

Water and Wastewater, Vol. 34, No. 5, pp: 89-101

# 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](mailto: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, A. 2024. "Optimizing the use of biological washing in rehabilitating the polluted soil of South Tehran oil refinery" *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 5.22 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.



## 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.

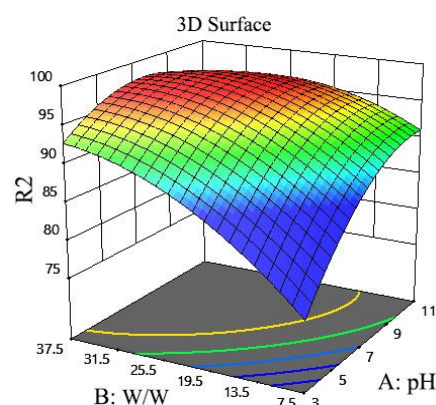
## 3. Results

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

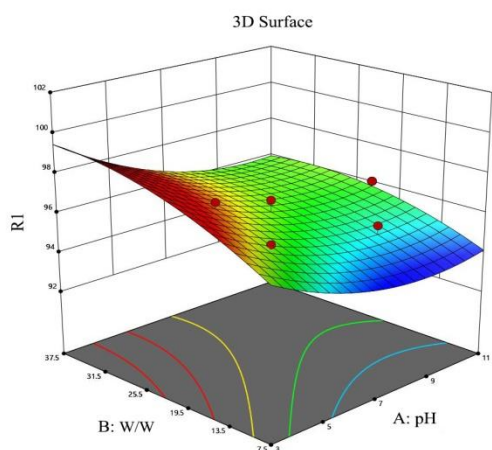
In the context of phenanthrene removal, time was insignificant ( $P > 0.05$ ), while both pH and the pollutant-to-microorganism ratio were identified as influential factors ( $P < 0.05$ ). According to the F-value, pH was determined to be the most significant parameter influencing phenanthrene removal 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).



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

## بهینه‌سازی کاربرد فروشویی 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

پدیرش (۱۴۰۲/۹/۶) دریافت (۱۴۰۲/۸/۱۱)

برای ارجاع به این مقاله به صورت زیر اقدام بفرمایید:

طباطبایی، م.، مافی غلامی، ر.، برقی، م.، اسرافیلی، ع.، ۱۴۰۲، "بهینه‌سازی کاربرد فروشویی زیستی در احیای خاک آلوده پالایشگاه نفت جنوب تهران"

<https://doi.org/10.22093/wwj.2023.423458.3380>. ۸۹-۱۰۱، (۵)۳۴، آب و فاضلاب،

### چکیده

فروشویی زیستی روشی غیرتهاجمی، نسبتاً مقرون به صرفه و سازگار با محیط‌زیست است که از طریق آن ترکیبات سمی، با کمک میکروارگانیسم‌ها و با کمک واکنش‌های آنزیمی تجزیه می‌شوند. این پژوهش به منظور استفاده از فروشویی زیستی برای احیای خاک آلوده و مقاوم به تجزیه بیولوژیکی به فلز سنگین سرب و فنانترن اطراف پالایشگاه نفت جنوب تهران انجام شد. طراحی آزمایش با روش سطح پاسخ انجام شد. در روش فروشویی زیستی، سوپه خالص شده (سودوموناس آنروژینوزا) از خاک پالایشگاه جداسازی شد. محیط (۳، ۵، ۷، ۹، ۱۱)، نسبت آلاینده به زیست توده (۷/۵۰، ۱۵، ۲۲/۵۰، ۳۰، ۳۷/۵ میلی گرم به گرم) و زمان ماند (۱، ۲، ۳، ۴، ۵ ساعت) به عنوان متغیرهای اصلی در نظر گرفته شد. pH مهمترین پارامتر تأثیرگذار بر روی حذف سرب و فنانترن از خاک بود. بیشترین درصد حذف سرب با میزان ۹۶/۷۹ درصد pH برابر ۸، میزان نسبت آلاینده به موجود زنده برابر با ۳۰ W/W و زمان ۲ ساعت به دست آمد. در مورد فنانترن، بیشترین درصد حذف فنانترن (۹۷/۴ درصد) در pH برابر ۷، نسبت آلاینده به موجود 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 فنانترن و ۶۷ درصد برای سرب)، کارآمدی فرایند حذف را افزایش داد.

واژه‌های کلیدی: فروشویی زیستی، سرب، فنانترن، 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 اکوسیستمی زیادی پشتیبانی می‌کند. با این وجود در مقیاس جهانی به دلیل طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های



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

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

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- 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 ۲۰×۲۰ 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 فناترن در استون و محلول سرب در آب مقطر برای دستیابی به غلظت نهایی ۵۰۰ mg/kg فناترن و سرب ۵۰ 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 تراوش آلودگی<sup>۱</sup> و مطابق با استاندارد EPA-1311 بررسی شد (LaConde, 1983). به منظور انجام این آزمایش خاک خرد و از الک ۰/۹۵ 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 C<sub>18</sub> 4.1 × 250 mm ID، سرعت جریان ۱ mL/min، حجم

آلودگی نفتی بر ساختار خاک تاثیر منفی گذاشته 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 نیستند. فروشویی زیستی روشی غیرتهاجمی، نسبتاً مقرون‌به‌صرفه و سازگار با محیط‌زیست است که از طریق آن ترکیبات نفتی، با کمک میکروارگانیسم‌ها و با کمک واکنش‌های آنزیمی تجزیه شده و به دی‌اکسید کربن، زیست توده و ترکیبات محلول در آب تبدیل می‌شوند (Mambwe et al., 2021). در این روش هیچ تغییر و آسیبی به اکوسیستم تحمیل نمی‌شود، اما زمان‌بر بودن آن عاملی محدودکننده برای این استراتژی است. سرعت پاک‌سازی روش‌های بیولوژیکی را می‌توان از طریق معرفی گونه‌های سازگار و بومی منطقه تسریع کرد (Abolhasani Sooraki et al., 2020).

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

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

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



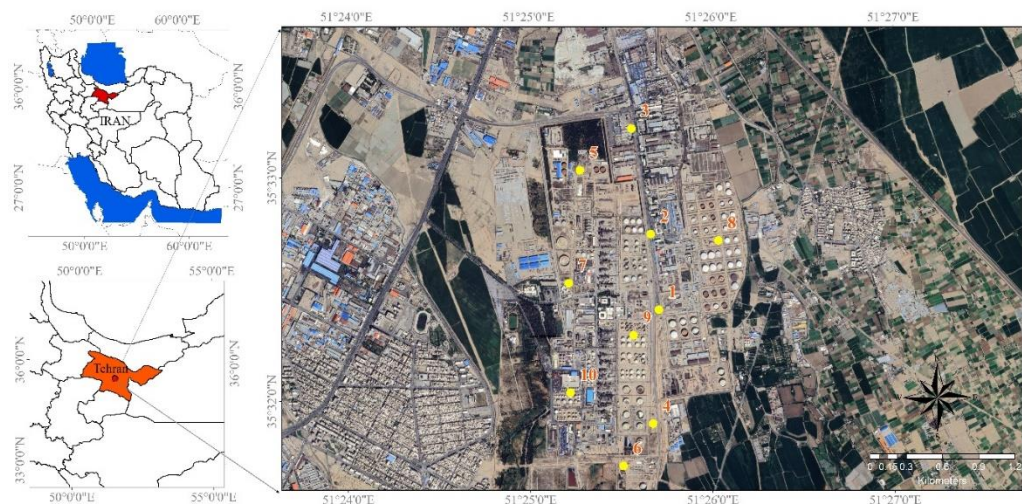


Fig. 1. Sampling points in Tehran refinery

شکل ۱- نقاط نمونه برداری 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.

#### ۲-۴- انجام آزمایش

در این بخش، pH محیط، نسبت آلاینده به زیست‌توده و زمان ماند به‌عنوان 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 آلاینده 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 آلاینده تعیین شد.

تزریق ۲۰ μ، طول موج دکتور ۲۲۰ mm) تعیین شد. با توجه به جدول ۱، سرب و فنانترن، بیشترین میزان را در خاک پالایشگاه تهران داشتند.

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

در این فرایند، ابتدا یک کنسرسیون میکروبی که در خاک‌های آلوده به این آلاینده‌ها (سرب و فنانترن) رشد کرده‌اند تهیه و در محیط آزمایشگاهی تغلیظ شد. مراحل انجام آزمایشات در این مرحله به‌صورت زیر بود:

#### ۲-۳- نمونه برداری، 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 نمونه برداری 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 فروشویی زیستی حذف سرب و فنانترو

**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 فروشویی زیستی حذف سرب و فنانترو 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  $10^6$  و  $10^7$  Logcfu/g و اختلاف معنی‌دار با  $10^3$  تا  $10^5$  Logcfu/g انتخاب شد.

#### ۳-۱- 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 P-value  $0.0250$  به ترتیب مهمترین

با توجه به تست‌های تشخیص بیوشیمیایی، در نمونه‌های خاک باکتری سودوموناس آئروژینوزا جداسازی و تشخیص داده شد. این باکتری هوازی اجباری بوده و روی آگار خوندار و آگار آبی ائوزین متیل تیونین جداسازی شد. کلنی‌های رشد یافته صاف و گرد با رنگ سفید بودند. شناسایی این باکتری بر پایه مورفولوژی گرم، بدون اسپور، تاژک‌دار، کاتالاز مثبت، متحرک، ناتوانی در تخمیر لاکتوز (یک واکنش اکسیداز مثبت)، بو (انگور) و توانایی رشد در دمای  $42^\circ\text{C}$  درجه سلسیوس شناسایی شد. ویژگی فلئوئورسانس زیر نور فرابنفش نیز به منظور تشخیص فوری کلنی‌های سودوموناس آئروژینوزا استفاده شد. بر اساس



جدول ۴- تحلیل واریانس برای حذف فنانترن 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 | Phenathrene |         | 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.

### ۳-۲- فنانترن

در حذف فنانترن (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 فنانترن از خاک طی فرایند بیولوژیک بود. مدل بهبودیافته حذف فنانترن با استفاده از فرایند بیولوژیک از نوع رابطه درجه دوم بود که در معادله ۲ ارائه شده است. همچنین بر اساس این رابطه زمان × نسبت آلاینده به موجوده زنده دارای اثر تداخلی بودند

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

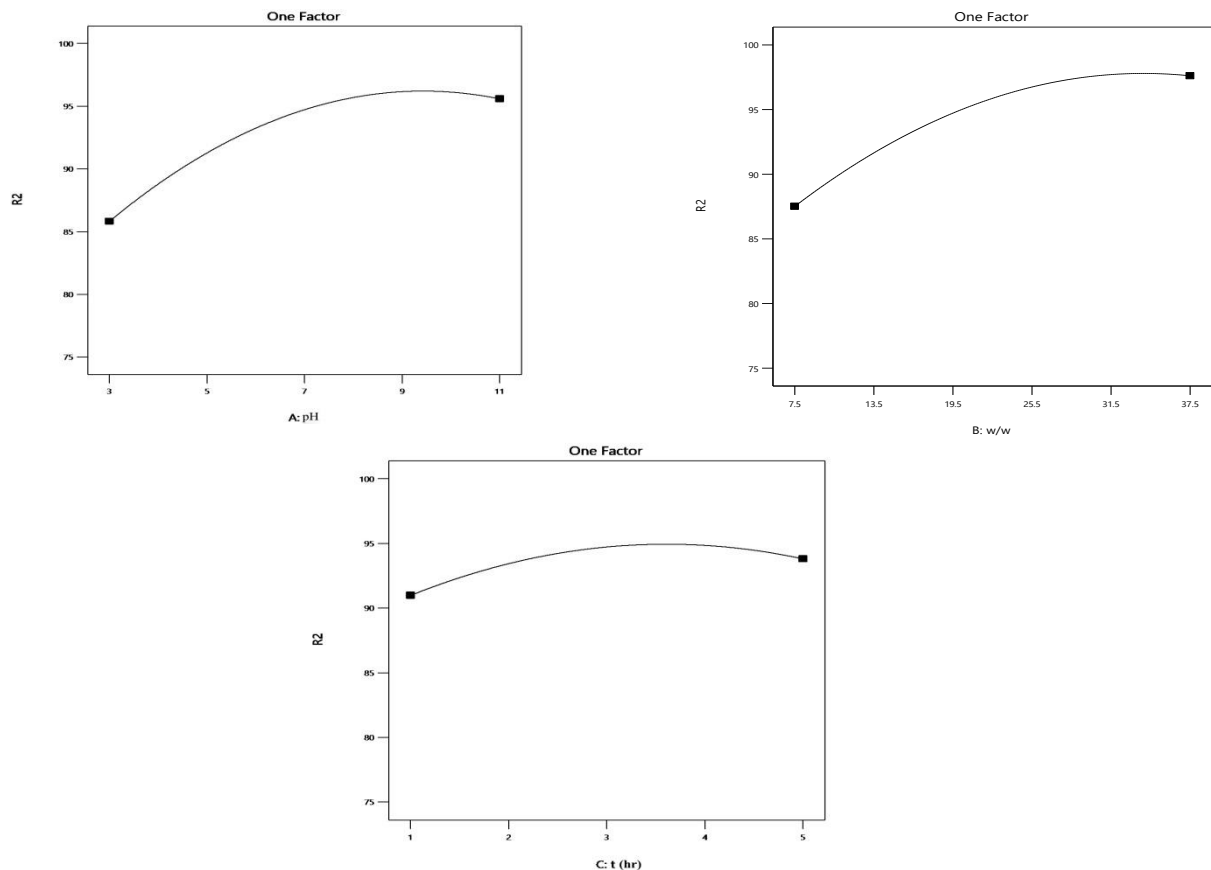
پارامترهای تأثیرگذار بر روی حذف سرب از خاک طی فرایند بیولوژیکی بودند. مدل بهبودیافته حذف سرب تحت تأثیر فرایند بیولوژیکی با توجه به معادله ۱، از نوع معادله درجه دوم بود

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

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 در ۳۷/۵ W/W و ۳ ساعت اندازه‌گیری شد. بیشترین درصد حذف سرب با میزان ۹۶/۷۹ درصد در شرایط pH برابر ۸، میزان نسبت آلاینده به موجود 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 تأثیر متغیرهای مستقل بر میزان درصد حذف سرب (A) pH، (B) نسبت آلاینده به موجوده زنده و (C) زمان

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

#### ۴- بحث

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

با توجه به شکل ۵-A، با افزایش میزان pH از ۳، درصد حذف افزایش و سپس کاهش پیدا کرد. با توجه به شکل ۵-B در خصوص نسبت آلاینده به موجوده زنده، روند افزایش میزان درصد حذف با افزایش این شاخص با شیبی ملایم قابل مشاهده بود. در شکل ۵-C روند حذف فنانترن تا محدوده ۳ ساعت روندی افزایشی داشت و سپس کاهشی شد. به این ترتیب بهترین شرایط برای بیشترین درصد حذف فنانترن (۹۷/۴ درصد) در pH برابر ۷، نسبت آلاینده به موجوده زنده برابر با ۲۲/۵ W/W و زمان ۱ ساعت به‌دست آمد (شکل ۶ و ۷). در نمونه شاهد، بیشترین درصد حذف فنانترن 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 ۰/۸۳۱۱ و

<sup>1</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 آگزوپلی ساکاریدها دارد تحت تأثیر قرار می‌دهد. در حقیقت بار گروه‌های عامل موجود در آگزوپلی ساکاریدها، به واسطه عمل پروتون‌گیری و پروتون‌زدایی تغییر یافته و به این دلیل، جذب و دفع گونه‌های فلزی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Silva et al., 2008).

در مورد درصد حذف فناترن 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 فناترن و pH برابر ۸ در مورد سرب بهترین محدوده را داشتند که این موضوع می‌تواند به توانایی زیست باکتری در محدوده pH خنثی مربوط باشد (Wirasmita and Hadibarata, 2016).

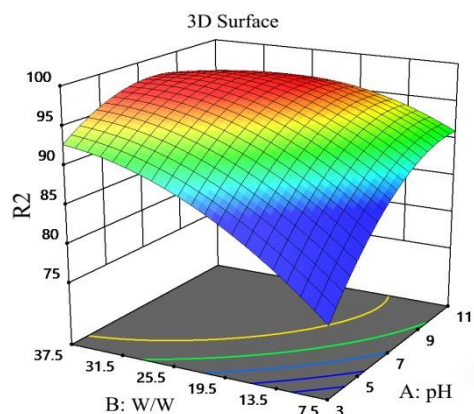
در pHهای بالا، بار منفی خالص بر روی اجزای دیواره سلولی جاذب حضور دارد. در نتیجه این بار منفی، کاتیون‌های فلزی به راحتی جذب نقاط اتصال روی جاذب می‌شوند (Vijayaraghavan and Yun, 2008).

پاوار 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).

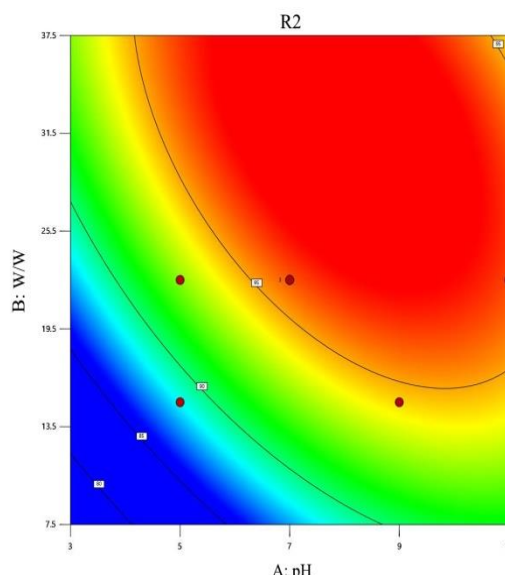
در pHهای بیش از ۵/۵ به علت افزایش غلظت یون‌های OH در محلول، سرب به صورت  $Pb(OH)_2$  رسوب می‌کند (Norton and D'Amore, 1994).

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 عمدتاً به ساختارهای مشبک پایدار متصل و بدون واکنش هستند (Chen et al., 2015) که این موضوع در مورد سرب قابل مشاهده است، اما در مورد فناترن به نظر می‌رسد مقدار pH بالا، باعث ته‌نشینی کمپلکس‌های فلزی و خارج شدن آنها از دسترس شده است (Volesky, 1990).



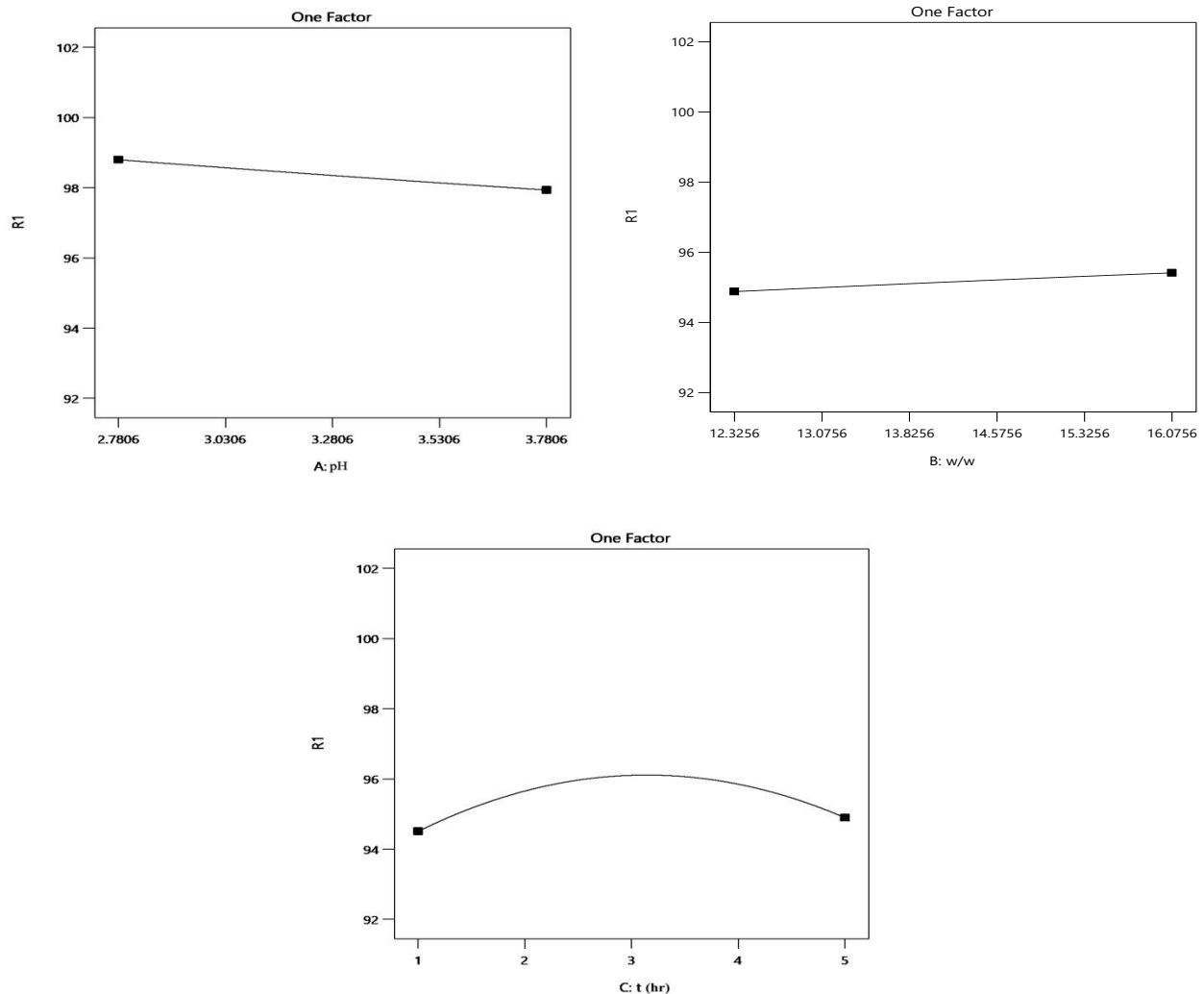
**Fig. 3.** Interaction effect of pH, time and pollutant-to-living ratio on lead removal using biological process  
شکل ۳- اثر متقابل pH، زمان و نسبت آلاینده به موجود زنده بر حذف سرب با استفاده از فرایند بیولوژیک



**Fig. 4.** 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 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 الکتروفنتون، 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 فناترن 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 فناترن (A) pH، (B) نسبت آلاینده به موجود زنده و (C) زمان

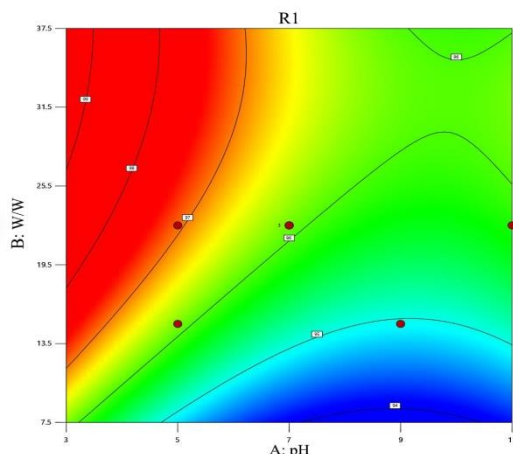
و فناترن، به نظر می‌رسد، باکتری توانایی خود را از دست می‌دهد که نشان‌دهنده تاثیر مستقیم غلظت بر ساختار و متابولیسم باکتری است.

راجا و همکاران در سال ۲۰۰۶، با قرار دادن باکتری *P.aerugionsa* در معرض غلظت‌های مختلف فلزات سرب و بررسی 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 یون‌های موجود در محلول در اثر افزایش حلالیت فازهای جامد خاک با گذشت زمان باشد (Wang et al., 2019).

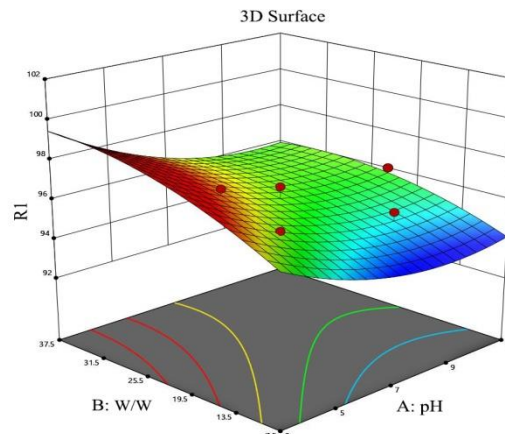
همچنین با توجه به نمودار درصد حذف سرب و فناترن، با افزایش نسبت آلاینده به موجود زنده درصد حذف افزایش پیدا کرد که این موضوع ناشی از احاطه سایت‌های فعال باکتری به وسیله یون‌های فلزی و یا هیدروکربنی است که جذب را افزایش می‌دهند. البته با افزایش بیشتر این نسبت به ۳۰ و ۲۲/۵ برای سرب





**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 هم‌تراز اثر عوامل pH، زمان و نسبت آلاینده به موجوده زنده، جریان و زمان بر روی درصد حذف سرب



**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 آلاینده به موجوده زنده بر حذف فنانترن با استفاده از فرایند بیولوژیک

جنوب تهران به سرب و فنانترن با استفاده از روش بیولوژیکی و باکتری‌های بومی خاک موردنظر و بازگرداندن خاک به وضعیت زنده بود.

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

وجود مرحله تأخیر در آغاز رشد باکتری در غلظت‌های 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 می‌کند.

## ۵- نتیجه‌گیری

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. [Link]
- 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. [Link]
- 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) [Link]



© The Author(s)

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