به نام خدا

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای محمد رضا سمائی رشته **مهندسی بهداشت محیط** رساله **دکتری** خود را با عنوان : **« تلفیق تقویت و تحریک زیستی جهت پاکسازی خاک آلوده به هگزادکان در بیوراکتورهای دوغابی»** در تاریخ **۱۳۹۱/۱۲/۱۴** ارائه کردند.

بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنـرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	امضاء
استاد راهنما	دکتر سید باقر مرتضوی	
استاد مشاور	دکتراحمد جنیدی جعفری	
استاد مشاور	دکتربی تا بخشی	
استاد ناظر	دکترعباس رضایی	
استاد ناظر	دکترعلی خوانین	
استاد ناظر	دکترمهدی فرزادکیا	
استاد ناظر	دکترسید محمد موسوی	
نماینده تحصیلات تکمیلی	دکترسید غلامرضا موسوی	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده 1- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده 2- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجو مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده 3- انتشار کتاب، نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین نامه های مصوب انجام شود.

ماده 4- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده 5- این آیین‌نامه در 5 ماده و یک تبصره در تاریخ87/4/1 در شورای پژوهشی و در تاریخ 87/4/23 در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ 87/7/15 شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب محمد رضا سمائی دانشجوی رشته مهندسی بهداشت محیط ورودی سال تحصیلی ۱۳۸۷ مقطع دکتری دانشکده علوم پزشکی متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آئین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آئین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هر گونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله بر اساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدین وسیله حق هر گونه اعتراض را از خود سلب نمودم»

امضا:
تاریخ ۹۱/۱۲/۱۵

آیین نامه چاپ رساله‌های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار رساله‌های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده 1: در صورت اقدام به چاپ رساله‌ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اطلاع دهد.

ماده 2: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند:

«رساله دکتری نگارنده در رشته **مهندسی بهداشت محیط** است که در سال **1391** در دانشکده **علوم پزشکی** دانشگاه **تربیت مدرس** به راهنمایی جناب آقای **دکتر سید باقر مرتضوی**، مشاوره جناب آقای **دکتر احمد جنیدی جعفری** و سرکار خانم **دکتر بی‌تا بخشی** از آن دفاع شده است.»

ماده 3: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت‌چاپ) را به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر درمعرض فروش قرار دهد.

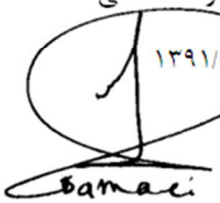
ماده 4: در صورت عدم رعایت ماده 3، 50٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت‌مدرس، تأدیه کند.

ماده 5: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده 4 را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶: اینجانب محمد رضا سمائی دانشجوی رشته مهندسی بهداشت محیط مقطع دکتری تعهد فوق وضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی: محمد رضا سمائی

تاریخ و امضا: ۱۳۹۱/۱۲/۱۵



دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته مهندسی بهداشت محیط

عنوان

تلفیق تقویت و تحریک زیستی جهت پاک‌سازی خاک آلوده به هگزادکان در بیوراکتورهای دوغابی

نگارش

محمد رضا سمائی

استاد راهنما

دکتر سید باقر مرتضوی

اساتید مشاور

دکتر احمد جنیدی جعفری

دکتر بی‌تا بخشی

زمستان 1391

تقدیم به:

پدر و مادرم، پشتوانه‌های زندگیم،

همسرم، به خاطر صبر و تحملش در سختی‌ها،

دخترم نیلا، به خاطر تحمل دوری‌ها،

پسرم بردیا که دو روز پس از دفاع از این رساله دیده به جهان گشود،

و تمام دانشمندان حقیقی که اخلاق و دانش را فدای خودخواهی و کینه‌های خود نمی‌کنند.

با تشکر و سپاس فراوان از:

پدر و مادر مهربان و دلسوزم

که همواره مشوق من بوده‌اند و دعاهای آن‌ها بزرگترین پشتوانه‌ی زندگیم بوده و هست،

همسر مهربان و **دختر** عزیزم

که انجام این رساله آن‌ها را با دشواری‌های زیادی مواجه ساخت و به من کمک زیادی کردند تا سختی کار بر من سهل و آسان شود،

استاد بزرگوار جناب آقای **دکتر سید باقر مرتضوی**

که زحمت زیادی به عنوان استاد راهنمای اینجانب کشیدند،

جناب آقای **دکتر احمد جنیدی جعفری**

که همواره من را در انجام پایان‌نامه یاری کردند،

سرکار خانم **دکتر بی‌تا بخشی**

که همواره با سعه‌ی صدر من را یاری دادند،

و تمام دوستان عزیزم، به ویژه دکتر سید عنایت الله هاشمی که مرا یاری رساندند.

چکیده

امروزه آلودگی‌های زیست محیطی به‌ویژه آلودگی‌های نفتی از مسائل مهمی است که جوامع بشری با آن مواجه است. روش‌های گوناگونی برای حذف ترکیبات نفتی از خاک وجود دارد، اما زیست‌پالایی به دلیل داشتن محاسنی از قبیل دوستدار محیط زیست بودن و قابلیت انجام در محل به عنوان روشی مطلوب جهت حذف ترکیبات نفتی از خاک پذیرفته شده است. در این رساله نخست باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی هگزادکان از محیط خاک و کمپوست جداسازی و پس از جداسازی و خالص‌سازی، به روش **PCR** و با تعیین توالی ناحیه‌ی **16S rDNA** شناسایی گردیدند که شامل *سودوموناس آئروژینوزا* (دو سویه)، *اسینتوباکتر رادیورزیستنس*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *آکروباکتروم اوریزه*، *اسفینگوموناس اس‌پی.*، *پائنی‌باسیلوس لاتوس* و *سراتیا مارسسنس* بودند. سپس توان باکتری‌های خاک و کمپوست در حذف هگزادکان از محیط مایع مورد بررسی قرار گرفت که از بین باکتری‌های خاک، *اسینتوباکتر رادیورزیستنس* و از بین باکتری‌های کمپوست، *آکروباکتروم اوریزه* دارای بالاترین توان حذف هگزادکان بودند. بنابراین از آن‌ها جهت تقویت زیستی خاک استفاده گردید. برای تعیین شرایط بهینه‌ی حذف هگزادکان از خاک از روش تاگوچی استفاده شد. هفت پارامتر در سه سطح در نظر گرفته شد. نمونه‌ها به مدت 80 روز در شیکرانکوباتور قرار گرفته و غلظت هگزادکان باقیمانده در زمان‌های مختلف با دستگاه **GC-FID** مورد سنجش قرار گرفت. در تحلیل واریانس بهترین شرایط جهت حذف هگزادکان به روش زیست‌پالایی به این صورت به دست آمد؛ غلظت هگزادکان: 70000 میلی‌گرم بر کیلوگرم، درصد ریز مغذی‌ها: 5، درصد شوری: 0، درصد مایع تلقیحی: 2/5، نسبت **C:N:P**: 100:10:2، نسبت خاک به آب: 5 و باکتری: کنسرسیوم. از بین تمام این پارامترها، عامل باکتری و غلظت اولیه‌ی هگزادکان بیشترین تاثیر را در کارایی بیوراکتورها نشان داد. نتایج این پژوهش نشان داد میزان تلقیح اولیه‌ی باکتری‌ها بر حذف هگزادکان تاثیر زیادی دارد، اما با گذشت زمان جمعیت میکروبی به یک تعادل رسیده و تعداد اولیه‌ی باکتری‌ها تاثیری بر حذف هگزادکان ندارد. نتایج این پژوهش نشان داد که کارایی کنسرسیوم میکروبی در حذف هگزادکان بیشتر از کشت خالص بود. همچنین در آزمایش‌های تکمیلی مشخص شد که هر چه تنوع باکتری‌های موجود در کنسرسیوم بیشتر باشد، مدت زمان لازم برای حذف کامل هگزادکان کاهش می‌یابد. در کل زیست‌پالایی 40/02 درصد در حذف هگزادکان دخالت داشته که 30/14 درصد مربوط به تقویت زیستی و 9/88 درصد مربوط به تحریک زیستی بوده است. در آزمایش تائیدی این نتایج تائید شد. در آزمایش تحمل شوری هالوتولرنت بودن دو گونه‌ی *اسینتوباکتر رادیورزیستنس* و *آکروباکتروم اوریزه* مورد تائید قرار گرفت و در آزمایش‌های تکمیلی مشخص شد کنسرسیوم میکروبی از توانایی حذف هگزادکان در شوری 4 درصد نیز برخوردار است. در این رساله کارایی ریزمغذی‌ها بر حذف هگزادکان نیز مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت مشخص شد که هر چه زمان مواجهه‌ی خاک با ترکیبات نفتی بیشتر می‌شود، تاثیر ریزمغذی‌ها نیز افزایش می‌یابد. این یافته نشان می‌دهد که اضافه کردن ریزمغذی‌ها به محل‌های آلوده‌ی قدیمی به حذف ترکیبات نفتی کمک شایانی می‌کند. همچنین بررسی‌های انجام شده بیانگر این بود که بخش زیادی از هگزادکان به صورت غیربیولوژیکی حذف می‌گردد. در آزمایش‌های تکمیلی مشخص شد که هگزادکان توسط فرایندهای بیولوژیکی، امواج اولتراسوند، جذب روی خاک و فرایندهای شیمیایی حذف شده و تبخیر تاثیری بر حذف هگزادکان نداشته است. این نتایج امکان استفاده از رویکردهای تقویت و تحریک زیستی جهت حذف ترکیبات نفتی از آب‌ها و خاک‌های نیمه شور را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: زیست‌پالایی، هگزادکان، تقویت زیستی، تحریک زیستی، **PCR**

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته 1

1-1. بیان مساله 2

1-1-1. هدف کلی 5

1-1-2. هدف‌های جزئی 5

1-1-3. فرضیات 6

2-1. آلودگی‌های نفتی در ایران و جهان 6

3-1. هگزادکان و مشخصات آن 9

4-1. مکانیسم تجزیه‌ی هیدروکربن‌های نفتی 9

5-1. روش‌های پاک‌سازی خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی 11

6-1. میکروبیولوژی نفت 13

7-1. زیست‌پالایی 16

1-7-1. محاسن زیست‌پالایی 17

2-7-1. معایب زیست‌پالایی 18

3-7-1. عوامل موثر بر زیست‌پالایی هیدروکربن‌های نفتی 19

1-3-7-1. ساختار شیمیایی هیدروکربن‌های نفتی 19

2-3-7-1. حالت فیزیکی هیدروکربن‌های نفتی 20

3-3-7-1. غلظت هیدروکربن‌های نفتی 21

4-3-7-1. عوامل محیطی 21

1-4-3-7-1. دما 22

2-4-3-7-1. مواد مغذی و تقویت‌کننده‌ها 23

3-4-3-7-1. اکسیژن 24

4-4-3-7-1. شوری 24

5-4-3-7-1. فشار 25

6-4-3-7-1. فعالیت آب 25

7-4-3-7-1. pH 25

5-3-7-1. میکروارگانیسم‌های مورد نیاز جهت زیست‌پالایی 25

6-3-7-1. قابلیت دسترسی زیستی 26

4-7-1. راهبردهای زیست‌پالایی 26

1-4-7-1. روش‌های زیست‌پالایی در محل 26

1-1-4-7-1. تهویه‌ی‌زیستی 27

2-1-4-7-1. تجزیه‌ی‌زیستی در محل 27

1-7-4-1-3. بیواسپارژینگ 27
1-7-4-1-4. تقویت زیستی 28
1-7-4-1-5. تحریک زیستی 28
1-7-4-2. روش‌های زیست‌پالایی خارج از محل 29
1-7-4-2-1. روش کشاورزی یا لندفارمینگ 29
1-7-4-2-2. روش کودسازی یا کمپوست‌سازی 29
1-7-4-2-3. ستون‌های زیستی 29
1-7-4-2-4. راکتورهای زیستی یا بیوراکتورهای دوغابی 30
1-7-4-2-5. پمپ کردن و تصفیه 31
1-8. خاک 32
1-9. واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) 33
1-9-1. مراحل PCR 34
1-9-2. اجزای واکنش PCR 36
1-9-3. وسایل مورد نیاز برای واکنش PCR 38
1-10. طراحی آزمایش‌ها 38
1-10-1. خطوط راهنما برای طراحی آزمایش‌ها 40
1-10-2. روش‌های گوناگون طراحی آزمایش‌ها 42
1-10-3. روش تاگوچی 43
1-10-4. مزایا و محدودیت‌ها در روش تاگوچی 44
1-11. مروری بر مطالعات گذشته 45
1-11-1. جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی هگزادکان از محیط 45
1-11-1-1. *اسینتوباکتر* 46
1-11-1-2. *سودوموناس* 46
1-11-1-3. *آکروباکتروم* 46
1-11-1-4. *اسفینگوموناس* 47
1-11-1-5. *پائینی باسیلوس* 47
1-11-1-6. *سراتیا* 48
1-11-1-7. *باسیلوس* 48
1-11-2. تجزیه‌ی زیستی ترکیبات نفتی 48
1-11-2-1. تجزیه‌ی زیستی نفت دیزل 48
1-11-2-2. تجزیه‌ی زیستی هگزادکان 50
1-11-3. طراحی آزمایش‌ها و بیوراکتورهای دوغابی 53
1-11-4. تاثیر فسفر و نیتروژن بر تجزیه‌ی زیستی 54

1-11-5. کمپوست و باکتری‌های آن 55
1-11-6. تاثیر ریزمغذی‌ها بر تجزیه‌ی زیستی 55

فصل دوم: مواد و روشها 57
2-1. مقدمه 58
2-2. محیط کشت‌ها 58
2-3. جداسازی باکتری‌ها از خاک آلوده و کمپوست 60
2-4. آزمایش‌های میکروبی انجام شده 63
2-4-1. آزمایش گرم 63
2-4-2. کشت در محیط کشت نوترینت براث و اندازه‌گیری میزان رشد میکروبی 63
2-4-3. آزمایش تحمل شوری 64
2-4-4. آزمایش pH اولیه 65
2-4-5. آزمایش MPN 65
2-4-6. کالیبراسیون چگالی نوری در برابر تعداد باکتری‌ها 66
2-5. بررسی ژنتیکی 66
2-6. سنجش هگزادکان 71
2-6-1. تهیه‌ی منحنی استاندارد هگزادکان 72
2-6-2. استخراج هگزادکان از نمونه‌ها 73
2-6-2-1. استخراج از مایع 73
2-6-3-2. استخراج از خاک 74
2-7. تجزیه‌ی زیستی هگزادکان از محیط مایع 74
2-8. زیست‌پالایی خاک آلوده به هگزادکان 76
2-8-1. آماده‌سازی خاک 77
2-8-2. آماده کردن باکتری و تهیه‌ی مایع تلقیح 79
2-8-3. تنظیم نسبت C:N:P 79
2-8-4. راه‌اندازی بیوراکتورها 79
2-8-5. تحلیل نتایج 80
2-8-6. آزمایش‌های تائیدی و تکمیلی 80

فصل سوم: نتایج و یافته‌ها 82
3-1. جداسازی و شناسایی باکتری‌ها از خاک آلوده و کمپوست 83
3-2. حذف هگزادکان از محیط مایع 85
3-3. آزمایش تحمل شوری و pH اولیه 88

3-4. نتایج آزمایش‌های زیست‌پالایی طراحی شده به روش تاگوچی 91
3-4-1. شناسایی مهم‌ترین عوامل موثر بر زیست‌پالایی خاک 91
3-4-2. تحلیل واریانس داده‌ها 92
3-4-3. تعیین شرایط بهینه‌ی حذف هگزادکان 93
3-4-4. تعیین تاثیر هر عامل طی 80 روز 94
3-5. نتایج آزمایش تائیدی 106
3-6. نتایج آزمایش‌های مربوط به حذف غیر بیولوژیکی هگزادکان 107

فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها 108
4-1. باکتری‌های جداسازی شده 109
4-2. بررسی توان تجزیه‌ی زیستی هگزادکان 113
4-3. زیست‌پالایی خاک آلوده به هگزادکان 115
4-3-1. بهینه‌سازی حذف هگزادکان از خاک با روش تاگوچی 116
4-3-2. تاثیر تقویت زیستی بر حذف هگزادکان از خاک 119
4-3-3. تاثیر میزان غلظت اولیه‌ی هگزادکان بر حذف هگزادکان از خاک 121
4-3-4. تاثیر نیتروژن و فسفر بر حذف هگزادکان از خاک 122
4-3-5. تاثیر ریزمغذی‌ها بر حذف هگزادکان از خاک 122
4-3-6. تاثیر نمک بر حذف هگزادکان از خاک 123
4-3-7. تاثیر نسبت خاک به آب (درصد دوغاب) بر حذف هگزادکان از خاک 125
4-4. مقایسه‌ی حذف هگزادکان در محیط مایع و دوغابی 126
4-5. نتیجه‌گیری 128
4-6. پیشنهادها 129

فهرست منابع 131

ضمائم 146

چکیده انگلیسی 154

فهرست جدول‌ها

جدول 1-1: شرایط زیست‌محیطی موثر بر تجزیه 22

جدول 1-2: ترکیب معمول یک سلول میکروبی 23

جدول 2-1، ترکیب محیط کشت معدنی مورد استفاده در خالص‌سازی باکتری‌ها 59

جدول2-2، ترکیب محیط کشت معدنی مورد استفاده در مطالعات تجزیه‌ی زیستی و زیست‌پالایی 59

جدول 2-3، محیط کشت عناصر ناچیز 60

جدول 2-4، حجم و غلظت نهایی مواد تشکیل دهنده واکنش در حجم نهایی 25 میکرولیتر 69

جدول 2-5، برنامه‌ی PCR مورد استفاده برای تکثیرDNA 70

جدول 2-6، متغیرها و سطوح در نظر گرفته شده در طراحی آزمایش‌ها 76

جدول 2-7، نتایج آنالیز فیزیکوشیمیایی خاک اول مورد استفاده جهت آلوده‌سازی 77

جدول 2-8، نتایج آنالیز فیزیکوشیمیایی خاک ماسه‌ای مورد استفاده جهت آلوده‌سازی 78

جدول2-9، مقدار هگزادکان لازم برای آلوده‌سازی خاک 78

جدول 2-10، ترکیب کنسرسیوم‌های مختلف در آزمایش‌های تکمیلی 81

جدول 3-1، ویژگی‌های مرفولوژک و فیزیولوژیک گونه‌های جداسازی شده از خاک 84

جدول 3-2، ویژگی‌های گونه‌های جداسازی شده از کمپوست 85

جدول 3-3، متوسط میزان هگزادکان (میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) حذف شده طی روزهای 20، 50 و 80 91

جدول 3-4، اثرات اصلی بر اساس میانگین داده‌های روز 50 92

جدول 3-5، تحلیل واریانس بر اساس میانگین داده‌های حذف کل 50 روز 93

جدول 3-6، شرایط بهینه بر اساس میانگین داده‌های حذف کل 50 روز 94

فهرست نمودارها

نمودار 2-1، منحنی کالیبراسیون هگزادکان 73

نمودار 3-1، رشد باکتری‌های خاک و کمپوست در محیط مایع حاوی هگزادکان 86

نمودار 3-2، میزان حذف هگزادکان از محیط کشت مایع 87

نمودار3-3، متوسط رشد 24 ساعته‌ی *آکروباکتروم اوریزه* و *اسینتوباکتر رادیورزیستنس* در محیط نوترینت براث حاوی غلظت‌های مختلف نمک کلرید سدیم 88

نمودار 3-4، متوسط رشد 24 ساعته‌ی باکتری‌های *اسینتوباکتر رادیورزیستنس* و *آکروباکتروم اوریزه* شده در محیط نوترینت براث با pHهای اولیه‌ی مختلف 89

نمودار 3-5، منحنی کالیبراسیون OD_{600} در برابر تعداد کلونی‌ها 90

نمودار 3-6، تاثیر نوع باکتری بر مقدار هگزادکان حذف شده در محیط دوغابی طی 80 روز 95

نمودار 3-7، تاثیر میزان تلقیح باکتری (تعداد باکتری‌ها) بر مقدار هگزادکان حذف شده در محیط دوغابی 96

نمودار 3-8، تاثیر نسبت C:N:P بر مقدار هگزادکان حذف شده در محیط دوغابی 97

نمودار 3-9، تاثیر میزان ریزمغذی‌ها بر مقدار هگزادکان حذف شده در محیط دوغابی 98

نمودار 3-10، تاثیر نسبت خاک به آب بر مقدار هگزادکان حذف شده در محیط دوغابی 99

نمودار 3-11، تاثیر نسبت خاک به آب 0، 20 و 50 درصد در آزمایش تکمیلی بر مقدار هگزادکان کل حذف شده در شرایط بهینه در محیط دوغابی 100

نمودار 3-12، تاثیر نسبت خاک به آب 0، 20 و 50 درصد در آزمایش تکمیلی بر مقدار حذف بیولوژیکی هگزادکان در شرایط بهینه در محیط دوغابی 100

نمودار 3-13، تاثیر میزان نمک بر مقدار هگزادکان حذف شده در محیط دوغابی 101

نمودار 3-14، تاثیر درصدهای مختلف شوری در آزمایش تکمیلی بر مقدار حذف کل هگزادکان در شرایط بهینه در محیط دوغابی 102

نمودار 3-15، تاثیر درصدهای مختلف شوری در آزمایش تکمیلی بر مقدار حذف بیولوژیکی هگزادکان در شرایط بهینه در محیط دوغابی..... 102

نمودار 3-16، تاثیر غلظت اولیه‌ی هگزادکان ($mg\ k^{-1}$) بر مقدار هگزادکان حذف شده در محیط دوغابی 103

نمودار 3-17، مقایسه‌ی مقدار هگزادکان حذف شده توسط *اسینتوباکتر* و *اکروباکتروم* در محیط‌های مایع و دوغابی 104

نمودار 3-18، تاثیر کنسرسیوم‌های مختلف در آزمایش تکمیلی بر مقدار حذف کل هگزادکان در شرایط بهینه در محیط دوغابی..... 105

نمودار 3-19، تاثیر کنسرسیوم‌های مختلف در آزمایش تکمیلی بر مقدار حذف بیولوژیکی هگزادکان در شرایط بهینه در محیط دوغابی..... 105

نمودار 3-20، نتایج آزمایش تائیدی؛ میزان هگزادکان حذف شده از خاک در شرایط بهینه 106

نمودار 3-21، میزان هگزادکان حذف شده از خاک ماسه‌ای..... 107

فهرست شکل‌ها

شکل 1-1. وضعیت آلودگی‌های نفتی در مناطق مختلف جهان 7

شکل 1-2. مسیر متابولیکی تجزیه‌ی بیولوژیکی هگزادکان 10

شکل 2-1. چهار بخش مجزای پلیت 62

شکل 2-2. مراحل کشت خطی برای جداسازی میکروبی 62

شکل 2-3. نمونه‌ای از الکتروفورز ژل آگاروز محصول PCR 70

شکل2-4. کروماتوگرام هگزادکان و دودکان با دستگاه GC-FID 72

فهرست علائم و نشانه‌ها

نشانه	فارسی	لاتین
AL	لیپید فعال	Active Lipid
ATL	لیز کننده‌ی بافت حیوانی	Animal Tissue Lysis
BLAST	ابزار جستجوی تطابق	Basic Local Alignment Search Tool
BP	شرکت نفت بریتانیا	British Petroleum
BTEX	بنزن، تولوئن، اتیلن بنزن، زایلن	
C:N:P	نسبت کربن به نیتروژن به فسفر	Carbon to Nitrogen to Phosphorus ratio
CSH	آب‌گریزی سطح سلول	Cell Surface Hydrophobicity
DNA	دی‌اکسی ریبونوکلوئیک اسید	Deoxyribonucleic acid
EMB	ائوزین متیلن بلو	Eosin methylene blue
EPA	سازمان حفاظت محیط زیست	Environmental Protection Agency
FID	آشکارساز یونیزاسیون شعله	Flame Ionization Detection
GC	کروماتوگرافی گازی	Gas Chromatography
HXD	هگزادکان	Hexadecane
MPN	محتمل‌ترین تعداد	Most Probable Number
OD	چگالی نوری	Optical Density
PAH	هیدروکربن آروماتیک چند حلقوی	Polycyclic Aromatic Hydrocarbon
PCB	بی‌فنیل‌های چند کلره	PolyChlorinated Biphenyls
PCR	واکنش زنجیره‌ی پلیمراز	Polymerase Chain Reaction
PHC	هیدروکربن‌های نفتی	Petroleum HydroCarbons
PTFE	پلی‌تترا فلورو اتیلن	Polytetrafluoroethylene
RNA	ریبونوکلوئیک اسید	Ribonucleic acid
TAE	تریس/استات/EDTA	Tris/Acetate/EDTA
TBE	تریس/بورات/EDTA	Tris/Borate/EDTA
TPH	کل هیدروکربن‌های نفتی	Total Petroleum Hydrocarbons

فصل اول

مقدمه و

مروری بر مطالعات گذشته

1-1. بیان مساله

کیفیت زندگی انسان به محیط زیست او بستگی دارد. امروزه پیدا کردن زمین برای دفن پسماندها، به‌ویژه پسماندهای خطرناک، بسیار دشوار و پرهزینه است. در اثر توسعه‌ی صنایع و افزایش محصولات در سال‌های متمادی، خاک و آب‌های زیرزمینی به آلاینده‌های مختلف آلوده شده‌اند. دسته‌ی مهمی از منابع آلاینده‌ی خاک، فراورده‌های نفتی می‌باشند. به دلیل سمیت، جهش‌زایی و اثرات سرطان‌زایی بالقوه‌ی بعضی از هیدروکربن‌های نفتی و امکان ورود آن‌ها به چرخه‌ی غذایی، آلودگی محیط زیست با این مواد یک مشکل عمومی به شمار می‌رود. از آنجا که فراورده‌های نفتی معمولا به عنوان مواد خام و منبع تامین انرژی در طیف وسیعی از صنایع، به ویژه صنایع نفت و پتروشیمی، مصرف می‌شوند، ریزش‌های نفتی به یک نگرانی عمده در محیط‌های دریایی و ساحلی تبدیل شده است[1]. در اغلب مواقع غلظت ترکیبات نفتی در خاک زیاد نیست، اما غلظت کل هیدروکربن‌های نفتی در برخی خاک‌ها به 450 گرم بر کیلوگرم خاک نیز می‌رسد که 45 تا 70 درصد آن را هیدروکربن‌های آلیفاتیک تشکیل می‌دهند [2]. یکی از فراورده‌های نفتی مهم که می‌تواند موجب آلودگی آب و خاک گردد، نفت دیزل است. نفت دیزل مخلوطی پیچیده از آلکان‌ها و ترکیبات آروماتیک می‌باشد [3]. در بین آلکان‌ها نیز، ان-آلکان‌های با زنجیره‌ی متوسط در زمره‌ی مهم‌ترین آلاینده‌های خاک قرار می‌گیرند [4]. در این دسته، نرمال هگزادکان ($C_{16}H_{34}$) توسط بسیاری

از پژوهشگران [6;5]، که در مورد تجزیه‌ی زیستی نفت خام و نفت دیزل تحقیق کرده‌اند، به عنوان آلاینده‌ی مدل به کار رفته است. دلیل این پژوهشگران برای انتخاب هگزادکان به عنوان آلاینده‌ی مدل مواردی همچون حلالیت پایین آن در آب و همچنین به خاطر تجزیه‌پذیری سریع آن توسط بسیاری از میکروارگانیسم‌ها بوده است [2]. بنابراین با مطالعه‌ی این ترکیب می‌توان نتایج را به کل هیدروکربن‌های نفتی تعمیم داد. کشور ایران یکی از بزرگترین تولیدکنندگان نفت در سطح جهان می‌باشد و یکی از مهم‌ترین مشکلات و موضوعات زیست‌محیطی که امروزه در ایران با آن مواجه هستیم، آلوده شدن آب‌های زیرزمینی و خاک با ترکیبات نفتی است. نفت دیزل یکی از مهم‌ترین ترکیبات آلاینده‌ی نفتی است و آلودگی‌های ناشی از آن به کررات گزارش شده است. این ترکیب از راه‌های گوناگون مانند نشت از جایگاه‌های عرضه‌ی سوخت، خطوط انتقال، پالایشگاه‌ها و پتروشیمی‌ها وارد خاک می‌شود. نفت دیزل عمدتا از آلکان‌ها تشکیل شده است، اما مقادیر جزئی از ترکیبات آروماتیک (حدود 4 درصد) را نیز دارا می‌باشد [7]. روش‌های فیزیکی، حرارتی، شیمیایی و بیولوژیکی مختلفی برای حذف این ترکیبات از آب و خاک پیشنهاد شده است. استفاده از روش‌های زیستی از جمله روش‌های رایج در تجزیه و حذف این مواد می‌باشد [8]. امروزه مشخص شده است که بهترین رویکرد، تجزیه‌ی این ترکیبات به مواد غیرزیان‌آور است. از آنجا که به نظر می‌رسد زیست‌پالایی یک گزینه‌ی بهتر نسبت به فناوری‌های پاک‌سازی متداول است، پژوهش در این زمینه به سرعت در حال افزایش است [9]. امروزه زیست‌پالایی به دلیل داشتن محاسنی از قبیل ساده بودن فناوری، دوست‌دار محیط زیست بودن، قابلیت انجام در محل و ارزان‌تر بودن از سایر فناوری‌ها به عنوان روش مطلوب جهت حذف ترکیبات نفتی از خاک پذیرفته شده است. همچنین با کمک زیست‌پالایی می‌توان غلظت آلاینده را تا حدی کاهش داد که با سایر روش‌ها قابل دستیابی نیست. ضمن این‌که با این روش تخریب کامل آلاینده امکان‌پذیر می‌باشد و باقیمانده‌ی تصفیه معمولا فراورده‌های بی‌ضرر است و شامل آب، دی‌اکسید کربن و توده‌ی زیستی سلولی می‌شود. پژوهشگران طی سال‌های اخیر بیشتر به دنبال بهینه کردن این فرایند و عملیاتی کردن آن بوده‌اند. بنابراین در این رساله به دنبال بهینه کردن مهم‌ترین عوامل موثر بر این فرایند بوده‌ایم. با وجود این‌که زیست‌پالایی کم‌هزینه‌ترین روش تصفیه‌ی