

# زیست پالایی خاک های آلوده به گازوئیل در بیوراکتور حاوی لجن فعال خام و ورمی کمپوست

بهناز عبداللهی نژاد<sup>۱\*</sup>، مهدی فرزادکیا<sup>۱\*</sup>، احمد جنیدی جعفری<sup>۱\*</sup>، علی اسرافیلی دیزجی<sup>۱\*</sup>

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

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

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۱۱/۱۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۲/۲۴

## چکیده

**سابقه و هدف:** امروزه آلودگی خاک به مواد نفتی (TPH) (Total petroleum hydrocarbons) از مشکلات عمده‌ای است که محیط زیست انسان و سایر موجودات زنده را با خطر جدی مواجه نموده است. یکی از بهترین و قابل اعتمادترین روش‌های زیست‌پالایی، استفاده از کرم‌های خاکی است که به روش کرم‌پالایی مشهور است. هدف از این مطالعه تعیین قابلیت زیست‌پالایی خاک آلوده به گازوئیل در بیوراکتورهای حاوی کرم خاکی ایزنیافتیدا با مخلوط کمپوست و لجن فعال خام می‌باشد. **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی به منظور تعیین کارایی زیست‌پالایی در حذف گازوئیل، از خاک آلوده، کمپوست گاوی و لجن فاضلاب شهری با نسبت های وزنی ۱: ۰/۳۵: ۰/۲۵ استفاده شد. فرآیند زیست‌پالایی در ۶ راکتور با غلظت‌های مختلف گازوئیل (۱۰ و ۳۰ گرم بر کیلوگرم خاک)، تعداد کرم‌های خاکی ایزنیافتیدا (۱۰ و ۲۰ عدد) در دمای محیط به مدت ۹۰ روز انجام شد. علاوه بر این، از دو راکتور بدون اضافه کردن کرم‌خاکی به منظور مقایسه عملکرد زیست‌پالایی گازوئیل با استفاده از کرم خاکی ایزنیافتیدا استفاده گردید. میزان تجزیه‌پذیری هیدروکربن‌های نفتی TPH با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی مجهز به آشکار ساز شعله‌ای (GC-FID) مورد سنجش قرار گرفت. نتایج حاصل از مطالعه حاضر با استفاده از نرم‌افزار Minitab نسخه ۱۷ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان می‌دهد که بیشترین راندمان حذف هیدروکربن‌های سبک حدود ۱۰۰ درصد در بازه زمانی ۹۰ روز در راکتور شماره ۳ با اختلاف معناداری ( $P < 0.05$ ) نسبت به دیگر راکتورها اتفاق افتاده است. این درحالیست که راندمان حذف هیدروکربن‌های متوسط در بیشتر راکتورها حدود ۷۰ درصد مشاهده گردید. بیشترین راندمان حذف هیدروکربن‌های سنگین (۶۸ درصد) در راکتور شماره ۴ با مشخصات نمونه خاک آلوده شده با گازوئیل ۱۰ گرم بر کیلوگرم خاک و ۲۰ عدد کرم خاکی ایزنیافتیدا، با اختلاف معناداری ( $P < 0.05$ ) نسبت به دیگر راکتورها مشاهده گردید. **استنتاج:** براساس نتایج مطالعه حاضر، تجزیه‌پذیری هیدروکربن‌های نفتی به طور قابل ملاحظه‌ای با اضافه کردن مواد اصلاح‌کننده آلی و افزایش تعداد کرم‌های خاکی افزایش یافته است.

**کلمات کلیدی:** زیست‌پالایی، کرم خاکی ایزنیافتیدا، لجن فعال، ورمی کمپوست، هیدروکربن های نفتی

## مقدمه

آلودگی خاک به عنوان یکی از معضلات زیست‌محیطی عمده در دنیا شناخته شده است. آلودگی خاک عبارت است از حضور، پخش یا افزودن یک یا چند ماده خارجی به خاک به مقدار و مدتی که کیفیت فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی آن را به طوری که برای انسان یا سایر موجودات زنده یا گیاهان و یا آثار و ابنیه زیان آور باشد، تغییر دهد. رشد و توسعه صنایع و فعالیت‌های انسانی باعث به وجود آمدن آلودگی‌های گوناگونی در خاک شده است که در صورت رسیدن به آب‌های زیرزمینی می‌توانند بسیار مضر باشند.<sup>۱</sup>

متداولترین آلاینده‌های نفتی در خاک شامل نفت، گازوئیل، حلال‌های کلردار، هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه ای (PAHs)، ترکیبات بنزن، تولوئن، اتیل بنزن، زایلن (BTEX)، و غیره می‌باشند.<sup>۲،۳</sup> از جمله علل آلودگی نفتی، تصادف تانکرهای نفت، بمباران، پخش مواد نفتی و مشتقات آن و برخی فعالیت‌های بی‌ملاحظه انسان و غیره می‌باشد.<sup>۳</sup> کشور ایران به عنوان یکی از بزرگ‌ترین کشورهای نفت-خیز و صادرکننده نفت خام در دنیا بشمار می‌آید. ایران باتوجه به دارا بودن ۸/۵۸ درصد از منابع نفتی جهان، تولیدات پتروشیمی حدود ۳۵ میلیون تن در سال و دارا بودن مقام دوم در ذخایر گازی جهان، شدیداً در معرض آلودگی خاک و آبهای سطحی و زیرزمینی می‌باشد.<sup>۳</sup>

از میان ترکیبات نفتی، گازوئیل به عنوان یکی از پرمصرف‌ترین و کاربردی‌ترین محصولات نفتی در دنیا و بخصوص در ایران مطرح شده است، که به علت کاربرد فراوان یکی از علل عمده آلودگی خاک در ایران می‌باشد. به طور عمده دلایل اصلی آلودگی خاک به ترکیبات نفتی را می‌توان به نشست مخازن ذخیره، لوله‌های انتقال، حوضچه‌های تبخیر، وقوع سوانح در حمل و نقل و پوسیدگی تانکهای پمپ بنزین نسبت داد.<sup>۴</sup> نشست ترکیبات نفتی تحت تأثیر نیروهای کاپیلاری و ثقلی منجر به حرکت عمودی در خاک‌های

غیراشباع شده و خلل و فرج خاک را پر می‌کند.<sup>۵</sup> گازوئیل یک ترکیب نفتی با وزن متوسط است که نقطه جوش آن بین ۱۷۵ تا ۳۵۵ درجه سلسیوس است و بیش از ۲۰۰ ترکیب هیدروکربنی نفتی با محدوده وزنی آلکان‌های C<sub>10</sub> - C<sub>28</sub> تشکیل شده است که معمولاً شامل ۳۰٪ آلکان، ۴۵٪ سیکلوآلکان و ۲۴٪ ترکیبات آروماتیک می‌باشد.<sup>۶</sup>

سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا (US.EPA) چندین روش از جمله شیمیایی، فیزیکی، بیولوژیکی و حرارتی برای پاکسازی خاکهای آلوده به هیدروکربن‌های نفتی ارائه کرده است.<sup>۷</sup> روش‌های فیزیکی مانند هوادهی، حفر و کندن و جابجایی، پخش، شستشو و دفن کردن جهت حذف آلودگی از مناطق با وسعت نسبتاً کم کاربرد دارند و برای مساحت‌های زیاد نظیر خاک‌های آلوده به مواد صنعتی و مواد نفتی و نظایر آن بسیار پر هزینه می‌باشند.<sup>۸</sup> به علاوه این روش‌ها مخمل شرایط طبیعی محیط بوده و استفاده از آنها به تنهایی بسیار پرهزینه، دارای عوارض و بعضاً غیر کارآمد است.<sup>۹</sup> روش‌های شیمیایی که بر پایه اکسید شدن شیمیایی آلاینده استوار است.<sup>۱۰</sup> در این روش از مواد اکسید کننده‌ای نظیر کلرین، هیپو کلرید، پرمنگنات، اکسیژن (O<sub>2</sub>)، ازن (O<sub>3</sub>) پراکسید هیدروژن (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)، پراکسیدهای آلی، فتون (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Fe<sup>+2</sup>) پرمنگنات پتاسیم، پرسولفات، و رادیکالهایی چون آلکوکسی (RO)، پراکسی (RO<sub>2</sub>) و هیدروکسیل (HO) و غیره جهت تجزیه آلاینده‌های آلی استفاده می‌گردد. استفاده از ترکیبات کلر دار در این روش به نوبه خود می‌تواند منجر به ایجاد محصولات جانبی خطرناک گردد.<sup>۱۱،۱۲</sup> این روش‌ها پرهزینه و گران بوده و معمولاً برای خاک‌هایی که آلودگی شدیدی دارند، پیشنهاد شده است.<sup>۱۳</sup>

در این میان روش زیست‌پالایی بدلیل کارایی و استفاده مکرر در خاک در دهه اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته و ضرورت انجام پژوهش در این زمینه هنگامی روشن‌تر می‌گردد که به اهمیت خاک به عنوان یک پایگاه زیستی

مواد مغذی در زیست-پالایی خاک‌های آلوده به سوخت دیزل، طی ۱۸۷ روز انکوباسیون انجام دادند که نتایج نشان دهنده‌ی عمده حذف در ۵۰ روز نخست رخ داد<sup>۱۶</sup>.

Margesin مشاهده کرد 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<sup>۱۷</sup>.

Dendooven و همکاران در سال ۲۰۱۱ در تحقیقی با عنوان خصوصیات کرم‌های خاکی ایزنیا فتیدا در خاک‌های آلوده به PAHs با لجن فاضلاب یا ورمی کمپوست، در طول دوره ۷۰ روز به این نتیجه رسیدند که وجود لجن فاضلاب برای تشکیل کوکون (تخم کرم خاکی) ضروری و لازم است<sup>۱۸</sup>. از آنجایی که مطالعات محدودی در ایران و جهان بر روی زیست‌پالایی خاک آلوده با انواع اصلاح کننده‌ها مانند ورمی کمپوست و لجن فعال خام و میکروارگانسیم‌ها و غیره صورت گرفته است<sup>۱۹</sup>. مطالعه حاضر با هدف تعیین راندمان حذف گازوئیل از خاک توسط کرم خاکی ایزنیا فتیدا همراه با مخلوط ورمی کمپوست و لجن فعال خام، با روش زیست‌پالایی که به دلیل کم هزینه بودن و دوست دار محیط زیست بودن انجام گردیده است.

## مواد و روش‌ها

این تحقیق یک مطالعه تجربی و بنیادی-کاربردی بوده و با هدف تعیین میزان زیست‌پالایی خاک آلوده به گازوئیل در بیوراکتور حاوی کرم خاکی ایزنیافتیدا با مخلوط ورمی کمپوست و لجن فعال خام طراحی و اجرا گردید.

## مراحل اجرایی پژوهش

### مرحله آلوده سازی خاک به گازوئیل

شستشوی خاک: خاک مورد نیاز شامل، رس و ماسه با نسبت به ترتیب ۲۵٪ و ۷۵٪ وزنی به صورت سیستتیک با

بالارزش که می‌تواند از آلودگی آب‌های زیرزمینی جلوگیری نماید پی برد<sup>۱۳</sup>.

زیست‌پالایی خاکهای آلوده با استفاده از کرم‌های خاکی از روش‌های سازگار با محیط زیست می‌باشد. کرم‌های خاکی حذف آلاینده‌ها از خاک را تسهیل می‌کنند و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک را با بهبود هوادهی تغییر می‌دهند و شرایطی را ایجاد می‌کنند که آلاینده در دسترس میکروارگانسیم‌ها قرار گیرد. از کرم‌های خاکی بعنوان شاخص نشان‌دهنده آلودگی خاک استفاده می‌شود. در این مطالعه از کرم خاکی ایزنیا فتیدا (*E. fetida*) که یک گونه مناسب برای شرایط ایران بوده و در اکثر مناطق کشور وجود دارد، استفاده شده است.

حسینعلی اصغرینیا ایمنی سال ۱۳۹۳، در تحقیقی که تحت عنوان بررسی کارایی فرآیند تلفیقی تجمع زیستی و زیست‌افزایی در حذف فنانترون و پایرن از خاک آلوده توسط کرم خاکی ایزنیا فتیدا (*Eisenia fetida*) انجام دادند به این نتیجه رسیدند که تلفیق کرم خاکی و زیست‌افزایی عملکرد حذف آلاینده‌ها را با  $P < 0.05$  افزایش داد و این نشان می‌دهد که کرم خاکی می‌تواند علاوه بر تجمع زیستی آلاینده در بدن خود، باعث افزایش دسترسی پذیری زیستی فنانترون و پایرن شده است<sup>۱۴</sup>.

در سال ۲۰۱۶، Chachina و همکاران در تحقیقی که با عنوان زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به نفت و دیزل توسط کرم ایزنیافتیدا انجام دادند، گزارش کردند که خاک آلوده با غلظت ۲۰ تا ۶۰ گرم بر کیلوگرم آلاینده نفتی بعد از ۲۲ هفته در حضور کرم‌ها و آماده سازی زیستی، حدود ۹۹٪ کاهش یافت و در خاک آلوده به دیزل با غلظت ۴۰ گرم بر کیلوگرم در حضور کرم خاکی و آماده سازی میکروبی بعد از ۱۴ روز حدود ۳۰٪ از گونه‌های کرم به دلیل سمیت با سوخت دیزل از بین رفتند<sup>۱۵</sup>.

Sutton و همکارانش مطالعه‌ای روی تاثیر کربن آلی و

گازوئیل در غلظت های (۱۰ و ۳۰ گرم بر کیلوگرم خاک) آلوده شده است.

### تهیه کمپوست

کمپوست مورد استفاده در این مطالعه از سایت کمپوست گاوی شهر هشتگرد خریداری شد. مشخصات مربوط به کمپوست در جدول شماره ۱ ارائه شده است.

خاک های تهیه شده پس از دو بار استریلیزاسیون با ال ک ۲ میلی متری غربال شده و با غلظت های ۱۰ و ۳۰ گرم گازوئیل بر کیلوگرم خاک بصورت مصنوعی آلوده شده است. ابتدا مقادیر ذکر شده از گازوئیل وزن شده و با مقداری استون مخلوط گردیده شد و سپس ترکیب مذکور به خاک های استریل شده به راکتورها اضافه گردید و محتوا جهت کارایی بیشتر به طور کامل مخلوط گردید. این کار به مدت ۷ روز تا زمان تبخیر کامل استون از خاک تکرار شده است<sup>۳</sup>.

### تهیه کرم خاکی

کرم های خاکی مورد استفاده در این تحقیق ایزنیافتیدا بوده که از شاخه کرم های حلقوی، خانواده لومبریسیده، جنس ایزنیا و گونه فتیدا می باشد و از سایت ورمی کمپوست گاوی هشتگرد تهیه گردید.

### تهیه لجن

لجن بیولوژیکی خام از لجن برگشتی فرآیند کانال اکسیداسیون تصفیه خانه فاضلاب جنوب تهران نمونه برداری گردید و به آزمایشگاه منتقل شد و در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. آزمایشات مربوط به آنالیز کیفی لجن فعال خام انجام شد که در جدول شماره ۱ ارائه شده است. تمامی آزمایشات مربوط به آنالیز خصوصیات کیفی لجن بر اساس کتاب روش های استاندارد برای انجام آزمایشات آب و فاضلاب انجام گردید.

### طراحی آزمایش

تعداد آزمایشات با استفاده از روش one factor at the time تعیین شد، که با در نظر گرفتن یک نوع کرم خاکی در دو سطح تعداد در خاک (۱۰ و ۲۰ عدد در هر کیلوگرم خاک)، در دو غلظت از گازوئیل (۱۰ و ۳۰ گرم در کیلوگرم خاک) و افزودن نسبت مخلوط لجن و ورمی کمپوست به خاک با ۳ بار تکرار و در نظر گرفتن شاهد (۲ راکتور بدون کرم با دو غلظت گازوئیل)، دوره نمونه برداری در کل ۹۰ روز و آنالیزها به صورت ۱۵ و ۳۰ روزه انجام شد. ، تست های مورد بررسی رطوبت، VS، pH، TPH، C، TKN و TP می باشد.

جدول ۱: مشخصات بیولوژیکی ورمی کمپوست و لجن فعال مورد استفاده

مشخصات کمپوست		مشخصات لجن فعال خام	
ویژگی	مقدار	ویژگی	مقدار
pH	۷/۷۸	pH	۷/۵۹
C/N	۴۲/۵۳	C/N	۲۶/۳۶
TS (درصد وزنی)	۲۹/۹۹	TS (درصد وزنی)	۲/۹۵
VS (درصد وزنی)	۱۵/۵۵	VS (درصد وزنی)	۷۹/۱۸
رطوبت (/.)	۷۰	رطوبت (/.)	۹۷/۰۵

جدول ۲: مشخصات راکتورها

راکتورها	غلظت گازوئیل (g/Kg)	تعداد کرم خاکی
۱	۱۰	۰
۲	۳۰	۰
۳	۳۰	۲۰
۴	۱۰	۲۰
۵	۳۰	۱۰
۶	۱۰	۱۰

### راه اندازی راکتورها

شده است. به هر راکتور مقدار یک کیلوگرم خاک آلوده شده با گازوئیل و ورمی کمپوست و لجن فعال خام با نسبت‌های ۱ : ۰/۳۵ : ۰/۲۵ (شکل ۲) اضافه شد.

پس از انجام مراحل آماده‌سازی، تعداد ۶ ظرف مکعب مستطیلی به طول: ۲۱/۵ سانتی متر عرض: ۱۴/۵ سانتی متر و ارتفاع: ۹/۵ سانتی متر آماده شد در شکل شماره ۱ نشان داده



شکل ۱: آماده سازی راکتورها جهت انجام فرایند زیست پالایی

مختلفی وجود دارد. در این تحقیق برای اندازه گیری TPH از دستگاه گازکروماتوگراف (GC) مجهز به آشکارساز شعله ای (FID) استفاده گردید.

جهت سنجش میزان گازوئیل از دستگاه کروماتوگرافی (GC-FID , CP 9001) ساخت کشور هلند با ستون گازکروماتوگرافی HP<sub>5</sub> استفاده 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. سپس 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.



شکل ۲: محتویات داخل راکتورها شامل: خاک آلوده به گازوئیل+ورمی کمپوست+لجن فعال خام +کرم خاکی ایزنیافتیدا

## استخراج گازوئیل از خاک

سنجش گازوئیل موجود در خاک بر اساس روش 3550B USEPA تعیین شد<sup>۲۱</sup>. در این روش مقدار ۲ گرم خاک جهت جداسازی ذرات درشت، توسط الک ۲mm غربال گردید و با ۲ گرم سولفات سدیم بدون آب مخلوط شد تا رطوبت خاک توسط سولفات سدیم گرفته شود<sup>۳</sup>. سپس ۵ میلی لیتر استون و ۵ میلی لیتر آن-هگزان به آن اضافه گردید و با استفاده از دستگاه اولتراسونیک عمل استخراج آلاینده از خاک به داخل حلال (استون) صورت گرفت. خاک به مدت ۲ دقیقه در معرض امواج اولتراسونیک قرار می گیرد تا بدین وسیله عمل شکستن صورت گیرد و گازوئیل از خاک وارد حلال شود. همچنین برای افزایش زمان تماس، نمونه به مدت یک ساعت روی شیکر در ۲۰۰ دور در دقیقه هم زده شد. پس از آن نمونه ها را در حالت سکون قرار داده تا بصورت خاک ته نشین شود و مایع رویی را با فیلتر تفلونی ۰/۲۲ میکرون صاف گردید.

## سنجش کل هیدروکربن های نفتی (TPH<sub>s</sub>)

برای اندازه گیری هیدروکربن های نفتی کل، روش های

## آنالیزهای رطوبت (Humidity)، جامدات فرار (VS)، (pH)، مواد آلی کل (TOC)، نیتروژن کل (TN)، فسفر کل (TP)

آنالیزهای فوق جهت بررسی شرایط زیستی داخل راکتورها به دلیل وجود موجود زنده (کرم خاکی) انجام شد که تمامی نمونه ها با روش های استاندارد متد اندازه گیری شده است<sup>۲۲، ۲۳</sup>. برای سنجش مقدار رطوبت، ابتدا نمونه ها در داخل بوته چینی توزین شده، قرار گرفتند و سپس در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس برای مدت ۲۴ ساعت در اوان قرار گرفت و پس از توزین ثانویه، رطوبت محاسبه شد. سپس به منظور سنجش جامدات فرار (VS) و خاکستر، خاک خشک شده در کوره مافلر به مدت ۲ ساعت در ۵۵۰ درجه سلسیوس حرارت داده شد و دوباره توزین شد و بر اساس روش گراویمتری مورد سنجش قرار گرفت. برای محاسبه نیتروژن کجگلدال کل به این ترتیب عمل شد: در مرحله اول، هضم نمونه با اسید سولفوریک غلیظ و پس از آن در مرحله دوم تقطیر، صورت گرفت. مجموع فسفر (TP) نیز توسط هضم اسید و پس از آن با استفاده از روش اولسن، برآورد شده است<sup>۲۴</sup>.

**جدول ۳:** آزمایشات شیمیایی ورمی کمپوست و لجن فعال مورد استفاده

نام آزمایش	واحد	روش آزمایش	شماره آزمایش	مرجع
VS	درصد وزنی	وزن سنجی	2540G	۲۵
TN	درصد TS	کجدال	4500_NorgB	۲۶
TP	درصد	روش اولسن	۱۰۷۱۶	۲۷

### تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و روند تغییرات فاکتورهای موثر: رطوبت (Humidity)، جامدات فرار (VS)، (pH)، مواد آلی کل (TOC)، نیتروژن کل (TN)، فسفر کل (TP) از نرم‌افزارهای Excel 2016 و Minitab 17 استفاده گردید. از آنالیز آماری One-way Anova به منظور مقایسه راندمان حذف هیدروکربن‌های سبک، متوسط و سنگین در راکتورهای مختلف مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه

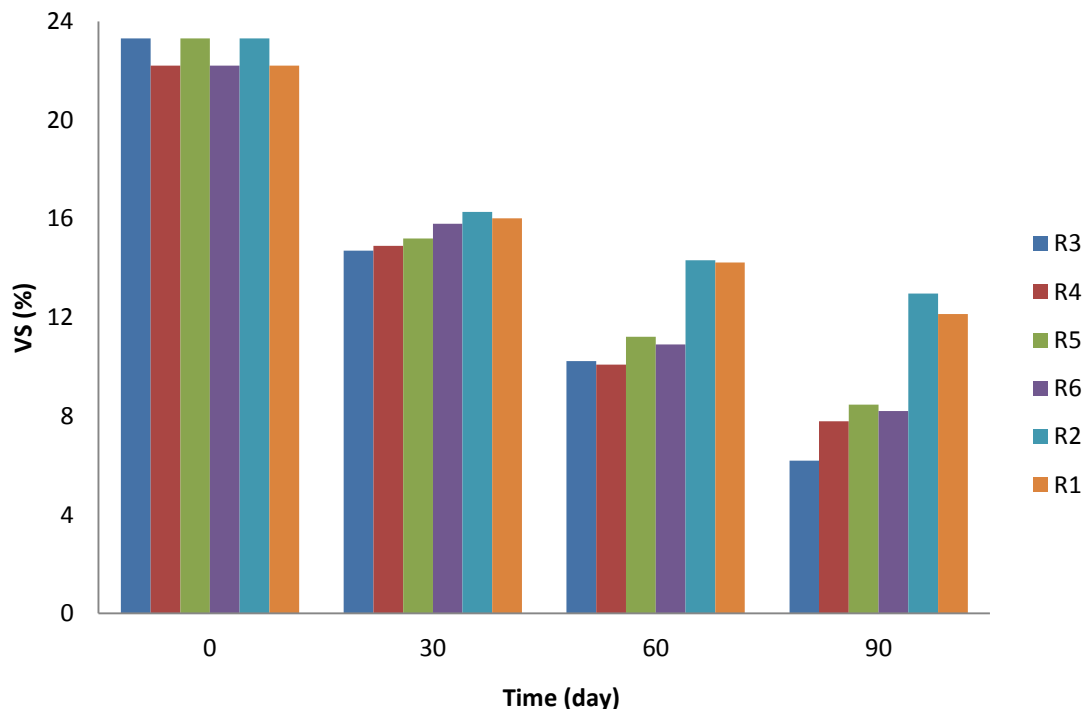
برای  $p < 0/05$  به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شده است.

### یافته‌ها

#### نتایج مربوط به روند تغییرات پارامترهای موثر

#### روند تغییرات VS در طی فرایند زیست پالایی

VS به عنوان پارامتر مهم جهت معدنی‌سازی، تجزیه و رسیدگی کمپوست مطرح می‌باشد<sup>۲۸</sup>.

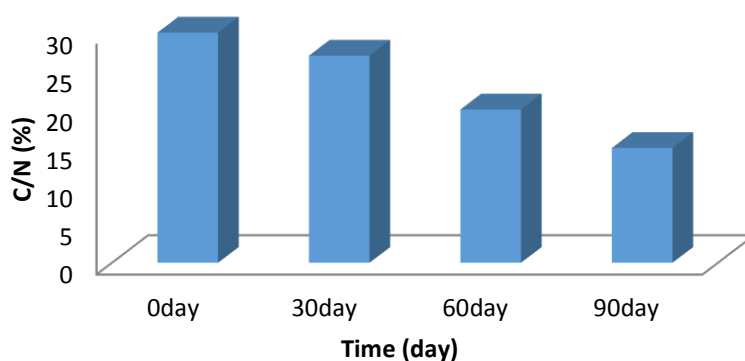


**شکل ۳:** روند تغییرات VS در راکتورهای مختلف طی فرآیند کمپوست (۹۰ روز)

## نتایج مربوط به C / N / P در حالت های مختلف طراحی آزمایش

جدول ۴: مقادیر C / N / P در طی بازه زمانی ۹۰ روزه در راکتورها

زمان (روز)	صفر	۳۰	۶۰	۹۰
C	۲۰۰	۱۵۰	۱۰۰	۸۰
N	۶/۶۶	۵/۳۵	۵	۴/۴
P	۳	۲/۳	۱	۰/۴
C/N	۳۲-۳۰	۲۸-۲۵	۲۱-۱۹	۱۸-۱۵



شکل ۴: روند تغییرات C / N در راکتورهای مختلف طی فرآیند کمپوست (۹۰ روز)

اگرچه pH بهینه خنثی و در حدود خنثی است <sup>۳۱</sup>.

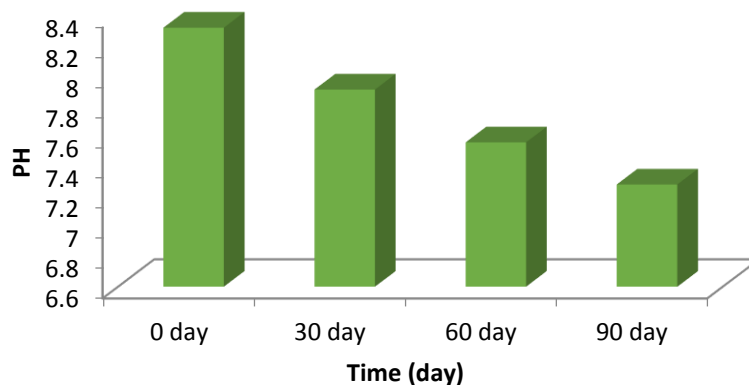
### روند تغییرات رطوبت در طی فرایند زیست پالایی

رطوبت مورد نیاز برای زیستن کرم های خاکی در راکتورها تأمین شده است. در طی دوره ۹۰ روزه با اسپری کردن آب مقطر رطوبت تنظیم شده است. کرم ها از طریق نفوذ اکسیژن هوا یا آب از پوست مرطوب آن ها به داخل مویرگ های خونی، تنفس می کنند. در صورتیکه پوست کرم ها خشک شود، کرم ها خفه می شوند.

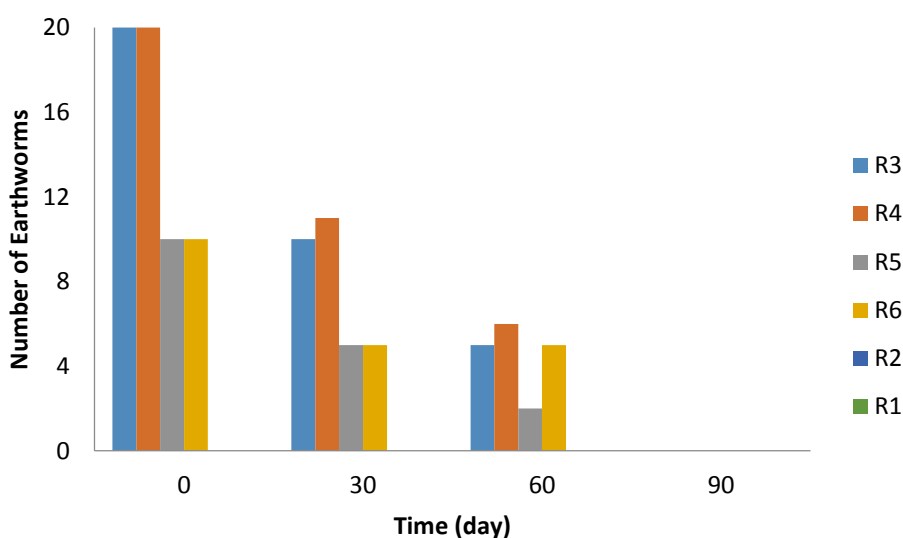
نسبت های C / N / P مطابق با جدول شماره ۴ در تمامی راکتورها تنظیم شد. به طوری که رفته رفته در طول دوره با معدنی سازی مواد آلی توسط کرم های خاکی و میکروارگانیسم ها این مقادیر کاهش پیدا کرده و به سمت تثبیت کربن، نیتروژن و فسفر در پایان دوره ۹۰ روز انجام شده است <sup>۲۹</sup>. همانطور که در جدول ۴ نشان داده شده است، مقدار TP در طول زمان در تمام راکتورها کاهش یافته است <sup>۳۰</sup>.

### روند تغییرات pH در طی فرایند زیست پالایی

یکی از پارامترهای مهم تأثیرگذار بر فرآیندهای کرم پالایی شناخته شده است. دامنه pH قابل قبول و مناسب برای کرم های خاکی و فعالیت میکروارگانیسم ها ۸/۵-۵/۵ می باشد،



شکل ۵: روند تغییرات PH در راکتورهای مختلف طی فرآیند کمپوست (۹۰ روز)



شکل ۶: تعداد کرم خاکی در حالت‌های مختلف طراحی آزمایش در راکتورها در مدت زمان ۹۰ روز

### مختلف طراحی آزمایش

جهت تحلیل و بررسی تاثیر زیست پالایی بر حذف TPH، داده های حاصل از راندمان حذف کل هیدروکربن های نفتی در راکتور های مختلف به سه گروه سبک، متوسط و سنگین تقسیم بندی شده است. آلاینده مورد مطالعه گازوئیل با محدوده هیدروکربن های  $C_{10}$  تا  $C_{24}$  می باشد. نتایج حاصل از آزمون آماری One-way ANOVA نشان

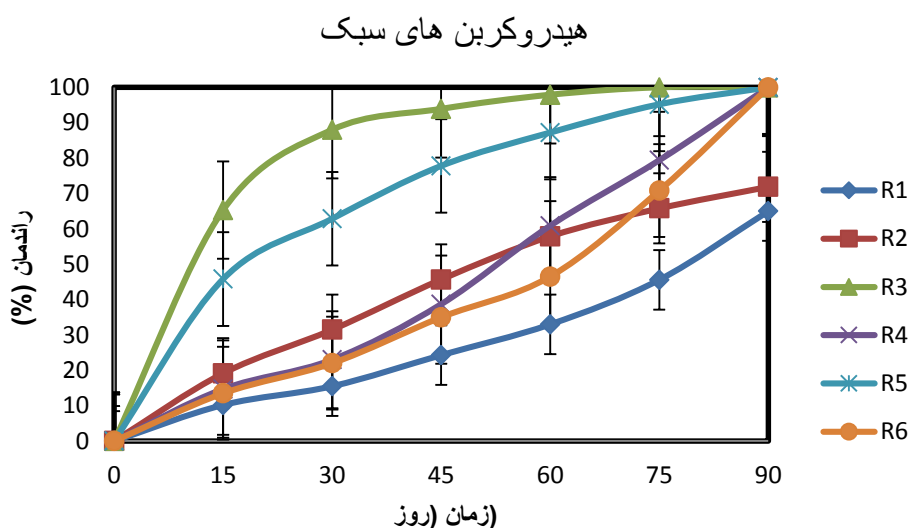
### تعداد کرم‌های خاکی و تأثیر آن‌ها

راکتور شماره ۱ و ۲ شاهدان بدون کرم می باشند. در راکتور شماره ۳ و ۴، ۲۰ عدد کرم خاکی ایزنیافتیدا وجود داشته است و در راکتور شماره ۵ و ۶، ۱۰ عدد کرم خاکی حضور داشتند.

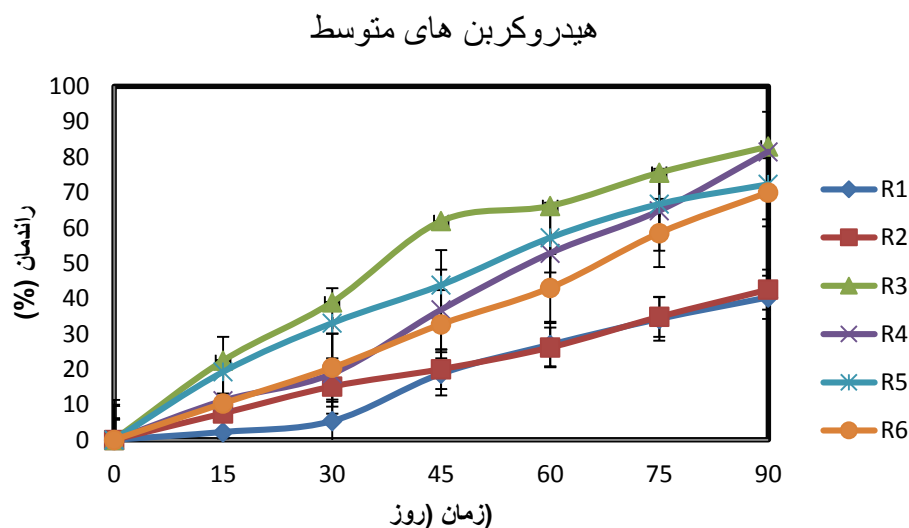
### نتایج مربوط به درصد حذف گازوئیل در حالت‌های

میزان راندمان حذف هیدروکربن های متوسط در راکتورهای شش گانه در شکل شماره ۸ ارائه شده است. نتایج حاصل از آزمون آماری One-way ANOVA نشان می دهد که میانگین میزان حذف  $TPH_2$  (هیدروکربن های متوسط) در تمامی راکتورها با فاصله اطمینان ۹۵٪ و سطح معناداری ۵٪ با همدیگر برابر می باشند.

می دهد که میانگین میزان حذف  $TPH_1$  (هیدروکربن های سبک) در حدود ۱۰۰ درصد در راکتور شماره ۴ با مشخصات نمونه خاک آلوده شده با گازوئیل ۳۰ گرم در کیلوگرم خاک + ۲۰ عدد کرم خاکی ایزنیافتیدا، با اختلاف معناداری ۵٪ نسبت به دیگر راکتورها بیشتر می باشد و مابقی راکتورها با فاصله اطمینان ۹۵٪ در یک گروه قرار گرفته است.

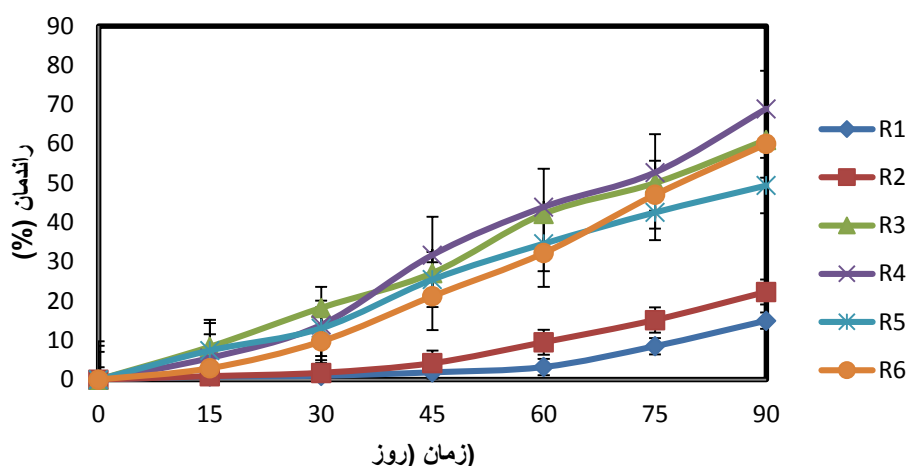


شکل ۷: راندمان حذف هیدروکربن های سبک در راکتورهای مختلف در مدت زمان ۹۰ روز



شکل ۸: راندمان حذف هیدروکربن های متوسط در راکتورهای مختلف در مدت زمان ۹۰ روز

### هیدروکربن های سنگین



شکل ۹: راندمان حذف هیدروکربن های سنگین در راکتورهای مختلف در مدت زمان ۹۰ روز

با توجه محتویات راکتورها که شامل کرم خاکی، لجن فاضلاب و و می کمپوست می باشد نسبت C/N نیز در ابتدا زیاد بوده و در پایان ۹۰ روز به کمترین حد خود رسیده است که این روند در مطالعات دیگر مانند Singh J و همکاران هم به این صورت گزارش شده است.<sup>۳۲</sup>

Gogoi و همکاران در مطالعه زیست-پالایی خاک های آلوده به نفت خام در محل ریزش نفت مشاهده کردند که؛ هوادهی، کاربرد کودهای دارای نیتروژن، فسفر و تلقیح میکروبی، باعث تجزیه ۷۵ درصدی نفت خام می شود.<sup>۳۳</sup>

میزان حذف بیشتر آلاینده ها با گذشت زمان به دلایل مختلفی ممکن است اتفاق بیفتد از جمله می توان به فرصت زمانی بیشتر کرم های خاکی و سایر میکروارگانیسم ها، تبخیر سطحی بیشتر و تجزیه طبیعی اشاره نمود. مطالعه Hernández-Castellanos و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی حذف بنزو آلفا پیرن از خاک آلوده توسط کرم خاکی (*Pontoscolex corethrus*) مؤید این موضوع است.<sup>۳۴</sup>

در این مطالعه در تمامی راکتورها با توجه به یکسان بودن مواد بستر راکتور و اختلاف در میزان غلظت گازوئیل و تعداد

نتایج حاصل از آزمون آماری One-way ANOVA نشان می دهد که میانگین میزان حذف  $TPH_3$  (هیدروکربن های سنگین) در راکتور شماره ۴ با مشخصات نمونه خاک آلوده شده با گازوئیل ۱۰ گرم در کیلوگرم خاک + ۲۰ عدد کرم خاکی ایزنیافتیدا، با اختلاف معناداری ۰.۵٪ نسبت به دیگر راکتورها بیشتر می باشد و مابقی راکتورها با فاصله اطمینان ۹۵٪ در یک گروه قرار گرفته است.

### بحث

کاهش بیشتر جامدات فرار در راکتورهای با تعداد کرم خاکی بیشتر، مثل راکتور شماره ۳ و راکتور شماره ۴ نشان دهنده فعالیت کرم ایزنیافتیدا و فعالیت میکروبی لجن در این راکتور می باشد. در راکتورهای شماره ۱ و ۲ این روند کاهش با شیب بسیار کمتری رخ داده که می توان به عدم حضور کرم ایزنیافتیدا در این دو راکتور که راکتورهای شاهد هستند نسبت داد. در تمامی راکتورها در طول زمان روند کاهش VS مشاهده شده است، که در اکثر مقالات همین روند صادق است.<sup>۲۸</sup>

سبکتر باشد. و البته این روند نزولی، در اوزان مولکولی بالاتر بیشتر نمود پیدا می کند و باعث اختلاف شدیدتر درصد حذف بین آلاینده های نفتی می گردد<sup>۴۱</sup>.

این یافته ها با نتایج Taccari و همکاران<sup>۴۱</sup> روی زیست پالایی خاک های آلوده به سوخت دیزل که سرعت تجزیه هیدروکربن های با وزن مولکولی سبک تر ( $C_{12}$ ) را در مقایسه با هیدروکربن های با وزن مولکولی بالاتر ( $C_{12}$ ) بیشتر گزارش کردند.

از آنجایی که وجود کرم های خاکی دارای پتانسیل بسیار بالایی در حذف هیدروکربن های مقاوم به تجزیه مانند پیرن و بسیاری از مواد شیمیایی دیگر از خاک آلوده هستند<sup>۴۲</sup>. بیشترین درصد حذف متعلق به راکتور دارای بیشترین تعداد کرم خاکی است که در مطالعه ای تاثیر کرم خاکی ایزنیا فتیدا (*E. fetida*) را در افزایش حذف PAHs از خاک مورد بررسی قرار داد<sup>۴۳</sup>. Contreras-Ramos درصد حذف ۳ ترکیب فنانترن، آنتراسن و بنزو آلفا پیرن از خاک آلوده را بدون استفاده از کرم خاکی به ترتیب ۰.۷۷٪، ۰.۲۳٪ و ۰.۱۳٪ و با استفاده از کرم خاکی ۱.۰۰٪، ۰.۵۱٪ و ۰.۴۷٪ گزارش نموده است<sup>۴۳</sup>. Andersen و همکاران (۱۹۷۹) بیان داشتند که کود حیوانی بعنوان ماده غذایی کرم خاکی بوده و اضافه نمودن آنها به خاک باعث افزایش بیومس کرم خاکی می گردد<sup>۴۴</sup>. تمامی این اصلاح کننده ها باعث افزایش راندمان حذف گازوئیل از خاک شده اند.

### نتیجه گیری

زیست پالایی خاکهای آلوده از روش های نوین و سازگار با محیط زیست است که با روش های مختلفی می تواند بکار برده شود. استفاده از کرم های خاکی و میکروارگانیسم های موجود در لجن فعال و ورمی کمپوست یکی از روش های زیست پالایی خاک های آلوده شناخته شده است. نتایج حاصل از این پژوهش نشان می دهد که کرم خاکی ایزنیا فتیدا

کرم ها و اینکه pH گازوئیل هم در محدوده قلیایی حدود (۸/۱۵) قرار گرفته شده، بنابراین pH راکتورها در ابتدا از محدوده قلیایی ۸/۲ - ۸/۴ شروع شده و رفته رفته طی مدت زمان فرآیند به محدوده خنثی ۷-۷/۲ نزدیک شده است، که این روند کاهش را میتوان به دلیل معدنی شدن ازت و فسفر به نیتريت یا نیترات و فسفات نسبت داد<sup>۳۵</sup>.

شرایط محیطی مناسب برای رشد کرم ها عبارتند از: دمای ۲۰ درجه سلسیوس، رطوبت ۷۰-۶۵ درصد و PH بهینه در حد خنثی تا کمی اسیدی است. که در مطالعات گوناگون مثل Jorge Domínguez<sup>۱</sup> با توجه به حضور کرم خاکی درصد رطوبت رعایت شده است<sup>۳۶</sup>.

طبق مطالعه Irizar و همکاران در صورتی که ماده آلی در خاک کم باشد، کرم های خاکی قادر به هضم خاک نبوده، در نتیجه سمیت فلز کادمیوم در آن ها افزایش یافته و باعث مرگ و میر و اختلال در تولیدمثل آن ها شده است<sup>۳۷</sup>. مطالعه حق پرست و همکاران هم نشان دهنده این امر بود که ماده آلی به منزله انرژی برای کرم های خاکی ایزنیا فتیدا می باشد و درصد زنده مانی آن ها را افزایش داده است<sup>۳۸</sup>. کرم های خاکی مقدار TOC، کربن آلی، VS و نسبت C/N در لجن را کاهش می دهند<sup>۳۹</sup>. در آلودگی های با غلظت بالای هیدروکربن های نفتی، جمعیت باکتری ها کاهش می یابد و زیست پالایی خاک اتفاق نمی افتد. برای ارتقاء کارآمدی زیست پالایی خاک می توان به کاربرد کرم خاکی در خاک های آلوده با روش کرم پالایی اشاره کرد<sup>۱۵</sup>. کرم های خاکی از ترکیبات لجن براحتی تغذیه می کنند و به سرعت آن ها را به ورمی کمپوست تبدیل می کنند و حتی پاتوژن ها را تا حد ایمن کاهش می دهند و فلزات سنگین را هضم می کنند<sup>۴۰</sup>.

با افزایش وزن مولکولی هیدروکربن ها مقدار حذف آلاینده ها کاهش می یابد که دلیل این امر می تواند بدلیل پایداری بالای هیدروکربن های سنگین تر و حجیم تر در برابر تغییرات شدید فیزیکی-شیمیایی نسبت به هیدروکربن های

تجزیه پذیری هیدروکربن های نفتی به طور قابل ملاحظه ای با مواد اصلاح کننده آلی و افزایش تعداد کرم های خاکی افزایش یافته است. مطالعه حاضر استفاده از کرم خاکی ایزنیا فتیدا (*E.fetida*) به همراه ورمی کمپوست، لجن فعال خام را بعنوان یک روش جامع، نوآورانه و دوستدار محیط زیست برای تجزیه هیدروکربن های نفتی از خاک معرفی کرده است.

### تشکر و سپاسگزاری

مقاله حاضر حاصل بخشی از پایان نامه قطع کارشناسی ارشد مهندسی بهداشت محیط مصوب دانشگاه علوم پزشکی ایران با کد طرح ۴۶۶۸ می باشد. بدین وسیله از حوزه معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی ایران به جهت حمایت از این طرح، تشکر و قدردانی به عمل می آید.

### References

- Chen M, Xu P, Zeng G, et al. 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): 745-55.
- Das N, Chandran P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnol Res Int* 2011;2011.
- Momeni M, Farzadkia M, Esrafil A, Kermani M. Bioremediation of Soils Contaminated with Diesel Using Bio-stimulation Method in the Bioreactors of Vermicompost and Activated Sludge. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2018;27(158): 179-92 [In Persian].
- Margesin R, Schinner F. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. *Appl Environ Microbiol* 2001;67(7): 3127-33.
- Cole GM. Assessment and remediation of petroleum contaminated sites: Routledge; 2018.
- Todd GD, Chessin RL, Colman J. Toxicological profile for total petroleum hydrocarbons (TPH). 1999.
- Cookson Jr JT. Bioremediation engineering: Design and application: McGraw-Hill, Inc.; 1995.
- Safari M, Ahmady-Asbchin S, Soltani N. The potential of cyanobacterium *Schizothrix vaginata* ISC108 in biodegradation of crude oil. *Iran J Environ Health Sci Eng* 74-363:(3) 7;2014 [In Persian].
- Shukla KP, Singh NK, Sharma S. Bioremediation: developments, current practices and perspectives. *Genet Eng Biotechnol J* 2010.
- Chen J, Wong M, Wong YS, Tam NF. Multi-factors on biodegradation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Sphingomonas* sp. a bacterial strain isolated from mangrove sediment. *Mar Pollut Bull* 2008;57(6-12): 695-702.
- Gan S, Lau E, Ng H. Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *J Hazard Mater* 2009;172(2-3): 532-49.
- Lundstedt S, Haglund P, Öberg L. Degradation and formation of polycyclic aromatic compounds during bioslurry treatment of an aged gasworks soil. *Environmental Toxicology and Chemistry An International Journal* 2003;22(7): 141-203.
- Chen M, Xu P, Zeng G, et al. 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;(336,Part 1): 745-55.
- Asgharnia H. Investigation of the efficiency of the combined process of bio-stimulation and bio-accumulation in removal of phenanthrene and pyrene from soil contaminated by *Eisenia Fetida* earthworm. Iran university of medical science 2014;PhD thesis 2014: [In Persian].

15. Chachina S, Voronkova N, Baklanova O. Biological remediation of the petroleum and diesel contaminated soil with earthworms *Eisenia fetida*. *Procedia Eng* 2016;152: 122-33.
16. 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.
17. Margesin R. Potential of cold-adapted microorganisms for bioremediation of oil-polluted Alpine soils. *Int Biodeterior Biodegradation* 2000;46(1): 3-10.
18. Dendooven L, Alvarez-Bernal D, Contreras-Ramos SM. Earthworms, a means to accelerate removal of hydrocarbons (PAHs) from soil? A mini-review. *Pedobiologia* 2011;54: S187-S92.
19. Momeni M. Comparison of Bioremediations of soil Contaminated gasoline by Biostimulation in bioreactors , Raw Active Sludge and Vermicompost Compound mixture of activated sludge and vermicompost. Iran university of medical science ,Ms thesis 2018: [In Persian].
20. Skubal L. Environmental Sampling and Analysis: Lab Manual. *Environ Prog Sustain Energy* 1999;18(1): S10.
21. Sheng-wang P, Shi-qiang W, Xin Y, Sheng-xian C. The removal and remediation of phenanthrene and pyrene in soil by mixed cropping of alfalfa and rape. *Agric Sci Chin* 2008;7(11): 1355-64.
22. Federation WE, Association APH. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association : Washington, DC, USA 2005.
23. Council UC. Test methods for the examination of composting and compost. *Rokonkoma: Council UC* 2002.
24. Faithfull NT. Methods in agricultural chemical analysis: a practical handbook: Cabi; 2002.
25. Cho JK, Park SC, Chang HN. Biochemical methane potential and solid state anaerobic digestion of Korean food wastes. *Bioresour Technol* 1995;52(3): 245-53.
26. Frederickson J, Butt KR, Morris RM, Daniel C. Combining vermiculture with traditional green waste composting systems. *Soil Biol Biochem* 1997;29(3-4): 725-30.
27. Ndegwa P, Thompson S, Das K. Effects of stocking density and feeding rate on vermicomposting of biosolids. *Bioresour Technol* 2000;71(1): 5-12.
28. Hait S, Tare V. Optimizing vermistabilization of waste activated sludge using vermicompost as bulking material. *Waste Manage (Oxford)* 2011;31(3): 502-11.
29. Malińska K, Zabochnicka-Świątek M, Cáceres R, Marfà O. The effect of precomposted sewage sludge mixture amended with biochar on the growth and reproduction of *Eisenia fetida* during laboratory vermicomposting. *Ecol Eng* 2016;90: 35-41.
30. Tiquia S, Tam N, Hodgkiss I. Changes in chemical properties during composting of spent pig litter at different moisture contents. *Agric Ecosyst Environ* 1998;67(1): 79-89.
31. Yadav A, Garg V. Industrial wastes and sludges management by vermicomposting. *Rev Environ Sci Bio Journal* 2011;10(3): 243-76.
32. Singh J, Kaur A. Vermicompost as a strong buffer and natural adsorbent for reducing transition metals, BOD, COD from industrial effluent. *Ecol Eng* 2015;74: 13-9.
33. Gogoi B, Dutta N, 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): 767-82.
34. Hernández-Castellanos B, Ortíz-Ceballos A, Martínez-Hernández S, et al. Removal of benzo (a) pyrene from soil using an endogeic earthworm *Pontoscolex corethrurus* *Appl Soil Ecol* 2013;70: 62-9.
35. Kaushik P, Garg V. Dynamics of biological and chemical parameters during vermicomposting of solid textile mill sludge mixed with cow dung and agricultural residues. *Bioresour Technol* 2004;94(2): 203-9.
36. Domínguez J, Edwards CA, Webster M. Vermicomposting of sewage sludge: effect of bulking materials on the growth and reproduction of the earthworm *Eisenia andrei*. *Pedobiologia* 2000;44(1): 24-32.
37. Irizar A, Rodriguez M, Izquierdo A, et al. Effects of soil organic matter content on cadmium toxicity in *Eisenia fetida*: implications for the use of biomarkers and standard toxicity tests. *Arch Environ Contam Toxicol* 2015;68(1): 181-92.
38. Jenabi, Haghparast R, Golchin A, Kahneh E. Effect of different cadmium concentrations on growth of *Eisenia fetida* in a calcareous soil. 2013: [In Persian].
39. Sinha RK, Herat S, Bhambe G, Brahmabhatt A. Vermistabilization of sewage sludge (biosolids) by earthworms: converting a potential biohazard destined for landfill disposal into a pathogen-free, nutritive and safe biofertilizer for farms. *Waste Manag Res* 2010;28(10): 872-81.
40. Singh R, Embrandiri A, Ibrahim M, Esa N. Management of biomass residues generated from palm oil mill: Vermicomposting a sustainable option. *Resources, Conservation and Recycling* 2011;55(4): 423-34.
41. Taccari M, Milanovic V, Comitini F, et al. Effects of biostimulation and bioaugmentation on diesel removal and bacterial community. *Int Biodeterior Biodegradation* 2012;66(1): 39-46.
42. Sinha RK, Valani D, Sinha S, et al. Bioremediation of contaminated sites: a low-cost nature's biotechnology for environmental clean up by versatile microbes, plants & earthworms. *Waste Manag Res* 2009: 978-1.

43. Contreras-Ramos SM, Alvarez-Bernal D, Dendooven L. *Eisenia fetida* increased removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil. *Environ Pollut* 2006;141(3): 396-401.
44. Andersen C. The influence of farmyard manure and slurry on the earthworm population (Lumbricidae) in arable soil. *Soil Biology as Related to Land Use Practices* EPA, Washington, DC 1980: 325-35.

# Bioremediation of Soils Contaminated with Gasoline in Bioreactors Containing Earthworms *Eisenia Fetida* and Mixture of Vermicompost and Raw Activated Sludge

Behnaz Abdollahinejad<sup>1,2</sup>, Mahdi Farzadkia<sup>1,2\*</sup>, Ahmad Jonidi Jafari<sup>1,2</sup>, Ali Esrafil<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Research Center for Environmental Health Technology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

\* E-mail: [m\\_farzadkia@yahoo.com](mailto:m_farzadkia@yahoo.com)

Received: 27 Jan 2019 ; Accepted: 14 May 2019

## ABSTRACT

**Background and Aims:** Nowadays, soil pollution with total petroleum hydrocarbons (TPH) is one of the major environmental issues caused serious problems to human and other living organisms. One of the best and most reliable methods of bioremediation is the use of earthworms known as vermin-remediation. In this study, bioremediation of gasoline-contaminated soil using *Eisenia Fetida*, the mixture of activated sludge and compost was evaluated.

**Materials and Methods:** In order to determine the efficiency of bioremediation to removal gasoline from contaminated soil, cow compost and urban sewage sludge with a weight ratio of 1: 0.35:0.25, was used. Experiments were carried out in 6 reactors with different concentrations of diesel (10 and 30 g / kg soil), a different number of *Eisenia Fetida* earthworm (10 and 20) at ambient temperature during 90 days. To compare the performance of biodegradation of gasoline using *Eisenia Fetida* earthworm, two control reactors that contained only contaminated soil with two ratios of gasoline, vermicompost and activated sludge, were used. The (TPH) decomposition rate was measured by GC-FID. Results of this study were analyzed by Minitab version 17 software.

**Results:** Results indicated reactor No.3 has the best removal efficiency of light hydrocarbons during 90 days. the removal efficiency of average hydrocarbons was 70% and heavy hydrocarbons with the highest removal efficiency of 68% in reactor No. 4 with characteristics Soil polluted with 10 g / kg of soil + 20 number of *Eisenia Fetida*, With a significant difference of other reactors.

**Conclusion:** Based on the results of this study, the degradability of hydrocarbons has increased significantly with the addition of organic modifying materials and the increase in the number of earthworms.

**Keywords:** Bioremediation, Total petroleum hydrocarbons, *Eisenia Fetida* earthworm, Vermicompost, Activated sludge