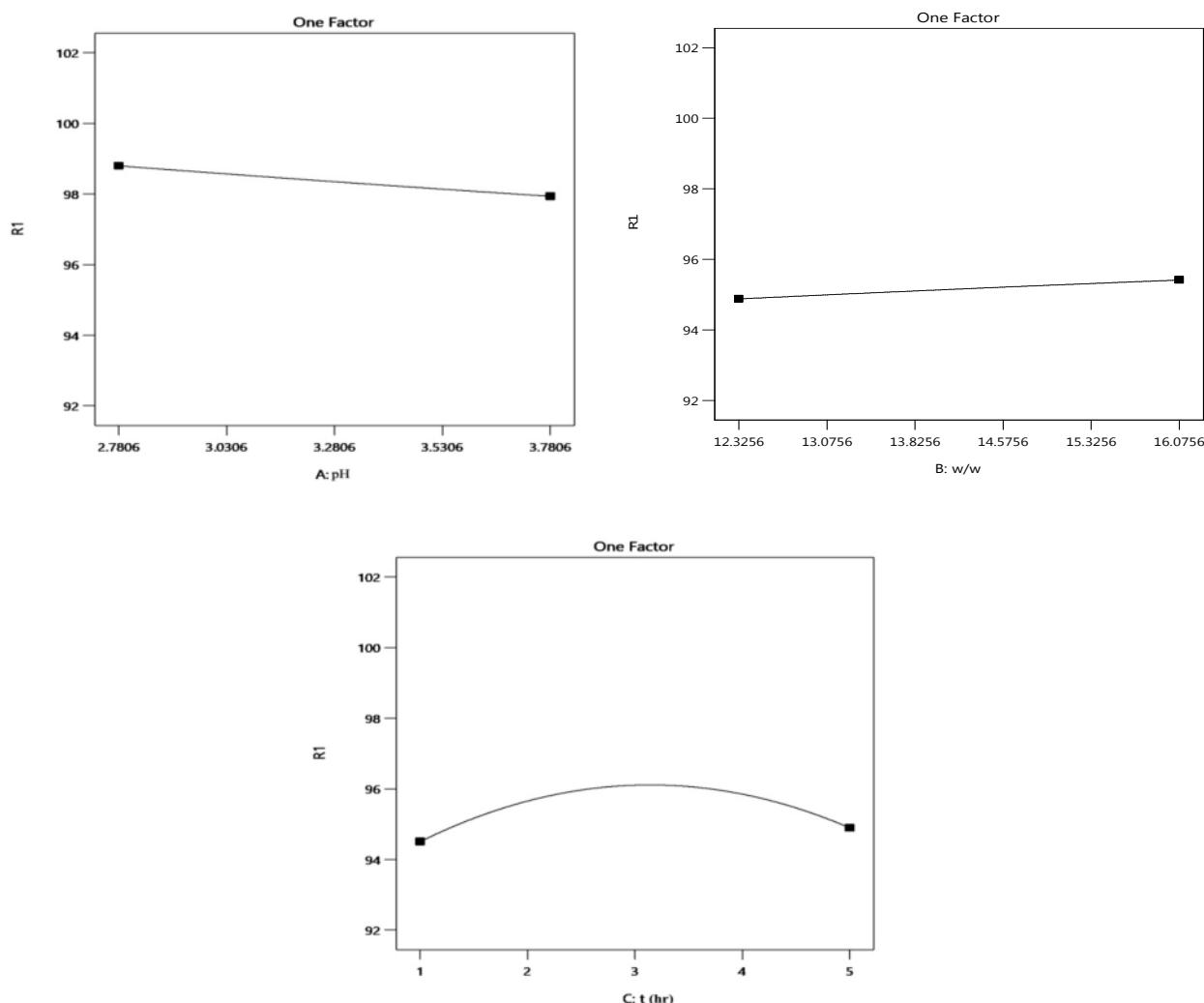
**شکل ۳-** اثر متقابل pH، زمان و نسبت آلاینده به موجود زنده بر حذف سرب با استفاده از فرایند بیولوژیک



**شکل ۴-** نمودار خطی همتراز اثر عوامل pH، زمان و نسبت آلاینده به موجود زنده، جریان و زمان بر روی درصد حذف سرب

محیط‌های آلوده بهترین راه برای تجزیه آلاینده‌ها هستند. پس از طی دو مرحله شستشو و الکترووفتسون، خاک آلوده در معرض باکتری‌های جدا شده از محیط قرار گرفت. سه پارامتر زمان، pH و نسبت آلاینده به موجود زنده بر روی درصد حذف سرب و دو پارامتر pH و نسبت آلاینده به موجود زنده در حذف فناتنرن مؤثر





**Fig. 5.** The influence curve of independent variables on the percentage removal of phenanthrene

A) pH, B) Pollutant to living organism ratio and C) Time

شکل ۵- منحنی تاثیر متغیرهای مستقل بر میزان درصد حذف فنانترن (A) pH، (B) نسبت آلاینده به موجود زنده و (C) زمان

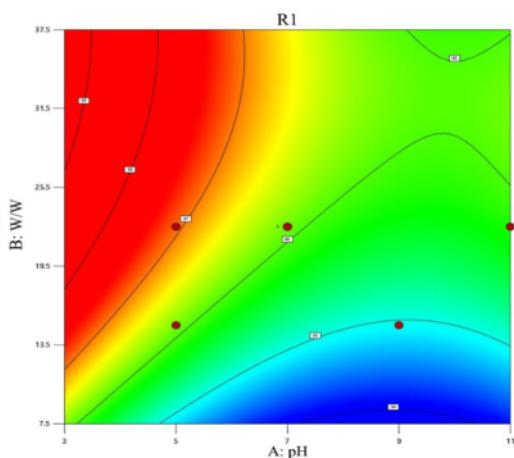
و فنانترن، به نظر می‌رسد، باکتری توانایی خود را از دست می‌دهد که نشان‌دهنده تاثیر مستقیم غلظت بر ساختار و متابولیسم باکتری است.

راجا و همکاران در سال ۲۰۰۶، با قرار دادن باکتری *P.aerugionsa* در معرض غلظت‌های مختلف فلزات سرب و برسی رشد آن متوجه شدند که با افزایش غلظت فلز سنگین، سرعت رشد کاهش یافته و باکتری رشد خود را با تأخیر آغاز می‌کند که توجیه‌کننده کاهش درصد حذف با افزایش این نسبت است (Raja et al., 2006).

در هر دو آلاینده میزان جذب در ابتدای شروع آزمایش، افزایشی و با گذشت زمان، کاهشی شد که می‌تواند به دلیل اثر رقابت با سایر بیون‌های موجود در محلول در اثر افزایش حلایت فازهای

جامد خاک با گذشت زمان باشد (Wang et al., 2019). همچنین با توجه به نمودار درصد حذف سرب و فنانترن، با افزایش نسبت آلاینده به موجود زنده درصد حذف افزایش پیدا کرد که این موضوع ناشی از احاطه سایت‌های فعال باکتری به وسیله بیون‌های فلزی و یا هیدروکربنی است که جذب را افزایش می‌دهند. البته با افزایش بیشتر این نسبت به ۳۰/۵ و ۵/۲۲ W/W برای سرب



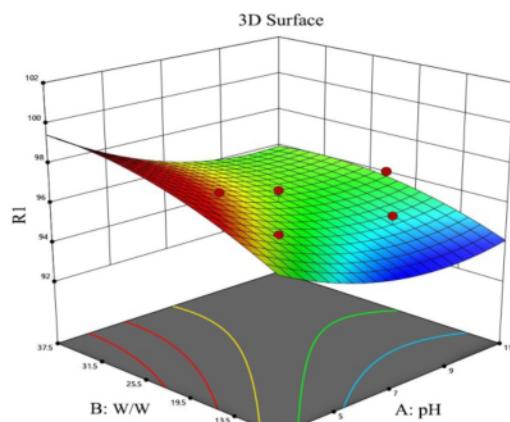


**Fig. 7.** Parallel linear diagram of the effect of pH factors, time and the ratio of pollutant to living organisms, heat and time on the percentage of lead removal

شکل ۷- نمودار خطی هم تراز اثر عوامل pH، زمان و نسبت آب ایند به موجوده زنده، جریان و زمان بر روی درصد حذف سرب

جنوب تهران به سرب و فناutron با استفاده از روش بیولوژیکی و باکتری های بومی خاک مورد نظر و بازگرداندن خاک به وضعیت زنده بود.

باکتری سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از خاک، ۹۷/۴ درصد از فناutron و ۹۶/۷۹ درصد از سرب خاک را در مقایسه با حذف بدون باکتری (در نمونه شاهد ۴۲ درصد برای فناutron و ۶۷ درصد برای سرب) پاک سازی کرد.



**Fig. 6.** Interaction effect of pH, time and pollutant-to-living ratio on phenanthrene removal using biological process

شکل ۶- اثر متقابل pH، زمان و نسبت آب ایند به موجوده زنده بر حذف فناutron با استفاده از فرایند بیولوژیک

وجود مرحله تأخیر در آغاز رشد باکتری در غلظت های بالای فلز ممکن است ناشی از ترمیم ضایعات ناشی از مواجهه شدن با فلز سرب و همچنین به دلیل سازگاری با شرایط محیطی جدید مدت زمانی را به شکل فاز تأخیر سپری می کند.

## ۵- نتیجه گیری

هدف از این پژوهش، کاهش سطح آلودگی خاک پالایشگاه نفت

## References

- Abolhasani Sooraki, M., Poozesh, V., Salimi, F. & Mehrabian, A. R. 2020. Rhodococcus ruber KE1 augmented phytoremediation of crude oil contamination using *Lolium perenne* and *Festuca rubra rubra*. *Microbiology, Metabolites and Biotechnology*, 3, 1-18. <https://doi.org/10.22104/ARMMT.2021.4526.1049>.
- Chen, M., Xu, P., Zeng, G., Yang, C., Huang, D. & Zhang, J. 2015. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: applications, microbes and future research needs. *Biotechnology Advances*, 33, 745-755. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.05.003>.
- LaConde, K. 1983. *Process Design Manual for Land Application of Municipal Sludge*, US Environmental Protection Agency. *Center for Environmental Research*. New York, USA.
- Lacalle, R. G., Becerril, J. M. & Garbisu, C. 2020. Biological methods of polluted soil remediation for an effective economically-optimal recovery of soil health and ecosystem services. *Journal of Environmental Science and Public Health*, 4, 112-133. <https://doi.org/10.26502/jesph.96120089>.
- Li, D., Li, R., Ding, Z., Ruan, X., Luo, J., Chen, J., et al. 2020. Discovery of a novel native bacterium of *Providencia sp.* with high biosorption and oxidation ability of manganese for bioleaching of heavy metal contaminated soils. *Chemosphere*, 241, 125039. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125039>.



- Mambwe, M., Kalebaila, K. & Johnson, T. 2021. Remediation technologies for oil contaminated soil. *Global Journal of Environmental Science and Management*, 7, 419-438. <https://doi.org/10.22034/gjesm.2021.03.07>.
- Norton, S. & D'amore, T. 1994. Physiological effects of yeast cell immobilization: applications for brewing. *Enzyme and Microbial Technology*, 16, 365-375. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90150-3](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90150-3).
- Pawar, R. M. 2015. The effect of soil pH on bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS). *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, 6, 291-304. <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000291>.
- Raja, C. E., Anbazhagan, K. & Selvam, G. S. 2006. Isolation and characterization of a metal-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 577-585. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-9074-4>.
- Silva, B., Figueiredo, H., Quintelas, C., Neves, I. C. & Tavares, T. 2008. Zeolites as supports for the biorecovery of hexavalent and trivalent chromium. *Microporous and Mesoporous Materials*, 116, 555-560. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2008.05.015>.
- Stepanova, A. Y., Gladkov, E. A., Osipova, E. S., Gladkova, O. V. & Tereshonok, D. V. 2022. Bioremediation of soil from petroleum contamination. *Processes*, 10, 1224. <https://doi.org/10.3390/pr10061224>.
- Subashchandrabose, S. R., Venkateswarlu, K., Venkidusamy, K., Palanisami, T., Naidu, R. & Megharaj, M. 2019. Bioremediation of soil long-term contaminated with PAHs by algal–bacterial synergy of *Chlorella sp.* MM3 and *Rhodococcus wratislaviensis* strain 9 in slurry phase. *Science of The Total Environment*, 659, 724-731. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.453>.
- Vijayaraghavan, K. & Yun, Y. S. 2008. Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances*, 26, 266-291. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.02.002>.
- Volesky, B. 1990. Biosorption by fungal biomass. *Biosorption of Heavy Metals*, 15, 139-72.
- Wang, D., Tang, G., Yang, Z., Li, X., Chai, G., Liu, T., et al. 2019. Long-term impact of heavy metals on the performance of biological wastewater treatment processes during shock-adaptation-restoration phases. *Journal of Hazardous Materials*, 373, 152-159. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.03.069>.
- Wirasnita, R. & Hadibarata, T. 2016. Potential of the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* F043 for degradation and transformation of fluoranthene. *Pedosphere*, 26, 49-54. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(15\)60021-2](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(15)60021-2).
- Wu, B., Guo, S., Zhang, L., Wang, S., Liu, D., Cheng, Z., et al. 2022. Spatial variation of residual total petroleum hydrocarbons and ecological risk in oilfield soils. *Chemosphere*, 291, 132916. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132916>.
- Yadav, M. & Sharma, P. 2023. Current eco-friendly and sustainable methods for heavy metals remediation of contaminated soil and water: special emphasis on use of genetic engineering and nanotechnology. *Pollution*, 9, 1028-1048. <https://doi.org/10.22059/POLL.2023.345177.1522>.
- Zadehnilsaz, E., Khakzad, A. & RashidneJhadomran, N. 2008. Gold extraction from low grade sulfide minerals in Chahkhatoon and Senjedeh mines by bioleaching technique (Muteh mine field, Isfahan State). *Journal of Geotechnical Geology*, 4(1), 37-48. (In Persian)
- Zandvakili, S., Ranjbar, M. & Manafi, Z. 2005. Investigating the efficiency of bioleaching in order to recover copper from the concentrate tailings of Sarcheshmeh copper complex. *Iranian Mining Engineering Conference*, University of Tarbiat Modarres, Tehran, Iran. (In Persian)



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

