بسم الله الرحمن الرحيم

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای سهند جرفی رشته **مهندسی بهداشت محیط** رساله **دکتری** خود را با عنوان « **حذف پایرن از خاکهای آلوده با کاربرد متوالی بیوسورفکتانت و پراکسید هیدروژن کاتالیز شده با نانوذرات آهن** » در تاریخ **۱۳۹۲/۴/۱۱** ارائه کردند.

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

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	امضاء
استاد راهنما	دکتر عباس رضایی	
استاد مشاور	دکتر نعمت اله جعفرزاده	
استاد مشاور	دکتر قاسمعلی محبعلی	
استاد ناظر	دکتر احمد جنیدی جعفری	
استاد ناظر	دکتر کامیار یغمائیان	
استاد ناظر	دکتر احمد رضا یزدانبخش	
استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر 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 ۱- 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 ۲- 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 دانشجوی 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 ۳- انتشار کتاب و یا 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 آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ٤- 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 ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/٤/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/٤/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **سهند جرفی** دانشجوی رشته **مهندسی بهداشت محیط** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۷** مقطع **دکتری** دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین 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 آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

امضا

تاریخ ۹۲/٤/۲٤

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های 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 ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل **رساله دکتری** نگارنده در رشته **مهندسی بهداشت محیط** است که در سال **۱۳۹۲** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **جناب آقای دکتر عباس رضایی** ، مشاوره **آقایان دکتر نعمت اله جعفرزاده حقیقی فرد و دکتر قاسمعلی محبعلی** از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ٤ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ٥ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه 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 ٤ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ٦ : اینجانب **سهند جرفی** دانشجوی رشته **مهندسی بهداشت محیط** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی

سهند جرفی

تاریخ و امضا

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

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

حذف پایرن از خاک های آلوده با کاربرد متوالی بیوسورفکتانت و پراکسید هیدروژن کاتالیز شده با نانوذرات آهن

نگارش

سهند جرفی

استاد راهنما

دکتر عباس رضایی

اساتید مشاور

دکتر نعمت اله جعفرزاده حقیقی فرد

دکتر قاسمعلی محبعلی

تابستان ۱۳۹۲

تقدیم به

به دوشمع فروزان زندگی من

پدر و مادر عزیز و مهربانم

و

همسر دوست داشتنیم

تشکر و قدردانی

از همه عزیزان و بزرگوارنی که در پیمودن مسیر دشوار تحصیل مرا یاری نموده اند کمال سپاس و قـدردانی را دارم. از استاد بزرگوار جناب آقای دکتر عباس رضایی که همواره راهنمای بنده در انجام امور آموزشی و پژوهشی بوده اند، صمیمانه سپاسگذاری می نمایم. از محبت های بـی دریـغ و راهنمـایی هـای ارزشـمند اساتید گرانقدر جناب آقای دکتر جعفرزاده و جنـاب آقـای دکتـر محبعلـی کمـال سـپاس را دارم. از همـه اساتیدی که به نحوی در آموزش و پیشرفت تحصیلی اینجانب نقش ایفا کرده و اینجانب را مشـمول لطـف خود نموده اند، آقایان دکتر غلامرضا موسوی، دکتر احمد جنیدی، دکتر علی خوانین، دکتر حسـن اصـیلیان، دکتر باقر مرتضوی، دکتر روشنک رضایی کلانتری، دکتر کامیار یغماییان، دکتر احمدرضا یزدانبخش و همـه بزرگوارنی که مجال نام بردن از آنها نیست خاضعانه قدردانی می نمایم.

از پدر و مادر عزیز و دوست داشتنیم که همواره چون کوهی استوار مشوق و پشتیبان من در همه مراحـل و تنگناهای زندگی ام بوده اند، صمیمانه سپاسگذاری نموده و بر دستان پر مهر ایشان بوسه می زنم. امید دارم سالیان پر شمار آتی را در راستای جبران محبت ها و بزرگواری هایشان گام بر درام. از فرزانـه عزیـزم کـه دوران پر فراز و نشیب تحصیل در مقطع دکتری را با حضور نوید بخش خود آسـان و محیطـی سرشـار از آرامش و عشق را برایم مهیا نمود قدردانی می نمایم. خواهر و برادران دلسوز و مهربانم سحر، سـارا، سـینا، سهیل، محمد و میوه های زندگی ایشان دانیال، میلاد و النا، همواره مدیون محبت ها، حمایت ها و دلگرمـی های بی دریغ شما خواهم بود و بهترین ها را برایتان آرزومندم.

چکیده

مقدمه و هدف: پایرن یکی از هیدروکربن های آروماتیک حلقوی چهار حلقه ای با زیست تجزیه پذیری ضعیف و پایداری بالا در محیط زیست است که در فهرست آلاینده های دارای اولویت سازمان حفاظت محیط زیست امریکا قرار دارد. هدف از این پژوهش تعیین قابلیت حذف پایرن از خاک با استفاده از بیوسورفکتانت و نیز کاربرد اکسیداسیون فنتون اصلاح شده بود.

روش مطالعه: باکتری های تجزیه کننده پایرن و تولید کننده بیوسورفکتانت پس از غربالگری محیطی از یک نمونه خاک آلوده به ترکیبات نفتی جداسازی شدند. همچنین یک سویه باکتریایی تولید کننده بیوسورفکتانت پس از بهینه سازی منبع کربن، منبع نیتروژن، نسبت کربن به نیتروژن، درصد شوری و pH به وسیله روش طراحی آزمایش های تاگوچی، برای تولید بیوسورفکتانت مورد استفاده قرار گرفت. اصلاح زیستی با استفاده از بیوسورفکتانت، سورفکتانت شیمیایی توئین ۸۰، نمونه های فاقد هرگونه سورفکتانت و شاهدهای شیمیایی و میکروبی در دو غلظت پایرن ۱۰۰ و mg/kg ۵۰۰ طی ۹ هفته صورت گرفت. همچنین اصلاح شیمیایی با استفاده از اکسیداسیون فنتون اصلاح شده در pH خنثی بر روی نمونه های خاک با غلظت پایرن mg/kg ۵۰۰ –۱۰۰ انجام شد. سپس یک مرحله اصلاح متوالی شیمیایی – زیستی در شرایط بهینه به دست آمده از مراحل قبل بر روی نمونه های خاک دارای آلودگی مصنوعی به غلظت های ۱۰۰، ۵۰۰ و mg/kg ۱۰۰۰ و یک نمونه خاک دارای آلودگی واقعی صورت پذیرفت.

نتایج: شرایط بهینه تولید بیوسورفکتانت به وسیله *سودوموناس آئروژینوزا* شامل منبع کربن روغن زیتون، منبع نیتروژن نیترات آمونیوم، نسبت کربن به نیتروژن ۵، شوری ۰/۵ درصد و pH برابر ۷ تعیین گردید. بازده حذف در غلظت پایرن اولیه ۱۰۰ و mg/kg ۵۰۰، زمان واکنش ٦٣ روز و کاربرد بیوسورفکتانت، به ترتیب ۹۱ و ٨٤/٦ درصد بود. شرایط بهینه اکسیداسیون فنتون اصلاح شده شامل غلظت پراکسید هیدروژن mM ۳۰۰، غلظت آهن mM ۳۰، زمان واکنش ٦ ساعت و عامل شلاته کننده سدیم پیروفسفات تعیین شد. بازده حذف پایرن با غلظت های اولیه mg/kg ۵۰۰ –۱۰۰ بین ۹۳ – ۳۹ درصد بود. اصلاح متوالی شیمیایی – زیستی در شرایط بهینه معرفی شده منجر به بازده حذف ۹۵، ٨٦ و ٦١ درصد برای غلظت های اولیه پایرن ۱۰۰، ۵۰۰ و mg/kg ۱۰۰۰ در خاک دارای آلودگی مصنوعی و ٦٤ درصد برای خاک دارای آلودگی واقعی گردید.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش می توان اظهار نمود که فرآیند اصلاح متوالی شیمیایی – زیستی با شرایط بهینه معرفی شده در این پژوهش می تواند به عنوان یک جایگزین کارامد، عملی، رقابتی و قابل قبول برای اصلاح خاک های آلوده به پایرن به شمار رود.

کلمات کلیدی: پایرن، آلودگی خاک، بیوسورفکتانت، اصلاح زیستی، اکسیداسیون فنتون اصلاح شده، نانوذرات آهن صفر ظرفیتی

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته	۱
۱-۱. مقدمه	۲
۱-۱-۱. سوالات اصلی تحقیق	٤
۱-۱-۲. اهداف پژوهش	٤
۱-۱-۳. فرضیه های پژوهش	٥
۱-۲. هیدروکربن های آروماتیک چندحلقه ای (PAHs)	٦
۱.۲.۱. منابع ورود PAHs به محیط	٦
۱-۲-۲. مسیرهای مواجهه به PAHs	۸
۱-۲-۳. مخاطرات بهداشتی PAHs	۹
۱-۲-٤. پایرن	۱۱
۱-۳. روش های اصلاح خاک های آلوده به هیدروکربن های نفتی	۱۲
۱-٤. اصلاح زیستی	۱٤
۱-٤-۱. قابلیت دسترسی زیستی	۱٤
۱-٤-۲. تجزیه زیستی	۱۷
۱-٤-۲-۱. مکانیزم شکستن حلقه بنزنی در هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه ای	۲۲
۱-٤-۳. فناوری های اصلاح زیستی	۲۳
۱-٤-۳-۱. کمپوست سازی و افزودن مواد کمپوست شده	۲٥
۱-٤-۳-۲. اصلاح الکتروزیستی	۲٦
۱-٤-۳-۳. اصلاح گیاهی به کمک جوامع میکروبی	۲٦
۱-٤-٤. مزایا و معایب تصفیه زیستی	۲۷
۱-٤-٥. عوامل مؤثر بر اصلاح زیستی	۲۹
۱-٤-٦. تجزیه پایرن	۳۰
۱-٥. سورفکتانت ها	۳٤
۱-٥-۱. مزایای بیوسورفکتانت ها	۳٦
۱-٥-۲. مکانیزم عمل سورفکتانت ها	۳۷
۱-٥-۳. ترکیب شیمیایی بیوسورفکتانت ها	۳۸
۱-٥-٤. کاربرد بیوسورفکتانت ها در اصلاح زیستی ترکیبات نفتی	٤٤
۱-٦. اصلاح شیمیایی	٤٦
۱-٦-۱. فنتون متداول و اصلاح شده	٤۷
۱-٦-۲. مکانیزم واکنش	٤۸
۱-٦-۳. عوامل مؤثر بر کارایی فرآیند فنتون	٥۰
۱-٦-۳-۱. عوامل اجرایی	٥۰
۱-٦-۳-۲. بافت خاک و واکنش های متقابل	٥۲
۱-٦-٤. تصفیه فنتون یکپارچه	٥٤
۱-٦-٤-۱. تصفیه زیستی – فنتون	٥٤
۱-٦-٥. اثرات زیست محیطی تصفیه به روش فنتون	٥٥

۱-۷. نانوذرات آهن صفر ظرفیتی	۵۷
۱-۷-۱. خصوصیات نانوذرات آهن صفر ظرفیتی	۵۷
۱-۷-۲. تجزیه آلاینده ها	۵۸
۱-۸. تاریخچه (مرور و نقد تحقیقات گذشته)	۵۹
فصل دوم: مواد و روش ها	٦۹
۲-۱. نمودار جریان انجام پژوهش	۷۰
۲-۲. جداسازی باکتری های تجزیه کننده پایرن	۷۲
۲-۲-۱. خاک	۷۲
۲-۲-۲. بذر میکروبی اولیه	۷۲
۲-۲-۳. محیط کشت نمکی	۷۲
۲-۳. تولید بیوسورفکتانت	۷۵
۲-۳-۱. تهیه بذر میکروبی جهت تولید بیوسورفکتانت	۷۵
۲-۳-۲. تعیین شرایط بهینه تولید بیوسورفکتانت	۷۷
۲-۳-۳. آزمون انحلال پذیری پایرن در محلول بیوسورفکتانت	۷۹
۲-٤. اصلاح زیستی خاک آلوده به پایرن	۸۰
۲-۵. اصلاح شیمیایی	۸۲
۲-۵-۱. مواد شیمیایی	۸۲
۲-۵-۲. آماده سازی خاک	۸۵
۲-۵-۳. اصلاح شیمیایی خاک به روش فنتون اصلاح شده	۸٦
۲-٦. اصلاح متوالی شیمیایی – زیستی	۸۸
۲-۷. روش های آزمایشگاهی	۸۹
۲-۷-۱. آزمایش شمارش میکروبی به روش MPN	۸۹
۲-۷-۲. آزمون جایگزینی نفت	۸۹
۲-۷-۳. استخراج و خالص سازی بیوسورفکتانت	۹۰
۲-۷-٤. اندازه گیری غلظت بحرانی میسل (CMC)	۹۳
۲-۷-۵. شناسایی باندهای جذبی محلول حاوی بیوسورفکتانت	۹٤
۲-۷-٦. تعیین پایداری بیوسورفکتانت	۹٤
۲-۷-۷. تعیین بازده تولید بیوسورفکتانت با استفاده از تست رامنوز	۹٤
۲-۷-۸ .استخراج پایرن	۹۵
۲-۷-۹. سنجش پایرن	۹٦
۲-۷-۱۰. تعیین خصوصیات خاک	۹۷
۲-۷-۱۱: شناسایی باکتری ها	۹۹
۲-۸. تعیین درجه واکنش ها	۹۹
۲-۹. مواد	۱۰۳

فهرست مطالب

فصل سوم: نتایج و یافته‌ها	۱۰۵
۳-۱. باکتری های تجزیه کننده پایرن	۱۰۶
۳-۲. تولید بیوسورفکتانت	۱۰۸
۳-۲-۱. گونه باکتریایی *سودوموناس آئروژینوزا* تولید کننده بیوسورفکتانت	۱۰۸
۳-۲-۲. اثر مجزای هر یک از عوامل بر تولید بیوسورفکتانت	۱۱۰
۳-۲-۳. اثرات متقابل عامل ها	۱۱۳
۳-۲-٤. آنالیز واریانس (ANOVA)	۱۱۵
۳-۲-۵. شرایط بهینه و آزمون تأییدی	۱۱۶
۳-۲-٦. تغییرات رشد باکتریایی و تولید بیوسورفکتانت	۱۱۷
۳-۲-۷. اندازه گیری غلظت CMC	۱۱۸
۳-۲-۸. مطالعات پایداری بیوسورفکتانت	۱۲۰
۳-۲-۹. نوع بیوسورفکتانت تولیدی	۱۲۲
۳-۲-۱۰. نقش سورفکتانت ها در افزایش انحلال پذیری پایرن	۱۲۵
۳-۳. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک	۱۲۵
۳-٤. اصلاح زیستی خاک های آلوده به پایرن	۱۲۷
۳-٤-۱. بازده حذف پایرن در نمونه های حاوی بیوسورفکتانت با غلظت آلودگی ۱۰۰ mg/kg	۱۲۸
۳-٤-۲. بازده حذف پایرن در نمونه های حاوی توئین ۸۰ با غلظت آلودگی ۱۰۰ mg/kg	۱۲۹
۳-٤-۳. بازده حذف پایرن در نمونه های فاقد سورفکتانت با غلظت آلودگی ۱۰۰ mg/kg	۱۳۰
۳-٤-٤. بازده حذف پایرن در شاهد های شیمیایی با غلظت آلودگی ۱۰۰ mg/kg	۱۳۱
۳-٤-۵. بازده حذف پایرن در نمونه های حاوی بیوسورفکتانت با غلظت آلودگی ۵۰۰ mg/kg	۱۳۳
۳-٤-٦. بازده حذف پایرن در نمونه های حاوی توئین ۸۰ با غلظت آلودگی ۵۰۰ mg/kg	۱۳٤
۳-٤-۷. بازده حذف پایرن در نمونه های فاقد سورفکتانت با غلظت آلودگی ۵۰۰ mg/kg	۱۳۵
۳-٤-۸. بازده حذف پایرن در شاهد های شیمیایی و میکروبی با غلظت آلودگی ۵۰۰ mg/kg	۱۳٦
۳-٤-۹. مقایسه بازده حذف پایرن در نمونه های مختلف دارای آلودگی ۱۰۰ mg/kg	۱۳۸
۳-٤-۱۰. مقایسه بازده حذف پایرن در نمونه های مختلف دارای آلودگی ۵۰۰ mg/kg	۱۳۸
۳-۵. اصلاح شیمیایی خاک آلوده به پایرن با استفاده از فرآیند فنتون اصلاح شده	۱٤۰
۳-۵-۱. تعیین غلظت بهینه پراکسید هیدروژن و نانو ذرات آهن صفر	۱٤۰
۳-۵-۲. تعیین غلظت بهینه نانو ذرات آهن صفر	۱٤۰
۳-۵-۳. تعیین اثر زمان واکنش بر بازده حذف پایرن	۱٤۱
۳-۵-٤. تعیین اثر عامل شلاته کننده	۱٤۲
۳-۵-۵. تعیین اثر سن آلودگی بر بازدهی اکسیداسیون فنتون اصلاح شده	۱٤٤
۳-٦. تعیین نوع واکنش تجزیه شیمیایی پایرن در خاک به روش فنتون اصلاح شده	۱٤۵
۳-۷. اصلاح متوالی شیمیایی – زیستی خاک های آلوده به پایرن	۱٤۷
۳-۷-۱. حذف پایرن	۱٤۷

فهرست مطالب

۳-۷-۲. متابولیت های حدواسط پس از اصلاح شیمیایی جزئی	۱٤۹
۳-۷-۳. متابولیت های حدواسط پس از اصلاح متوالی شیمیایی – زیستی	۱۵۱
۳-۸. اصلاح شیمیایی – زیستی نمونه خاک واقعی	۱۵۲
۳-۹. مقایسه بازده حذف پایرن پس اعمال شرایط آزمایشگاهی مختلف	۱۵۳
فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها	۱۵٤
٤-۱. بحث	۱۵۵
٤-۱-۱. تولید بیوسورفکتانت	۱۵۵
٤-۱-۲. تجزیه زیستی پایرن	۱٦۲
٤-۱-۳. تجزیه شیمیایی پایرن به روش فنتون اصلاح شده	۱٦۹
٤-۱-٤. اصلاح متوالی شیمیایی – زیستی	۱۷٦
٤-۲. آزمون فرضیات	۱۸۰
٤-۳. پیشنهاداتی برای مطالعات آتی	۱۸۱
٤-٤. نتیجه گیری	۱۸۲
فهرست منابع	۱۸٤
چکیده انگلیسی	۱۹٦

فهرست جداول

جدول ۱-۱: برآورد انتشار سالانه PAH در کشورهای مختلف	۸
جدول ۱-۲: انواع PAH سمی و دارای اولویت بر مبنای فهرست USEPA	۱۰
جدول ۱-۳: مشخصات فیزیکی و شیمیایی پایرن	۱۲
جدول ۱-٤: فرآیندهای اصلاح خاک های آلوده به هیدروکربن های نفتی	۱۳
جدول ۱-۵: کاربرد میدانی فناوری های منتخب اصلاح زیستی	۲٤
جدول ۱-٦: عوامل مؤثر بر اصلاح زیستی آلاینده های آلی درآب و خاک	۲۹
جدول ۱-۷: برخی از مهمترین بیوسورفکتانت ها و میکروارگانیزم های تولید کننده آن ها	٤۱
جدول ۱-۸: بازده تولید و ترکیب شیمیایی EPS تولیدی از *هالوموناس یوریهلینا*	٤۳
جدول ۱-۹: فعالیت امولسیون کنندگی EPS تولیدی از *هالوموناس یوریهلینا*	٤٤
جدول ۲-۱: ترکیب محیط کشت معدنی جهت غنی سازی باکتری های تجزیه کننده پایرن	۷۳
جدول ۲-۲: ترکیب محلول عناصر جزئی برای غنی سازی باکتری های تجزیه کننده پایرن	۷٤
جدول ۲-۳: دانسیته باکتریایی بذر میکروبی تلقیح شده برای تولید بیوسورفکتانت با دانسیته اپتیکی ۱ نانومتر	۷٦
جدول ۲-٤: عوامل و سطح آنها برای بهینه سازی تولید بیوسورفکتانت	۷۸
جدول ۲-۵: آرایه L_{16} برای شماره های آزمایشی ۱٦ گانه مورداستفاده برای بهینه سازی تولید بیوسورفکتانت	۷۸
جدول ۲-٦: کد های شناسایی و تعداد نمونه های مورد آزمایش خاک آلوده در شرایط مختلف	۸۱
جدول ۲-۷: خصوصیات نانوذرات آهن صفر ظرفیتی	۸۳
جدول ۲-۸: مراحل بهینه سازی و انجام آزمایش های اصلاح شیمیایی به روش فنتون اصلاح شده	۸۷
جدول ۲-۹: فهرست مواد مورد استفاده در پژوهش و شرکت سازنده آن ها	۱۰۳
جدول ۳-۱: نتایج آزمون جایگزینی قطره نفت بر روی روآب سویه های جداسازی شده به منظور تولید بیوسورفکتانت	۱۰۹
جدول ۳-۲: اثرات اصلی در سطوح تعریف شده برای هر عامل	۱۱۱
جدول ۳-۳: اثر متقابل دو عامل مجزا بر حسب شاخص شدت	۱۱٤
جدول ۳-٤: آنالیز واریانس (ANOVA)	۱۱۵
جدول۳-۵: شرایط بهینه تولید بیوسورفکتانت	۱۱۷
جدول ۳-٦: معرفی نوع باندهای طیف مادون قرمز بیوسورفکتانت تولیدی	۱۲٤
جدول ۳-۷: مشخصات فیزیکی و شیمیایی نمونه خاک مورد استفاده در پژوهش	۱۲۷
جدول ۳-۸: کدهای شناسایی نمونه های اصلاح زیستی پایرن در خاک آلوده	۱۲۷
جدول ۳-۹: بازده حذف پایرن پس از اصلاح متوالی شیمیایی – زیستی	۱٤۸
جدول ۳-۱۰: نمونه هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در نمونه خاک دارای آلودگی طبیعی	۱۵۲

فهرست جداول

جدول ۳-۱۱: مقایسه نتایج بازده حذف پایرن در شرایط آزمایشگاهی مختلف	۱۵۳
جدول٤-۱: مقایسه غلظت CMC بیوسورفکتانت تولیدی با مطالعات مشابه	۱٦۰
جدول ٤-۲: بازده تولید بیوسورفکتانت در مطالعات مشابه	۱٦۲
جدول ٤-۳: مقایسه نتایج مطالعات مختلف اصلاح متوالی شیمیایی – زیستی	۱۷۹

فهرست شکل ها

شکل ۱-۱: آرایش حلقه های بنزنی در ملکول پایرن	۱۲
شکل ۱-۲: واکنش‌های اولیه اکسیداسیون تجزیه میکروبی هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه ای	۲۰
شکل ۱-۳: واکنش‌های آنزیم‌های اکسیژنازو و دی هیدروژناز در اکسیداسیون باکتریایی ترکیبات آروماتیک)	۲۲
شکل ۱-٤: مسیرهای تجزیه باکتریایی پایرن به وسیله گونه های باکتریایی جداسازی شده	۳۲
شکل ۱-۵: ساختار شیمیایی (A) رامنولیپید به عنوان ملکولی با وزن ملکولی پایین و (B) امولسان به عنوان ملکولی با وزن ملکولی بالا	٤۲
شکل ۲-۱: نمودار جریان پژوهش	۷۱
شکل ۲-۲: تغییرات رشد باکتریایی در ارلن مایرهای حاوی محیط کشت بافر نمکی فسفاته برای جداسازی باکتری های تجزیه کننده پایرن در طول زمان گرماگذاری	۷٤
شکل ۲-۳: نمایی از شیکر حاوی ارلن های خاک آلوده در حال اصلاح زیستی	۸۲
شکل ۲-٤: نمونه نانوذرات آهن مورد استفاده	۸۳
شکل ۲-۵: تصویر میکروسکوپ الکترونی از نمونه نانوذرات آهن صفر ظرفیتی	۸٤
شکل ۲-٦: آنالیز XRD نمونه نانوذرات آهن صفر ظرفیتی	۸۵
شکل۲-۷: نمایی از محیط کشت مایع سانتریفوژ شده برای جداسازی سلول های باکتریایی	۹۱
شکل ۲-۸: تصاویری از ارلن مایر های آماده استخراج بیوسورفکتانت پس از سانتریفوژ، تنظیم pH بر روی ۲ و ۲٤ ساعت نگهداری در دمای ٤ درجه سانتیگراد	۹۱
شکل ۲-۹: نماهایی از استخراج بیوسورفکتانت تولیدی بر روی دستگاه تقطیر در خلاء	۹۲
شکل ۲-۱۰: تصویر تنسیومتر مورد استفاده برای اندازه گیری کشش سطحی محلول ها	۹۳
شکل ۲-۱۱: منحنی کالیبراسیون جذب گلوکز	۹۵
شکل ۲-۱۲: منحنی کالیبراسیون سنجش پایرن به وسیله دستگاه گازکروماتوگرافی	۹۷
شکل ۲-۱۳: دستگاه کروماتوگرافی گازی مورد استفاده برای سنجش پایرن	۹۷
شکل ۲-۱٤: دستگاه مورد استفاده برای انجام آنالیز XRD	۹۸
شکل ۲-۱۵: دستگاه مورد استفاده برای انجام آنالیز XRF	۹۸
شکل ۳-۱: گونه باکتریایی خالص *P1*	۱۰٦
شکل ۳-۲: گونه باکتریایی خالص *P2*	۱۰۷
شکل ۳-۳: گونه باکتریایی *P3*	۱۰۷
شکل ۳-٤: گونه باکتریایی خالص *P4*	۱۰۸
شکل ۳-۵: نتیجه آزمون جایگزینی قطره نفت بر روی باکتری خالص O	۱۰۹
شکل ۳-٦: گونه باکتریایی *سودوموناس آئروژینوزا* به عنوان گونه خالص تولید کننده بیوسورفکتانت	۱۱۰

فهرست شکل ها

شکل۳-۷: میانگین اثر و مقادیر تجربی به دست آمده برای هر یک از عوامل مورد بررسی در بهینه سازی تولید بیوسورفکتانت بر مبنای روش طراحی آزمایش های تاگوچی ۱۱۳

شکل ۳-۸: مقایسه درصد سهم هر یک عوامل درتولید بیوسورفکتانت بر مبنای روش طراحی آزمایش های تاگوچی ۱۱٦

شکل۳-۹: تغییرات زمانی رشد سلولی، تغییرات کشش سطحی به عنوان تابعی از تولید بیوسورفکتانت ۱۱۸

شکل ۳-۱۰: تغییرات کشش سطحی محلول حاوی سورفکتانت در غلظت های مختلف سورفکتانت برای تعیین غلظت CMC (الف) رامنولیپید و ب) سدیم دودسیل سولفات ۱۱۹

شکل ۳-۱۰: تغییرات کشش سطحی محلول حاوی سورفکتانت در غلظت های مختلف سورفکتانت برای تعیین غلظت CMC (الف) رامنولیپید و ب) سدیم دودسیل سولفات ۱۲۰

شکل ۳-۱۱: پایداری سورفکتانت ها در محدوده pH ۱۰ -٤ به منظور تعیین پایداری سورفکتانت در شرایط pH مختلف ۱۲۱

شکل ۳-۱۲: پایداری سورفکتانت ها در دماهای ۱۲۰ – ۰ درجه سانتیگراد به منظور تعیین پایداری سورفکتانت در شرایط دمایی مختلف ۱۲۲

شکل ۳-۱۳: آنالیز FTIR نمونه بیوسورفکتانت تولیدی در محدوده cm^{-1} ٤۰۰۰ -۵۰۰ ۱۲۳

شکل ۳-۱٤: تغییرات غلظت پایرن واجذب شده در غلظت های بیوسورفکتانت mg/L ۲٤۰ – ٦۰ ۱۲۵

شکل ۳-۱۵: الف) آنالیز دانه بندی خاک مورد استفاده در پژوهش، ب) آنالیز XRD بر نمونه خاک مورد استفاده در پژوهش ۱۲٦

شکل ۳-۱٦: بازده حذف پایرن در برابر تغییرات دانسیته باکتریایی در خاک دارای آلودگی mg/kg ۱۰۰ و حاوی بیوسورفکتانت رامنولیپید ۱۲۸

شکل ۳-۱۷: بازده حذف پایرن در برابر تغییرات دانسیته باکتریایی در خاک دارای آلودگی mg/kg ۱۰۰ و حاوی سورفکتانت شیمیایی توئین ۸۰ ۱۲۹

شکل ۳-۱۸: بازده حذف پایرن در برابر تغییرات دانسیته باکتریایی در خاک دارای آلودگی mg/kg ۱۰۰ و فاقد سورفکتانت ۱۳۱

شکل ۳-۱۹: بازده حذف پایرن در شاهد شیمیایی با غلظت آلودگی mg/kg ۱۰۰ ۱۳۲

شکل ۳-۲۰: بازده حذف پایرن در شاهد میکروبی با غلظت آلودگی mg/kg ۱۰۰ ۱۳۳

شکل ۳-۲۱: بازده حذف پایرن در برابر تغییرات دانسیته باکتریایی در خاک دارای آلودگی mg/kg ۵۰۰ و حاوی بیوسورفکتانت رامنولیپید ۱۳٤

شکل ۳-۲۲: بازده حذف پایرن در برابر تغییرات دانسیته باکتریایی در خاک دارای آلودگی mg/kg ۵۰۰ و حاوی سورفکتانت شیمیایی توئین ۸۰ ۱۳۵

شکل ۳-۲۳: بازده حذف پایرن در برابر تغییرات دانسیته باکتریایی در خاک دارای آلودگی mg/kg ۵۰۰ و فاقد سورفکتانت ۱۳٦

فهرست شکل ها

شکل ۳-۲٤: بازده حذف پایرن در شاهد شیمیایی با غلظت آلودگی ۵۰۰ mg/kg	۱۳۷
شکل ۳-۲۵: مقایسه بازده نهایی حذف پایرن در نمونه های حاوی غلظت پایرن اولیه mg/kg ۱۰۰ و بیوسورفکتانت، سورفکتانت شیمیایی، فاقد سورفکتانت و شاهد شیمیایی	۱۳۸
شکل ۳-۲٦: مقایسه بازده نهایی حذف پایرن در نمونه های حاوی غلظت پایرن اولیه mg/kg ۵۰۰ و بیوسورفکتانت، سورفکتانت شیمیایی، فاقد سورفکتانت و شاهد شیمیایی	۱۳۹
شکل۳-۲۷: تغییرات بازده حذف پایرن در غلظت های mM ۵۰۰-۰ پراکسید هیدروژن، زمان واکنش ۳۰ دقیقه، pH برابر ۳ و غلظت نانو ذرات آهن ۵ mM	۱٤۰
شکل ۳-۲۸: تغییرات بازده حذف پایرن در غلظت بهینه پراکسید هیدروژن ۳۰۰ mM، غلظت های نانو ذرات آهن ٦۰-۵ mM، زمان واکنش ۳۰ دقیقه و pH برابر ۳	۱٤۱
شکل ۳-۲۹: اثر زمان بر بازده حذف پایرن در غلظت های بهینه پراکسید هیدروژن (۳۰۰ mM) و نانوذرات آهن (۳۰ mM)، pH برابر ۳ و زمان واکنش متغیر ۰/۵ تا ۲٤ساعت	۱٤۲
شکل۳-۳۰: اثر عامل شلاته کننده بر حذف پایرن به روش اکسیداسیون فنتون در pH خنثی، غلظت پراکسید هیدروژن ۳۰۰ mM، غلظت نانوذرات آهن ۳۰ mM و زمان واکنش ٦ ساعت	۱٤۳
شکل ۳-۳۱: بازده حذف پایرن در pH خنثی، حضور عامل شلاته کننده سدیم پیروفسفات، غلظت پراکسید هیدروژن ۳۰۰ mM، غلظت نانواکسیدهای آهن ۳۰ mM، زمان واکنش ٦ ساعت و غلظت های اولیه متغیر	۱٤٤
شکل ۳-۳۲: نوع واکنش اکسیداسیون فنتون اصلاح شده پایرن در خاک با غلظت اولیه mg/kg ۱۰۰	۱٤٦
شکل ۳-۳۳: نوع واکنش اکسیداسیون فنتون اصلاح شده پایرن در خاک با غلظت اولیه mg/kg ۵۰۰	۱٤٦
شکل ۳-۳٤: مقایسه زمان دستیابی به غلظت های پایرن کمتر از ٤۰ mg/kg پس از اصلاح شیمیایی	۱٤۹
شکل ۳-۳۵: متابولیت های حدواسط تولیدی پس از اکسیداسیون جزئی شیمیایی به مدت ۲ ساعت، غلظت پراکسید هیدروژن و نانوذرات آهن به ترتیب ۳۰۰ و ۳۰ میلی مول، pH خنثی و عامل شلاته کننده سدیم پیروفسفات. الف: پیش از اکسیداسیون، ب) پس از اکسیداسیون فنتون اصلاح شده	۱۵۰
شکل ۳- ۳٦: متابولیت های واسطه پس از اصلاح شیمیایی به مدت ۲ ساعت، غلظت پراکسیدهیدروژن و نانوذرات آهن به ترتیب ۳۰۰ و ۳۰ میلی مول، pH خنثی و عامل شلاته کننده سدیم پیروفسفات و اصلاح زیستی متوالی با کاربرد بیوسورفکتانت	۱۵۱
شکل ۳-۳۷: آنالیز کروماتوگرافی جرمی نمونه خاکی دارای آلودگی طبیعی	۱۵۲

فصل اول

مقدمه و
مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱. مقدمه

بسیاری از مواد نامطلوبی که وارد طبیعت و محیط زیست می شوند، به عنوان آلاینده طبقه بندی می گردند. اثرات مضر و تخریب های حاصل از این آلاینده ها به آلودگی ختم می شود که طی آن یک منبع طبیعی یا مصنوعی کاربری مناسب خود را از دست می دهد. در اغلب موارد این آلودگی حاصل فعالیت های انسان است. آلودگی ها از زمان های دیرین و از زمان حیات بشر بر روی کره زمین وجود داشته اند. [۱]. با توجه به دوره پیش صنعتی شدن، صنعتی شدن و استفاده گسترده از مواد شیمیایی نظیر نفت خام، هیدروکربن های خطی، آروماتیک، آروماتیک چند حلقه ای (PAHs)[1]، بنزن، تولوئن، اتیل بنزن و زایلن[2]، هیدروکربن های کلرینه نظیر پلی کلرینه بی فنیل (PCBs)، تری کلرواتیلن (TCE) و پرکلرواتیلن، ترکیبات نیتروآروماتیک و ترکیبات ارگانو فسفره)، حلال ها، آفت کش ها و فلزات سنگین آلودگی های محیطی مختلفی پدید آمده است. امروزه آلودگی مقیاس وسیع ناشی از مواد شیمیایی مصنوعی و تا حدودی مواد طبیعی به یک نگرانی جهانی تبدیل شده است. نشت و جریان های مایع ناشی از ماهیت سیال و چرخه پیوسته فراریت و میعان بسیاری از آلاینده های شیمیایی آلی نظیر آفت کش ها حتی منجر به حضور آنها در باران، برف و مه شده است. در هر سال حدود ۸/۸ – ۱/۷ میلیون تن متریک نفت وارد آب های جهانی می شود. بیش از ۹۰ درصد این آلودگی نفتی به طور مستقیم به دلیل حوادثی است که از فعالیت ها و سهل انگاری های انسان شامل دفع عمدی مواد زائد ناشی می گردند [۱]. PAHs با توجه به منبع آلودگی شامل احتراق سوخت های

[1] - Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
[2] - BTEX

فسیلی، گازی یا مایع کردن ذغال سنگ، واکنش های متقابل زائدات و فرآیندهای تصفیه چوب در سطوح متغیر µg/kg ۱ تا g/kg ۳۰۰ خاک مشاهده می شوند [۲]. احتراق ناقص مواد آلی در حدود ۱۰۰ PAHs مختلف منتشر می نماید که در همه جا یافت می شوند. به استثنای PAHs جدید مورد استفاده در داروها، رنگ ها، پلاستیک ها و آفت کش ها، این عوامل به ندرت کاربرد صنعتی دارند. برخی از PAHs و اپوکسیدهای آنها حتی برای میکروارگانیزم ها نیز به شدت سمی و جهش زا هستند. آژانس حفاظت محیط زیست امریکا، در حدود شش PAHs را در میان ۱۲٦ آلاینده اول (مهم تر) دارای اولویت اعلام نموده است. در بسیاری از موارد، اثرات زیست محیطی این مواد شیمیایی آلی بیش از مزایای آنها برای انسان بوده و تجزیه آنها پس از استفاده موردنظر ضروری است. تغییر و تبدیل میکروبی ممکن است نیازمند صرف انرژی یا سمیت زدایی از آلاینده بوده یا موفقیت آن ماهیتاً شانسی و احتمالی باشد. به دلیل ماهیت فراگیر میکروارگانیزم ها، تعداد آنها و جرم سلولی انبوه مربوط به سایر ارگانیزم های زنده در کره زمین، تنوع گسترده و قابلیت های کاتابولیکی آنها و قابلیت کارکرد حتی در شرایط غیاب اکسیژن و سایر شرایط نامساعد محیطی، تحقیقات در مورد میکروارگانیزم های تجزیه کننده آلاینده ها، آگاهی از ژنتیک و بیوشیمی آنها و توسعه روش هایی به منظور استفاده از آنها به یک موضوع بسیار حائز اهمیت برای محققان تبدیل شده است [۱]. پیشرفت های اخیر در مهندسی ژنتیک و شناسایی کامل توالی ژنوم، دریچه های جدیدی را برای کاوش ژن های بدیع تجزیه کننده آلاینده و عناصر نظام مند آن برای میکروارگانیزم های محیطی قابل کشت و غیرقابل کشت گشوده است [۳]. در مقایسه با سایر روش های فیزیکو – شیمیایی تجزیه کننده آلاینده های آلی، میکروارگانیزم ها به دلیل دوستدار محیط زیست بودن عوامل ارجح هستند. قابلیت های آنها در تجزیه ترکیبات آلی شیمیایی می تواند برای کاهش حجم آلودگی های محیطی بکار رود. اصلاح زیستی[1] به عنوان فرآیندی تعریف می شود که در آن از میکروارگانیزم ها، گیاهان سبز یا آنزیم های آنها برای تصفیه مکان های آلوده و بازیابی مجدد شرایط اولیه آنها استفاده می شود. اصلاح

[1]- Bioremediation