

ORIGINAL ARTICLE

Bioremediation of Soils Contaminated with Diesel Using Bio-stimulation Method in the Bioreactors of Vermicompost and Activated Sludge

Mahtab Momeni¹,
Mahdi Farzadkia^{2,3},
Ali Esrafilizadeh^{2,4},
Majid Kermani^{2,4}

¹ MSc Student in Environmental Health Engineering, School of Health, International Campus of Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Research Center for Environmental Health Technology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Professor, Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received May 6, 2017 Accepted December 11, 2017)

Abstract

Background and purpose: There are several methods for removing oil contaminations from the polluted environments. Bioremediation could be considered as one of the best and most practical methods in the removal of oil contaminations. The aim of this research was to determine the bioremediation efficiency for soils contaminated with diesel by the biological stimulation of bioreactors containing vermicompost and activated sludge.

Materials and methods: In an experimental study, the soil samples were collected from an area which was free of any oil pollution and 5 reactors containing one kilogram of soil were contaminated with diesel at the mass concentration of 1%. Two reactors were mixed with vermicompost at 15% and 20% mass concentrations and two reactors were mixed with activated sludge at 5% and 10% mass concentrations. Additionally, one control reactor was used to control the process. The pH of the reactors was between 7.5 and 8 and the C:N:P ratio was 100:5:1. The amount of TPH was measured at seven retention times within three months with two repetitions. The total removal of petroleum hydrocarbons (TPHs) was evaluated by GC-FID device.

Results: The highest removal efficiency of TPH (40.24%) was observed in bioreactors containing vermicompost at a 20% mass concentration. In this reactor, the highest percentage of removal was observed in lighter hydrocarbons (50.49%). In reactors containing activated sludge, the average percentage of TPH removal was 32% which was observed in the reactor containing the 10% concentration of sludge. In this reactor, the highest percentage of removal (44.86%) was also observed in lighter hydrocarbons.

Conclusion: Vermicompost and activated sludge can be used in the bioremediation of soils contaminated with diesel. In current study, the performance of vermicompost was found to be more efficient. Also, the results showed that by increasing the concentration of biological modifiers, the removal rate would increase.

Keywords: Bio-remediation, contaminated soil, petroleum hydrocarbons, vermicompost, sewage sludge

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 27 (158): 179 - 192 (Persian).

زیست پالایی خاک های آلوده به گازوئیل به روش تحریک زیستی در بیوراکتور های ورمی کمپوست و لجن فعال

مهتاب مومنی^۱
مهدی فرزاد کیا^{۳و۲}
علی اسرافیلی^{۴و۲}
مجید کرمانی^{۴و۲}

چکیده

سابقه و هدف: روش های زیادی برای بر طرف کردن آلودگی های نفتی از محیط های آلوده وجود دارد. زیست پالایی را می توان به عنوان یکی از بهترین و عملی ترین روش های رفع آلودگی های نفتی بیان کرد. این مطالعه با هدف تعیین کارایی زیست پالایی خاک های آلوده به گازوئیل به روش تحریک پذیری زیستی در بیوراکتور های حاوی ورمی کمپوست و لجن فعال، انجام گرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه ی تجربی، نمونه خاک مورد آزمایش، از منطقه ای عاری از هر گونه آلودگی نفتی جمع آوری گردید، و ۵ راکتور حاوی یک کیلو گرم خاک، با گازوئیل در غلظت ۱ درصد وزنی آلوده شد. ۲ راکتور با ورمی کمپوست، در دو غلظت ۱۵ و ۲۰ درصد وزنی و ۲ راکتور با لجن فعال، در دو غلظت ۵ و ۱۰ درصد وزنی مخلوط گردید و یک راکتور شاهد جهت کنترل فرایند تهیه شد. pH راکتور های راه اندازی شده در محدوده ۷/۵ تا ۸ و میزان C:N:P برابر با ۱:۵:۱۰ تنظیم گردید. میزان TPH طی ۳ ماه با ۲ مرتبه تکرار در هفت زمان ماند اندازه گیری شد و ارزیابی میزان حذف هیدروکربن های نفتی کل (TPHs)، توسط دستگاه GC-FID صورت گرفت.

یافته ها: بیشترین راندمان حذف TPH، در بیوراکتور حاوی ورمی کمپوست با غلظت ۲۰ درصد وزنی، با میانگین ۴۰/۶۳ درصد مشاهده شد. در این راکتور بالاترین درصد حذف به هیدروکربن های سبک تر با میزان ۵۰/۴۹ درصد اختصاص داشته است و در راکتور های حاوی لجن فعال میانگین درصد حذف TPH، ۳۲ درصد به راکتور حاوی لجن با غلظت ۱۰ درصد وزنی اختصاص داشت. در این راکتور نیز بیش ترین درصد حذف به هیدروکربن های سبک تر با میزان ۴۴/۸۶ درصد مربوط بوده است.

استنتاج: با توجه به نتایج این مطالعه جهت زیست پالایی خاک های آلوده به گازوئیل می توان از ورمی کمپوست و لجن فعال استفاده نمود. در این مطالعه عملکرد ورمی کمپوست از جایگاه مناسب تری برخوردار است و با افزایش میزان غلظت اصلاح کننده های زیستی میزان حذف افزایش خواهد داشت.

واژه های کلیدی: زیست-پالایی، خاک آلوده، هیدروکربن های نفتی، ورمی کمپوست، لجن فاضلاب

مقدمه

می شوند. به دلیل نفت خیز بودن کشور ایران، مواد نفتی به رغم تدابیر شدید کنترل آلودگی، در حین حفاری و استخراج در سایت های نفتی و یا به هنگام نقل و

به دلیل توسعه صنعت پتروشیمی و عدم رعایت الزامات زیست محیطی در دهه های اخیر، مقادیر بسیار زیادی از آلاینده های هیدروکربنی وارد محیط زیست

Email: mahdifarzadkia@gmail.com

مؤلف مسئول: مهدی فرزاد کیا - تهران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده بهداشت

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی بهداشت محیط، پردیس بین المللی دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۲. مرکز تحقیقات تکنولوژی بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۳. استاد، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۴. دانشیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۱۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۶/۴/۹ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۹/۲۰

بسیار مقرون به صرفه می‌باشد و برخی از میکروارگانیسم‌ها دارای توانایی‌های بالقوه‌ای در حذف ترکیبات نفتی می‌باشند. ترکیبات نفتی به عنوان منبع انرژی و مواد اولیه برای تکثیر و رشد این دسته میکروارگانیسم‌ها، با تجزیه ترکیبات نفتی آن‌ها را به H_2O و CO_2 تبدیل می‌نمایند و آلودگی خاک را تا حد زیادی تعدیل می‌کنند (۱۷، ۱۶). طیف وسیعی از این دسته از میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده آلاینده‌های هیدروکربنی عموماً در خاک‌های آلوده موجود است و در صورت نیاز به افزودن میکروارگانیسم، هزینه تهیه عموماً پایین بوده و کم‌تر از ۲ درصد کل هزینه پروژه می‌باشد (۱۸). با توجه به این که پالایش زیستی فقط در محیط‌هایی می‌تواند موثر واقع شود که میکروارگانیسم‌ها بتوانند در آن‌جا رشد و فعالیت داشته باشند، بهتر است پارامترهای محیطی بهینه سازی شود تا میکروارگانیسم‌ها بتوانند رشد و تجزیه سریع‌تری داشته باشند (۲۱، ۱۹). می‌توان از روش‌های زیستی به علت حداقل تولید محصولات جانبی خطرناک، به عنوان یکی از روش‌های دوست دار محیط زیست نام برد. برای افزایش کارایی فرایند زیست-پالایی، روش‌های مختلفی وجود دارد که یکی از این روش‌ها افزودن اصلاح کننده‌های زیستی ارزان قیمت مانند کمپوست، لجن فاضلاب و ... می‌باشد (۲۴، ۲۲). کمپوست به عنوان محرک زیستی، به علت غنی بودن از انواع ارگانیسم‌ها، منبع تغذیه‌ای مناسبی برای افزایش سرعت و کارایی زیست-پالایی ترکیبات مختلفی هم چون PAHs و TPHs محسوب می‌گردد (۲۵، ۱۴، ۱۲). اصلاح کننده‌های زیستی ارزان قیمت نیز محدودیت‌های خاص مربوط به خود را دارند. بسیاری از ترکیبات آلی شامل آفت کش‌های مختلف و PAHs وارد خاک شده و ممکن است در خاک باند و محدود شوند. بنابراین، پیدا کردن یک روش مناسب برای بررسی فراهمی زیستی انواع آلاینده‌ها در خاک قبل از انتخاب یک تکنولوژی اصلاح برای کنترل آلودگی خاک مهم است. با این که

انتقالات زمینی مواد نفتی و فراورده‌های اعم از خشکی و یا دریایی، به محیط اطراف نشت می‌کند. در مطالعات اخیر بیان شده است که، فعالیت‌های صنعتی انسان تنها عامل آلودگی محیط زیست با ترکیبات سمی و خطرناک، به وسیله این دسته از آلاینده‌ها می‌باشد (۳، ۱).

از مهم‌ترین این آلاینده‌ها هیدروکربنی، هیدروکربن‌های حلقه (PAHs)، و یا هیدروکربن‌های نفتی کل (TPHs) با وزن مولکولی بالا می‌باشد. این گروه از آلاینده‌ها شامل ترکیباتی هستند که تجزیه زیستی آن‌ها به دلیل نفوذپذیری و جذب بسیار قوی در خاک، اغلب با موفقیت همراه نیستند (۴، ۵).

یکی از فراورده‌های نفتی مهم که می‌تواند موجب آلودگی آب و خاک گردد نفت دیزل یا همان گازوئیل است. گازوئیل، مخلوطی پیچیده از آلکان‌ها و ترکیبات آروماتیک سنگین می‌باشد که تجزیه مقادیر ناچیز از آن در خاک سالیان سال زمان خواهد برد (۶). تجمع این ترکیبات شیمیایی در محیط زیست، تهدیدی اساسی برای سلامت انسان، سایر موجودات و اکوسیستم‌های زنده است (۷). رفع آلودگی‌های نفتی مذکور، به طور کلی با روش‌های مختلف از جمله فرایندهای فیزیکی و شیمیایی تا حدود زیادی قابل انجام است (۸، ۹). اما متأسفانه، این فرایندها بسیار پر هزینه و پیچیده بوده، به گونه‌ای که در بیش‌تر موارد جهت برآورده کردن قوانین و استانداردهای کنونی و آینده مناسب نمی‌باشند (۱۰، ۱۱، ۶). بر خلاف روش‌های شیمیایی حذف آلاینده‌ها، استفاده از میکروارگانیسم‌ها و گیاهان (روش زیستی) یک راهکار کم هزینه، ساده و پاک، برای حذف و یا کاهش آلودگی‌های نفتی و مقاوم می‌باشد (۱۴-۱۲). زیست پالایی برای چندین دهه در زمینه مهندسی فاضلاب استفاده شده است ولی کاربرد آن در مورد خاک‌ها و آب‌های زیرزمینی نسبتاً جدید بوده و هنوز در دوران پیشرفت خود می‌باشد (۱۵). از نظر اقتصادی زیست پالایی در مقایسه با سایر تکنولوژی‌ها

لجن فعال فاضلاب در زیست پالایی خاک های آلوده به گازوئیل انجام گرفت.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی، نمونه خاک از منطقه ای عاری از هرگونه آلودگی نفتی تهیه، و با گازوئیل، با غلظت ۱۰۰۰۰ میلی گرم در کیلوگرم آلوده گردید. جهت بررسی امکان زیست پالایی خاک، از ۲ سطح ورمی کمپوست ۱۵ و ۲۰ درصد وزنی و ۲ سطح لجن فعال فاضلاب ۵ و ۱۰ درصد وزنی به عنوان اصلاح کننده زیستی استفاده شد (۳۲، ۳۳). در این مطالعه ورمی کمپوست مورد استفاده از دانشکده کشاورزی کرج تهیه گردید و لجن فعال از تصفیه خانه فاضلاب دانشگاه علوم پزشکی ایران که عملکرد آن به صورت سیستم لجن فعال با هوادهی گسترده می باشد تهیه شد و از لجن فعال برگشتی از حوض ته نشینی ثانویه در این مطالعه استفاده گردید. در جدول شماره ۱ مشخصات بیولوژیکی ورمی کمپوست و لجن فعال نشان داده شده است. خاک های آلوده به گازوئیل در ظروف پلی اتیلنی مکعب مستطیل آماده شد. ۲ راکتور با ورمی کمپوست در دو غلظت ۱۵ درصد و ۲۰ درصد وزنی و ۲ راکتور با لجن فعال در دو غلظت ۵ درصد و ۱۰ درصد وزنی مخلوط گردید و یک راکتور شاهد جهت کنترل فرایند تهیه شد. برای محاسبه حجم نمونه از روش یک متغیر در یک زمان (OFAT)^۱ و جهت بررسی اختلاف میانگین ها در راکتورهای مختلف از نرم افزار Excel 2013 استفاده گردید.

جدول شماره ۱: مشخصات بیولوژیکی ورمی کمپوست و

لجن فعال مورد استفاده

مشخصات بیولوژیکی ورمی کمپوست		مشخصات بیولوژیکی لجن فعال	
مقدار	ویژگی	مقدار	ویژگی
۶/۶۸	pH	۷/۵۹	pH
۴۳/۵۲	نسبت کربن به ازت	۲۶/۳۶	نسبت کربن به ازت
۳۰/۵۸	درصد جامدات خشک	۲/۹۵	درصد جامدات خشک
۷۱/۱۱	درصد جامدات فرار	۷۹/۱۸	درصد جامدات فرار
۴۶	رطوبت (%)	۳۵	رطوبت (%)

اصلاح کننده های زیستی در فرایند زیست پالایی موثر می باشند، ممکن است با گذشت زمان، مواد آلی مینرالیزه شوند و با تغییر pH، منجر به بازگشت آلاینده به حالت قبل و ثبات و پایداری آن شود (۲۸، ۲۶).

تحریک زیستی زمانی بیش ترین تاثیر را دارد که سرعت تجزیه زیستی به طور طبیعی کم باشد. به همین دلیل میکروارگانیزم های موجود در محیط با بهبود شرایط محیطی نظیر افزودن مواد مغذی یا هوادهی تحریک شده تا مواد شیمیایی هدف را با سرعت فزاینده ای تجزیه کنند.

زیست پالایی خاک های آلوده به هیدروکربن های نفتی توسط محققان بسیاری در دنیا و ایران صورت گرفته است. نتایج مطالعه اصلاح خاک های آلوده به ترکیبی از هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای با استفاده از کود دامی و ورمی کمپوست نشان داد که پس از ۱۰۰ روز بنزوآپایرن، آنتراسن و فنانترون به ترتیب ۲۲ درصد، ۸/۵ درصد و کم تر از ۳ درصد کاهش یافته است (۲۹). نتیجه حاصل از مطالعه روی اصلاح زیستی خاک های آلوده به گازوئیل توسط فرایند کمپوست مواد غذایی کاهش ۷۷ درصدی زائدات غذایی ظرف مدت ۱۵ روز را نشان داد (۳۰). نتایج مطالعه دیگری که بر روی زیست پالایی خاک های آلوده به گازوئیل توسط کمپوست به همراه زائدات آلی انجام گرفت نشان داد که سرعت تجزیه هیدروکربن های دیزلی در مخلوط کمپوست و زائدات آلی ۴ برابر بیش تر از کمپوست در دمای اتاق است (۲۵). هم چنین محققان در مطالعه روی میزان حذف TPH موجود در کنده حفاری واقع در میدان نفتی اهواز با استفاده از کمپوست و ورمی کمپوست، ورمی کمپوست را اصلاح کننده بهتری معرفی کردند (۳۱).

با توجه به بررسی ها و مطالعاتی که صورت گرفت و مطالعات محدود و پراکنده بر روی اثر زیست پالایی خاک های آلوده در ایران به ویژه اثر زیست پالایی توسط ورمی کمپوست و لجن فعال، این مطالعه بنیادی-کاربردی با هدف بررسی کارایی ورمی کمپوست و

¹ one factor at the time

شد و در ظرف‌های مکعب مستطیلی به ابعاد 21×5×14/5×9/5 اسپری گردید (۱۵).

اسپری کردن مخلوط گازوئیل و استون به نمونه خاک باعث افزایش حجم نمونه تا ۲ سانتی متر می‌شود که مربوط به هوادهی مناسب نمونه خاک همراه با اسپری کردن بوده است که این خود باعث تسریع فرایند پالایش می‌گردد. با این حال، به جهت اختلاط کامل خاک با گازوئیل، محتوای راکتورها به خوبی هم زده شد تا یک مخلوط کاملاً یکنواخت حاصل شود. این عمل به مدت ۷ روز تا زمان تبخیر کامل استون از خاک ادامه یافت. به منظور بررسی جداگانه تاثیر هر یک از اصلاح کننده‌های زیستی در تجزیه زیستی آلاینده، انواع مختلف راکتورها طبق جدول شماره ۲ آماده گردید.

این مطالعه در مدت ۹۰ روز و در شرایط نزدیک به آب و هوای طبیعی انجام گرفت و با توجه به طراحی‌های انجام گرفته، تاثیر اصلاح کننده‌های زیستی مختلف بر روند حذف گازوئیل در خاک مورد بررسی قرار گرفت (۳۳، ۳۴).

روش آماده سازی خاک

نمونه‌های خاک پس از دو بار سترون کردن در دستگاه اتوکلاو، با الک ۲ mm مش شماره ۱۰ غربال شد و مقدار مشخصی از گازوئیل توزین، و در استون حل گردید. پس از اختلاط کامل، مخلوط گازوئیل و استون به یک کیلوگرم از نمونه خاک استریل و غربال

جدول شماره ۲: پارامترها و سطوح در نظر گرفته شده برای هر راکتور در طراحی آزمایش‌ها

ردیف	پارامترها	راکتور شماره ۱ (شاهد)	راکتور شماره ۲	راکتور شماره ۳	راکتور شماره ۴	راکتور شماره ۵
۱	غلظت گاروئیل (گرم بر کیلوگرم خاک)	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
۲	لجن فعال (گرم بر کیلوگرم)	-	۵۰	۱۰۰	-	-
۳	ورمی کمپوست (گرم بر کیلوگرم)	-	-	-	۱۰۰	۲۰۰
۴	نسبت C/N/P	-	۱۰۰/۵/۱	۱۰۰/۵/۱	۱۰۰/۵/۱	۱۰۰/۵/۱
۵	رطوبت (%)	۵۵	۵۵	۵۵	۵۵	۵۵
۶	pH	-	۷/۸	۷/۸	۷/۸	۷/۸
۷	دما (درجه سلسیوس)	دمای محیط	دمای محیط	دمای محیط	دمای محیط	دمای محیط



۱

۲

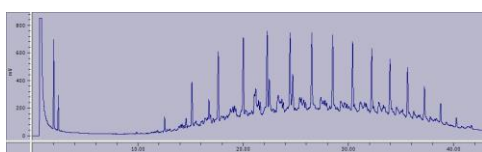
۳

شکل شماره ۱: راکتورهای راه اندازی شده جهت زیست پالایی، ۱: شاهد، ۲: لجن فعال، ۳: ورمی کمپوست.

تنظیم شرایط بیوراکتورها

پس از انجام مراحل آماده سازی، به هر بیوراکتور مقدار یک کیلوگرم خاک آلوده شده با گازوئیل، ورمی کمپوست و لجن فعال با غلظت‌های از پیش تعیین شده اضافه گردید (شکل شماره ۱). از راکتورهای راه‌اندازی شده جهت انجام تست TS برای تنظیم رطوبت، نمونه برداری انجام شد و پس از مشخص شدن رطوبت اولیه نمونه‌ها، به راکتورها مقدار مشخصی آب مقطر جهت تنظیم رطوبت ۵۵ درصد افزوده شد و این عمل هر ۲ روز یک بار به جهت ثابت نگه داشتن درصد رطوبت تکرار گردید (۱۴، ۱۵). نمونه‌های خاک هر روز تحت عمل اختلاط و زیر و رو شدن قرار گرفتند و pH راکتورهای اندازی شده در محدوده ۷/۵ تا ۸ و میزان C:N:P برابر با ۱:۵:۱۰۰ تنظیم گردید (۳۵).

شد. دماهای دتکتور و انژکتور به ترتیب روی ۲۷۰ و ۲۵۰ درجه سلسیوس تنظیم گردید. دمای ستون به مدت ۱ دقیقه روی ۵۰ درجه سلسیوس نگه داشته شد و به میزان ۵ درجه سلسیوس بر دقیقه افزایش داده شد تا به ۲۸۰ درجه سلسیوس برسد. میزان توقف دما در ۲۸۰ درجه ی سلسیوس نیز ۳ دقیقه تنظیم گردید. نمونه‌ای از کروماتوگرام در شکل شماره ۲ آمده است.



شکل شماره ۲: کروماتوگرام TPHs با دستگاه GC-FID

یافته‌ها

درصد حذف TPH در حالت‌های مختلف طراحی

آزمایش

در پی استخراج گازوئیل باقی‌مانده از نمونه‌های خاک حاوی ۴ راکتور مخلوط شده با لجن فعال و ورمی کمپوست، به همراه یک راکتور شاهد پس از ۹۰ روز زیست پالایی، و تزریق آن به دستگاه GC-FID، پیک مربوط به هر کدام از آلکان‌های نرمال با پیک استاندارد داخلی مربوط به زایلن به جهت کاهش خطاهای احتمالی، به دست آمد. در آنالیز آلاینده توسط دستگاه GC، گازوئیل به ۱۵ پیک تقسیم گردید که زمان اولین پیک ۱۵ دقیقه و آخرین پیک ۴۱ دقیقه اختصاص داشته است. جهت سهولت مقایسه میزان حذف در گازوئیل پیک‌های استخراج شده را به ۳ گروه سبک، متوسط و سنگین تقسیم‌بندی گردید و به دلیل بسیار نزدیک بودن پیک‌های هر گروه، از هر گروه یک نماینده به عنوان مرجع انتخاب شد (۳۶، ۳۷). درصد حذف TPH در ۵ حالت مختلف بررسی گردید و نتایج به دست آمده در جدول شماره ۲ گردآوری شد.

میانگین درصد حذف TPH در ۵ حالت مختلف طراحی نشان داده است کم‌ترین میزان حذف در راکتور

استخراج و اندازه‌گیری TPHs

مقدار TPH باقی‌مانده پس از استخراج به روش B US-EPA ۳۵۵۰، در روزهای صفر، ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۷۵ و ۹۰ با ۲ مرتبه تکرار توسط دستگاه GC-FID سنجش شد (۳۴). طبق این دستورالعمل جهت استخراج TPH مقدار ۲ گرم خاک با ۲ گرم سولفات سدیم بدون آب مخلوط کرده تا رطوبت خاک توسط سولفات سدیم گرفته شود. سپس به ترتیب مقدار ۵ میلی‌لیتر استون و ۵ میلی‌لیتران هگزان به آن اضافه گردید و نمونه‌ها به مدت ۲ دقیقه توسط پراب اولتراسونیک برای تسریع در استخراج هموژنایز گردید. هم‌چنین برای افزایش زمان تماس، نمونه به مدت یک ساعت روی شیکر، ۲۰۰ دور در دقیقه هم زده شد و با در حالت سکون قرار گرفتن نمونه‌ها خاک و ذرات معلق ته نشین شدند. مایع استخراج شده با استفاده از سرنگ و فیلتر تفلون ۰/۲۲ میکرونی صاف گردید و جهت آنالیز به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شد (۱۴). جهت سنجش میزان گازوئیل از دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC-FID, CP 9001) ساخت کشور هلند، استفاده

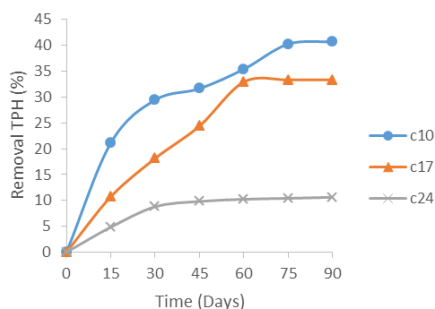
شاهد (blank) با میانگین ۱۰/۵۰ درصد، و بالاترین میزان حذف در راکتور شماره ۵ با میانگین ۴۰/۶۳ درصد

حاصل گردیده است (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۳: میانگین درصد حذف TPH در حالت های مختلف طرح آزمایشی

ردیف	پارامترها	غلظت گازوئیل (g/Kg)	لجن فعال (g/Kg)	ورمی کمپوست (g/Kg)	نسبت C/N/P	رطوبت (%)	pH	میزان حذف (%)
۱	راکتور شماره ۱	۱۰	-	-	-	۵۵	-	۱۰/۵۰
۲	راکتور شماره ۲	۱۰	۵۰	-	۱۰۰/۵/۱	۵۵	۷/۸	۲۸/۲۵
۳	راکتور شماره ۳	۱۰	۱۰۰	-	۱۰۰/۵/۱	۵۵	۷/۸	۳۱/۹۱
۴	راکتور شماره ۴	۱۰	-	۱۰۰	۱۰۰/۵/۱	۵۵	۷/۸	۳۸/۸۲
۵	راکتور شماره ۵	۱۰	-	۲۰۰	۱۰۰/۵/۱	۵۵	۷/۸	۴۰/۶۳

میزان حذف کل هیدروکربن های نفتی با توجه به نتایج به دست آمده در راکتور حاوی ۵۰ گرم بر کیلو گرم لجن فعال، به طور میانگین ۲۸/۲۵ درصد با انحراف از معیار ۱۵/۶۹ بوده است (نمودار شماره ۲).



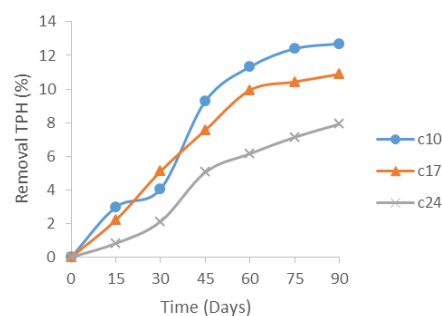
نمودار شماره ۲: میزان حذف کل هیدروکربن های نفتی (TPHs)، در راکتور حاوی ۵ درصد وزنی لجن فعال، مقایسه بین سبک ترین هیدروکربن (C10)، هیدروکربن حد وسط (C17) و سنگین ترین هیدروکربن (C24).

میزان حذف هیدروکربن های کل نفتی (TPHs) در راکتور حاوی ۱۰ درصد وزنی لجن فعال، به طور میانگین ۳۱/۹۱ درصد با انحراف از معیار ۱۴/۹۸ بوده است (نمودار شماره ۳).

تغییرات حذف کل هیدروکربن های نفتی (TPHs)

در راکتور شاهد

بیوراکتور شاهد که با غلظت ۱۰۰۰۰ میلی گرم در کیلو گرم آلاینده، جهت مشاهده تاثیر تبخیر و هوادهی بر حذف کل هیدروکربن های نفتی راه اندازی گردید، در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است. در این راکتور میانگین راندمان حذف ۱۰/۵۰ با انحراف از معیار ۲/۴۱ به دست آمد.



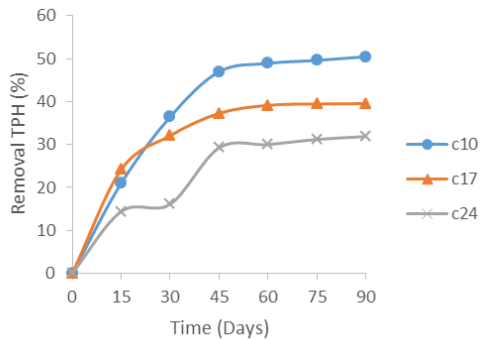
نمودار شماره ۱: میزان حذف کل هیدروکربن های نفتی

(TPHs)، در راکتور شاهد، مقایسه بین سبک ترین هیدروکربن (C10)، هیدروکربن حد وسط (C17) و سنگین ترین هیدروکربن (C24).

درصد حذف TPHs از خاک آلوده به گازوئیل در

راکتور حاوی لجن فعال

حالت میزان حذف TPHs برابر با ۴۰/۶۳ درصد با انحراف از معیار ۹/۳۴ می باشد.

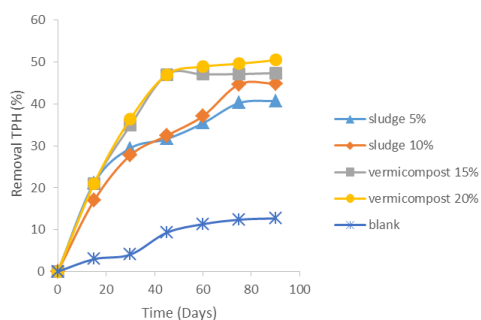


نمودار شماره ۵: میزان حذف کل هیدروکربن های نفتی

(TPHs)، در راکتور حاوی ۲۰ درصد وزنی ورمی کمپوست، مقایسه بین سبک ترین هیدروکربن (C10)، هیدروکربن حد وسط (C17) و سنگین ترین هیدروکربن (C24).

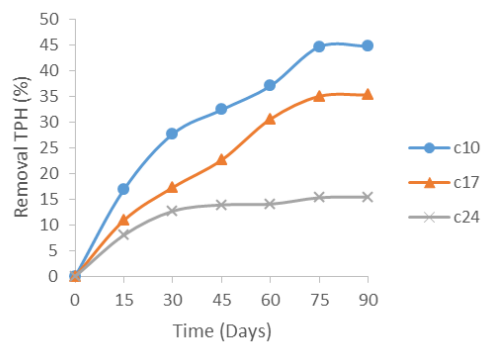
بررسی حذف سبک ترین و سنگین ترین هیدروکربن در ۵ راکتور

به منظور جمع بندی بهتر یافته ها، میزان حذف کل هیدروکربن های نفتی (TPHs)، در گروه سبک (C10)، در پنج راکتور راه اندازی شده، بررسی گردید (جدول شماره ۲). بیش ترین درصد حذف به هیدروکربن C10 (در راکتور شماره ۵) به میزان ۵۰/۴۸ درصد اختصاص داشته است (نمودار شماره ۶).



نمودار شماره ۶: مقایسه میزان حذف کل هیدروکربن های

نفتی (TPHs)، در گروه سبک (C10)، در راکتور های شاهد (راکتور شماره ۱)، حاوی لجن فعال ۵ و ۱۰ درصد وزنی (راکتور شماره های ۲ و ۳) و حاوی ورمی کمپوست ۱۵ و ۲۰ درصد وزنی (راکتور شماره های ۴ و ۵).

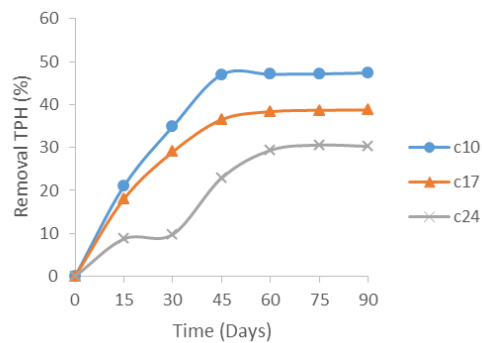


نمودار شماره ۳: میزان حذف کل هیدروکربن های نفتی

(TPHs)، در راکتور حاوی ۱۰ درصد وزنی لجن فعال، مقایسه بین سبک ترین هیدروکربن (C10)، هیدروکربن حد وسط (C17) و سنگین ترین هیدروکربن (C24).

کاربرد ورمی کمپوست در حذف کل هیدروکربن های نفتی (TPHs) از خاک آلوده به گازوئیل

میزان حذف کل هیدروکربن های نفتی با حضور ورمی کمپوست با میزان ۱۵ درصد وزنی به طور میانگین ۳۸/۸۲ درصد با انحراف از معیار ۸/۵۵ می باشد (نمودار شماره ۴).



نمودار شماره ۴: میزان حذف کل هیدروکربن های نفتی

(TPHs)، در راکتور حاوی ورمی کمپوست ۱۵ درصد وزنی، مقایسه بین سبک ترین هیدروکربن (C10)، هیدروکربن حد وسط (C17) و سنگین ترین هیدروکربن (C24).

نمودار شماره ۵: میزان حذف TPHs به وسیله ورمی کمپوست ۲۰ درصد وزنی را نشان می دهد. در این

گازوئیل توسط کنسرسیوم میکروبی طی ۵ هفته انجام گرفت، نرخ تجزیه بیولوژیکی گازوئیل توسط کنسرسیوم میکروبی ۲/۱۳ گرم گازوئیل به کیلوگرم خاک بوده است که این میزان با استفاده از تلقیح مواد مغذی به خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی به ۲/۷۸ گرم گازوئیل به کیلوگرم خاک افزایش یافت (۴۰).

تغییرات حذف کل هیدروکربن‌های نفتی (TPHs) در راکتور شاهد

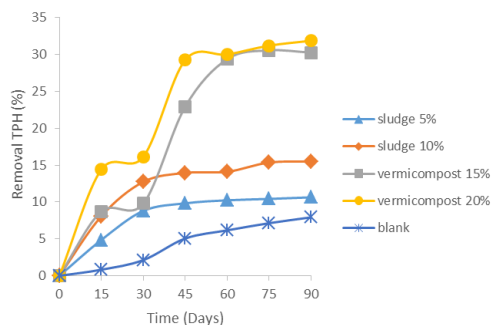
سه‌م تبخیر و هوادهی در حذف آلاینده پس از ۹۰ روز بین ۷ تا ۱۲ درصد با میانگین ۱۰/۵۰ درصد به دست آمده است. این یافته با نتایج مطالعه‌ی Hur و همکاران روی زیست پالایی خاک‌های آلوده با افزودن کمپوست، که میزان حذف را در راکتورهای کنترل ۱۰/۷ درصد، مطالعه‌ی جاوید پور و همکاران میزان حذف در راکتورهای شاهد را ۱۷ درصد و مطالعه‌ی بادکوبی و یوسفی کبریا میزان حذف هیدروکربن‌های نفتی در راکتور شاهد ۲۵ درصد گزارش کردند، مطابقت داشت (۳۳، ۳۶، ۴۱). تجزیه طبیعی می‌تواند در حذف گازوئیل تاثیر اندکی داشته باشد که نشان می‌دهد میکروارگانسیم‌های طبیعی خاک در صورت وجود شرایط مساعد توانایی تجزیه این دست آلاینده‌ها را دارند.

درصد حذف TPHs از خاک آلوده به گازوئیل در

راکتور حاوی لجن فعال

همان‌طور که در نمودار شماره ۲ قابل مشاهده است، با افزایش وزن مولکولی هیدروکربن‌های موجود درصد حذف این هیدروکربن‌ها نیز کاهش می‌یابد. به طوری که در راکتور حاوی خاک آلوده و لجن فعال ۵ درصد وزنی، میزان حذف برای هیدروکربن C₁₀ 75/40 درصد به دست آمده است، اما برای هیدروکربن C₂₄ مقدار درصد حذف برابر با ۱۰/۶۳

در نمودار شماره ۷ نیز میزان حذف کل هیدروکربن‌های نفتی (TPHs) در گروه سنگین (C₂₄) نشان داده شده است. در این گروه نیز راکتور شماره ۵ دارای بیش‌ترین درصد حذف به میزان ۳۱/۸۸ بوده است.



نمودار شماره ۷: مقایسه میزان حذف کل هیدروکربن‌های نفتی (TPHs) در گروه سنگین (C₂₄)، در راکتورهای شاهد (راکتور شماره ۱)، حاوی لجن فعال ۵ و ۱۰ درصد وزنی (راکتور شماره های ۲ و ۳) و حاوی ورمی کمپوست ۱۵ و ۲۰ درصد وزنی (راکتور شماره های ۴ و ۵).

بحث

حذف TPH در حالت‌های مختلف طراحی

آزمایش

تاکنون مطالعات متعددی در زمینه زیست پالایی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی در شرایط و زمان‌های ماند مختلف و با اصلاح‌کننده‌های متفاوتی در سراسر دنیا صورت گرفته است. در مطالعه‌ی Gogoi و همکاران بر روی زیست-پالایی خاک‌های آلوده به نفت در محل ریزش نفت، مشاهده شد که هوادهی، کاربرد کودهای دارای نیتروژن و فسفر، و تلقیح میکروبی، باعث تجزیه ۷۵ درصدی نفت می‌شود (۳۸). هم‌چنین، در مطالعه‌ی Margesin مشاهده شد که تحریک بیولوژیکی خاک‌های آلوده به نفت، با مواد غذایی معدنی مانند کود شیمیایی حاوی NPK باعث افزایش تجزیه زیستی و تجزیه هیدروکربن‌ها به میزان ۵۳-۲۷ درصد می‌شود (۳۹). در مطالعه‌ی Marquez و همکاران که در زمینه تجزیه زیستی خاک‌های آلوده به

درصد بوده است که بیان گر این نکته است که، مولکول های با اوزان مولکولی بالا نسبت به هیدروکربن های سبک تر در برابر تجزیه توسط میکروارگانیسم ها مقاومت بیش تری دارند. در نمودار شماره ۳ میزان حذف برای هیدروکربن سبک C₁₀ در راکتور حاوی خاک آلوده و لجن فعال ۱۰ درصد وزنی، برابر ۴۴/۸۶ درصد نشان داده شده است که ۲/۸۹ برابر بیش تر از میزان حذف هیدروکربن سنگین C₂₄ می باشد.

بنابراین، بیش ترین درصد حذف برای هیدروکربن های با وزن مولکولی پایین می باشد. در مطالعه های انجام شده توسط سایر محققین نیز عنوان شده است که ترکیبات نفتی با وزن مولکولی بالا نسبت به ترکیبات نفتی با وزن مولکولی پایین در برابر تجزیه، مقاوم تر می باشند (۳۵، ۴۲).

این یافته ها با نتایج مطالعه ی Taccari و همکاران روی زیست پالایی خاک های آلوده به سوخت دیزل که سرعت تجزیه هیدروکربن های با وزن مولکولی سبک تر (<C₁₂) را در مقایسه با هیدروکربن های با وزن مولکولی بالاتر (>C₁₂) بیش تر گزارش کردند، مطالعه ی شریفی حسینی و همکاران، روی اثر لجن فاضلاب با غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ گرم، در زیست پالایی خاک های آلوده به نفت، که بهترین راندمان تجزیه کل هیدروکربن های نفتی (TPH) را ۵۵ درصد مربوط به لجن فاضلاب با غلظت ۲۰۰ گرم، گزارش کردند و در مطالعه ی بادکوبی و یوسفی کبریا روی زیست سالم سازی خاک های آلوده به مواد نفتی با استفاده از لجن فاضلاب شهری، که بهترین راندمان حذف هیدروکربن های نفتی (TPH) ، برای اصلاح کننده لجن شهری ۶۰ درصد گزارش کردند، مطابقت داشت (۴۳، ۴۱، ۳۲).

کاربرد ورمی کمپوست در حذف کل هیدروکربن های نفتی (TPHs) از خاک آلوده به گازوئیل

میانگین حذف TPHs در نمونه های مخلوط شده با ورمی کمپوست بیش تر از نمونه های بدون ورمی کمپوست است. بهبود تجزیه ترکیبات نفتی در نمونه های مخلوط شده با ورمی کمپوست، به دلیل ورمی کمپوست گاوی به کار رفته که منبعی مناسب از کربن و انرژی برای رشد میکروارگانیسم ها فراهم می سازد، می باشد (۴۴). نتیجه کلی حاصل شده از نمودارهای شماره ۴ و ۵ بیان گر این است که دقیقاً مانند حالت قبل، با افزایش وزن مولکولی هیدروکربن ها مقدار حذف آلاینده ها کاهش می یابد.

همان طور که در نمودار شماره ۱ نشان داده شد، بالاترین میزان حذف در گروه سبک (C₁₀) و در بیوراکتور حاوی ورمی کمپوست با غلظت ۲۰ درصد وزنی با میزان ۵۰/۴۸ درصد رخ داده است.

برای جبران کاهش چشم گیر درصد حذف هیدروکربن های خیلی سنگین تر، الزاما باید مقدار ورمی کمپوست را افزایش داد. چرا که میانگین حذف در بیوراکتور حاوی ورمی کمپوست ۱۵ درصد وزنی برابر ۳۸/۸۲ درصد به دست آمده است. این در حالی است که میانگین میزان حذف مربوط به بیوراکتور حاوی ورمی کمپوست با غلظت ۲۰ درصد وزنی به میزان ۴۰/۶۳ درصد بوده است. این یافته با نتایج مطالعه ی جاویدپور و همکاران روی کارایی کمپوست در زیست پالایی خاک های آلوده به هیدروکربن های نفتی که میانگین حذف کل هیدروکربن های نفتی را حدوداً ۴۰ درصد گزارش گردید و در مطالعه ی Bento و همکاران، در مقایسه زیست پالایی خاک های آلوده به دیزل به دو روش تحریک زیستی و افزایش زیستی، بیش ترین درصد حذف در روش تحریک زیستی را به میزان ۴۵/۸ درصد گزارش کردند، مطابقت داشته است (۳۳، ۲۴).

بررسی تاثیر زمان در حذف کل هیدروکربن‌های

نفتی

همان‌طور که در نمودارهای شماره ۶ و ۷ مشاهده شد، با گذشت زمان روند تجزیه هیدروکربن‌ها تا هفته چهارم با شیب تندی افزایش می‌یابد، و در هفته چهارم تقریباً ثابت شده و بعد از آن روند رو به رشد تجزیه با شیب بسیار کمتری ادامه می‌یابد، به طوری که عمده حذف در ۶۰ روز اول رخ داده و پس از آن، فرایند حذف روند ثابتی پیدا کرده است. هنگام فرایند زیست-پالایی آلاینده‌های نفتی، به علت کاهش حجم و وزن مواد در بستر، باکتری با فقر مواد مغذی مواجه می‌شود و اثرات حذفی تجزیه‌گرهای زیستی به مرور زمان کاهش یافته و از طرفی با ایجاد پیوند بین ذرات ریز خاک با گازوئیل عملاً دسترسی باکتری‌ها به آلاینده کاهش می‌یابد (۳۵). این حالت برای اکثر نمونه‌ها تقریباً صدق می‌کند. این یافته با نتیجه مطالعه Sutton و همکاران روی تاثیر کربن آلی و مواد مغذی در زیست-

پالایی خاک‌های آلوده به سوخت دیزل، طی ۱۸۷ روز انکوباسیون، که عمده حذف را در ۵۰ روز نخست گزارش گردید، مطابقت داشته است (۴۵).

در نهایت نتایج این مطالعه نشان داد که بیش‌ترین درصد حذف هیدروکربن‌های نفتی به راکتور حاوی ورمی کمپوست با نسبت ۲۰ درصد وزنی و به هیدروکربن‌های سبک تعلق دارد. هم‌چنین کم‌ترین میزان حذف مربوط هیدروکربن‌های سنگین و مربوط به راکتور شاهد بوده است.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران به دلیل حمایت مالی این تحقیق با کد طرح ۲۷۴۸۰-۲۷-۰۵-۹۴، مراتب تشکر و قدردانی را دارند.

References

1. Elmendorf DL, Haith CE, Douglas GS, Prince RC. Relative rates of biodegradation of substituted polycyclic aromatic hydrocarbons. Bioremediation of Chlorinated and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Compounds. Boca Raton: Lewis; 1994.
2. Poormollae N, Bazrafshan E, Nasrabadi M. Assessment of Waste Production and Heavy Metal Emission from Energy Production Sector of Zahedan City. 2013; Iran J Health Sci 2013, 1(3): 51-57. (Persian)
3. Ravanipour M, Rezaei Kalantary R, Farzadkia M, Hashemi-Najafabadi S, Esrafilly A. Comparison of Nutrients and Salinity on Phenanthrene Removal from Polluted Soil. Iranian J Health Environ. 2013;5(4):411-422. (Persian)
4. Wilson SC, Jones KC. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. Environ pollut. 1993;81(3):229-249.
5. Farzadkia M, Dehghani M, Moafian M. The effects of Fenton process on the removal of petroleum hydrocarbons from oily sludge in Shiraz oil refinery, Iran. J Environ Health Sci Eng. 2014;12(1):31.
6. Gallego JL, Loredó J, Llamas JF, Vázquez F, Sánchez J. Bioremediation of diesel-contaminated soils: evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. Biodegradation. 2001;12(5):325-335.

7. Ibrahim M. Soil Pollution: Origin, Monitoring and Remediation. Berlin: Springer; 2004.
8. Amouei AA, Naddafi K, Mahvi AH. The Effect of Chemical Additives on the Uptake and Accumulation of Pb and Cd in Native Plants of North of Iran. J Mazandaran Univ Med Sci. 2012;21(86):116-124. (Persian)
9. Dehghani M, Shahsavani E, Farzadkia M, Samaei MR. Optimizing photo-Fenton like process for the removal of diesel fuel from the aqueous phase. J Environ Health Sci Eng. 2014;12(1):87.
10. Mohammadi F, Alimohammadi M, Mahvi AH, Nazmara S, Mazloomi S, Askari M. Evaluation of the Removal of Hydrocarbons from Soil Media Using Persulfate Oxidation in the Presence of Mineral Siderite. J Mazandaran Univ Med Sci. 2016;2(2):19-28.
11. Lee EH, Kang YS, Cho KS. Bioremediation of diesel-contaminated soils by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation employing *Rhodococcus* sp. EH831. Korean J Microbiol Biotechnol. 2011;39(1):86-92.
12. Farzadkia M, Esrafil A, Baghapour MA, Shahamat YD, Okhovat N. Degradation of metronidazole in aqueous solution by nano-ZnO/UV photocatalytic process. Desalination and Water Treatment. 2014;52(25-27):4947-52.
13. Dibble J, Bartha R. Rehabilitation of oil-inundated agricultural land: a case history. Soil Science. 1979;128(1):56-60.
14. Aseman E, Mostafaii GH, Sayyaf H, Asgharnia HA, Akbari H, Iranshahi L. Evaluation of combined Bioaccumulation and bioaugmentation processes for Phenanthrene and Pyrene removal from polluted soils by Earthworm *Eisenia fetida*. Iran J Health Environ. 2015; 8(3):357-366. (persian)
15. Rezaei N. Experimental Removal of Diesel in Soil Using Indigenous Microorganisms Isolated Iran: sharif university of technology; 2011.
16. saleha h. Microbial Metabolism of High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 2008;80:723-736.
17. Tayybi T, Jorfi S, Ghaffari SH, Kujlu R. Bioremediation of n-hexadecane contaminated soils using *pseudomonas aeruginosa* bacteria isolated from coastal areas. J Mazandaran Univ Med Sci. 2016;26(140):127-136. (Persian)
18. Grosser RJ, Vestal JR, Warshawsky D. Mineralization of polycyclic and N-heterocyclic aromatic compounds in hydrocarbon-contaminated soils. Environ Toxicol Chem. 1995;14(3):375-382.
19. Järup L. Hazards of heavy metal contamination. Br Med Bull. 2003;68(1):167-182.
20. Singh A, Ward OP. Biodegradation and bioremediation. Berlin: Springer, 2004.
21. Joo HS, Ndegwa PM, Shoda M, Phae CG. Bioremediation of oil-contaminated soil using *Candida catenulata* and food waste. Environ Poll. 2008;156(3):891-896.

22. Kardani M, Takdastan A. Removal of Total Petroleum Hydrocarbons Using *Vetiveria Zizanioides* and Microbial Population Changes in Soil Contaminated with Oil in Ahvaz. *J Mazandaran Univ Med Sci.* 2015;25(131):87-97. (Persian)
23. Loehr RC, Webster MT. Decreased release of PAHs from soils as a result of field bioremediation. *Pract Period Hazard Tox Radioact Waste Manag.* 2000;4(3):118-125.
24. Bento FM, Camargo FA, Okeke BC, Frankenberger WT. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresour Technol.* 2005;96(9):1049-1055.
25. Van Gestel K, Mergaert J, Swings J, Coosemans J, Ryckeboer J. Bioremediation of diesel oil-contaminated soil by composting with biowaste. *Environ Poll.* 2003;125(3):361-368.
26. Fazelipour M, Takdastan A, Jou MSS. Survey on chlorine application in sequencing batch reactor waste sludge in order to sludge minimization. *Asian J Chem.* 2011; 23(7):2994.
27. Takdastan A, Eslami A. Application of energy spilling mechanism by para-nitrophenol in biological excess sludge reduction in batch-activated sludge reactor. *Int J Energ Environ Engineer.* 2013; 4(4):26. (persian)
28. Chen M, Xu P, Zeng G, Yang C, Huang D, Zhang J. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: applications, microbes and future research needs. *Biotechnol Adv.* 2015;33(6):745-755.
29. Alvarez-Bernal D, Garcia-Diaz E, Contreras-Ramos S, Dendooven L. Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil added with manure or vermicompost. *Chemosphere.* 2006;65(9):1642-1651.
30. Joo HS, Shoda M, Phae CG. Degradation of diesel oil in soil using a food waste composting process. *Biodegradation.* 2007;18(5):597-605.
31. Hosseini Panah E, Takdastan A. Feasibility of Total Petroleum Hydrocarbon Removal from Drill Cutting with Digested Sludge Using Earth Worm. *J Mazandaran Univ Med Sci.* 2016; 25(133):319-324. (persian)
32. Sharifi Hosseini S,alizadeh B,Charm M,Motamedi H. The effect of organic fertilizers (sludge) for bioremediation of soil contaminated with crude oil. 3rd Conference of Environmental Engineering. Faculty of Environment, University of Tehran and the Environmental Protection Agency, Tehran,2010.
33. Javidpour A, Hajabbasi M, Soleimani M. Performance of compost amendment on bioremediation of oil contaminated soils. 1th international Conference of IALE.Iran, 2014. (persian)
34. Asgharnia H, Jafari AJ, Kalantary RR, Nasseri S, Mahvi A, Yaghmaeian K, et al. Influence of bioaugmentation on biodegradation of phenanthrene-contaminated soil by earthworm in lab scale. *J Environ Health Sci Eng.* 2014; 12(1):150.

35. Samaei MR, Mortazavi SB, Joneidi jafari A, Bakhshi B. Compined bioaugmentation and biostimulation to cleanup soil contaminated with hexadecane in slurry bioreactors: Tarbiat modares university faculty of medical sciences; 2013,59,141. (persian)
36. Park JA, Hur JM, Jang BK, Son BS. Evaluation of compost addition and its effect on biodegradation of diesel-oil in contaminated soil composting. *J Indust Engineer Chem.* 2001;7(3):127-136.
37. Namkoong W, Hwang EY, Park JS, Choi JY. Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting. *Environ Poll.* 2002;119(1):23-31.
38. Gogoia BK, Dutta NN, Goswami P, Mohan TK. A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site. *Adv Environ Res.* 2003;7(4):767-782.
39. Margesin R. Potential of cold-adapted microorganisms for bioremediation of oil-polluted Alpine soils. *INT BIODETER BIODEGR.* 2000;46(1):3-10.
40. Márquez-Rocha FJ, Hernández-Rodríguez V, Lamela MT. Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium. *WATER AIR SOIL POLL.* 2001;128(3-4):313-320.
41. Usefikebria D, Badkoobi A. bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by sewage sludge. the 8th national conference on environmental health; tehran2010.
42. Bento FM, Camargo FAO, Okeke B, Frankenberger WT. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2003;34:65-68.
43. Taccari M, Milanovic V, Comitini F, Casucci C, Ciani M. Effects of biostimulation and bioaugmentation on diesel removal and bacterial community. *INT BIODETER BIODEGR.* 2012;66(1):39-46.
44. Shim H, Chauhan S, Ryoo D, Bowers K, Thomas SM, Burken JG, et al. Rhizosphere competitiveness of trichloroethylene-degrading, poplar-colonizing recombinant bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2000 Nov; 66(11): 4673–4678.
45. Sutton NB, Grotenhuis T, Rijnaarts HH. Impact of organic carbon and nutrients mobilized during chemical oxidation on subsequent bioremediation of a diesel-contaminated soil. *Chemosphere.* 2014;97:64-70.