

بررسی تأثیر شوینده های زیستی تولید شده در فرایند اصلاح زیستی بر انتقال و حذف آلودگی ها در خاک آلوده نفتی

حسین گنجی دوست^۱، احسان مرادآبادی^۲، سهیلا جوادیان^۳

چکیده

در این تحقیق شوینده های زیستی تولید شده در فرایند اصلاح زیستی و تاثیر آنها بر انتقال و حذف آلودگی نفتی از خاک مورد بررسی قرار گرفته است. از ۸۸ ارلن ۱۰۰cc حاوی دوغاب خاک کائولینیت آلوده به ۱۰۰۰۰ppm و ۵۰۰۰۰ppm نفت خام به عنوان راکتور استفاده گردید. در تجزیه زیستی از میکروارگانیسمهای کشت مخلوط جدا شده از خاک آلوده اطراف تهران استفاده شد. با بررسی نتایج فرایند اصلاح زیستی در طی بیست روز نشان داده شد که تولید شوینده های زیستی بوسیله میکروارگانیسمها باعث واجدبی و انحلال ترکیبات آبگریز نفتی از خاک شده و سبب افزایش کارایی فرایند اصلاح زیستی می گردند. با توجه به خاک انتخاب شده، تکان خوردن ظروف و همچنین هوادهی تقریباً هیچ تاثیری در حذف آلودگیهای نفتی نداشته و یا تاثیر آنها ناچیز است. با بررسی کل فرایند اصلاح زیستی در این تحقیق می توان نتیجه گرفت که ۱۹ درصد از حدوداً ۴۰ درصد کل حذف نفت خام در خاک آلوده به ۵۰۰۰۰ppm آلودگی مربوط به نقش شوینده های زیستی تولید شده توسط میکروارگانیسمها و واجدبی و انتقال نفت خام توسط آنها است. این مورد در نمونه های ۱۰۰۰۰ ppm در حدود ۷ درصد است.

کلمات کلیدی

شوینده ها، شوینده های زیستی، اصلاح زیستی خاکهای آلوده نفتی، خاکشویی

Study on Mobilization and Desorption Effects of Biosurfactant Produced in Biodegradation of Hydrocarbon-Contaminated Soils

Ehsan Moradabadi, Hosein Ganjidoost, Soheila Javadian

ABSTRACT:

This study considers mobilization and desorption effects of biosurfactant produced in biodegradation of hydrocarbon-contaminated soils. 88 erlens with 100cc volume containing slurry contaminated kaolinite soil with 10000ppm and 50000ppm crude oil concentrations used as reactors. Mixed culture microorganisms were isolated from contaminated soils collected from Tehran refinery with total petroleum hydrocarbon then cultured in mineral solution. Results indicated that production of biosurfactant by microorganism cause to desorption and mobilization of hydrophobic hydrocarbon compounds. Further more shaking and aeration have been negligible effect on desorption and mobilization. Results also have shown that 19% of total reduction of TPH (about 40%) in twenty days concerns biosurfactant effects for 50000ppm samples. This effect is about 7% for 10000ppm samples.

KEY WORDS

Bioremediation, Soil washing, Surfactant, Biosurfactant

^۱ استاد گروه مهندسی عمران - مهندسی محیط زیست دانشکده فنی - مهندسی دانشگاه تربیت مدرس h-ganji@modares.ac.ir

^۲ کارشناس ارشد مهندسی عمران - مهندسی محیط زیست دانشگاه تربیت مدرس ir.moradabadi@modares.ac.ir

^۳ استادیار گروه شیمی - دانشکده علوم پایه - دانشگاه تربیت مدرس javadian_s@modares.ac.ir



[۲]، [۳]، [۴]. بار منفی موجود در خاک رس باعث جذب شوینده‌های کاتیونی و غیریونی خواهد شد که در نهایت باعث کاهش غلظت مونومرهای رشته ای و کاهش حلالیت آلودگیها می‌گردد [۵]. شوینده های آنیونی توسط Mg^{2+} و Ca^{2+} موجود در خاک معدنی ترکیب می‌شوند، ولی شوینده های غیر یونی نسبت به موارد دیگر کمتر جذب خاک شده و در نتیجه برای اصلاح خاک مناسب ترمی‌باشند [۶]. گفتنی است که شوینده های زیستی غیر یونی نسبت به موارد سنتزی بسیار موثرتر می‌باشند [۵]. نحوه رفتار دو مایع ناسازگار نظیر آب و نفت که تشکیل امولسیون می‌دهند، در بحث پاکسازی خاکهای آلوده شده به ترکیبات نفتی بسیار حائز اهمیت است. وقتی یکی از این دو مایع داخل مایع دیگر پخش می‌شود، قطرات کوچکی ایجاد می‌شوند که دارای سطح تماس بسیار بالایی با آب بوده و از اینرو انرژی آزاد بین سطحی قابل توجهی را در سیستم بوجود می‌آورند. چنانچه دو مایع خالص باشند، قطرات به سرعت از بین رفته و دو مایع بصورت عمودی بر روی یکدیگر تشکیل دو لایه با سطح تماس کاملاً واضحی را می‌دهند. در این حالت سطح تماس دو فاز، در کوچکترین میزان خواهد بود و چنانچه شوینده افزوده شود، کشش بین سطحی کاهش یافته و حالت پیوستگی مواد کم می‌شود [۷]. در این حالت چنانچه مخلوط بدست آمده بوسیله اختلاط با هوا پراکنده شود، شوینده ها جذب لایه حد فاصل بین هوا و مایع شده و بصورت کف تثبیت می‌شوند [۸]. زمانی که هیدروکربنهای نفتی وارد خاک می‌شوند به دلیل آبگریزی شدید، با تشکیل باندهای محکم به خاک می‌چسبند بطوریکه شستشوی آنها با آب غیر ممکن می‌گردد. اما وقتی که شوینده های زیستی به خاک اضافه می‌شوند در مجموعه‌ای بنام میسل به نحوی تجمع می‌یابند که سرهای آبدوست یا قطبی آنها بسمت خارج و دمهای آبگریز آنها بسمت داخل قرار دارند. در این حالت هیدروکربنهای آبگریز در هسته این میسلها قرار گرفته و در مجموع بصورت یک کلئید آبدوست در می‌آیند و از سطح خاک جدا می‌شوند. چنانچه غلظت شوینده های زیستی (مونومرهای اولیه) بیشتر گردد، کلئیدهای مزبور حتی بصورت محلول در می‌آیند. بیوسورفاکتانتهایی که بوسیله میکرواورگانیزمها تولید می‌شوند بوسیله دو مکانیسم اصلی زیر حذف ترکیبات نفتی از خاک را تقویت می‌نمایند [۹]، [۱۰]، [۱۱]:

۱- به حرکت درآوردن ذرات نفتی^۲ (تحریک ذرات)

۲- انحلال ترکیبات نفتی در آب^۲

مکانیسم تحریک معمولاً در غلظتهای کمتر از غلظت بحرانی شوینده های زیستی رخ می‌دهد. پدیده هایی که در این مکانیسم

از سال ۱۹۷۰، باشناخت روشهای آشکارسازی مواد با دقت ppm (و امروزه ppb)، شناسایی آلودگی های آلی در آب و خاک میسر شده است [۱]. بسیاری از آلودگیهای ایجاد شده در خاک، ناشی از تخلیه یا نشت مواد آلی، حاصل از تمیز کردن تجهیزات یا ضایعات باقیمانده در ظروف حمل یا مواد تاریخ مصرف گذشته می‌باشد. از منابع دیگر تولید ضایعات می‌توان به محلهای دفن ضایعات و بطله های مواد که به شکل مناسب مدیریت نشده باشند، مؤسسات خدماتی و تعمیرگاههای اتومبیل، کارگاههای صنعتی و غیر صنعتی و لابراتوارهای عکاسی اشاره کرد. ضایعات خانگی شامل سموم، محصولات رنگی، پاک کننده ها و مایعات مربوط به سرویس خودروها از منابع دیگر تولید ضایعات آلی محسوب می‌گردند. سودمندی و اهمیت شوینده ها در زندگی روزمره بر کسی پوشیده نیست. برای هدف قرار دادن اورگانهای سرطانی بدن، شوینده ها به عنوان حمل کننده داروها مورد استفاده قرار می‌گیرند. شوینده‌ها همچنین به عنوان معلق کننده در فرایند شستشوی خاکهای آلوده به مواد نفتی یا فلزات سنگین مورد استفاده قرار می‌گیرند. آنها در فرایند استخراج مواد در معادن و نیز صنایع غذایی کاربرد دارند. با این همه، شوینده ها نیز مانند بسیاری از ساخته های بشر، مخرب محیط زیست و تاحدودی سمی می‌باشند. از جایگزینهای مناسب این مواد با خواصی مشابه با آنها دارند و معایب به مراتب کمتر، شوینده های زیستی می‌باشند. بسیاری از شوینده ها، شناخته شده بعنوان شوینده زیستی، توسط مخمرها یا باکتریها از مواد مغذی مختلف شامل، شکر، نفت، آلکانها و زباله ها بدست می‌آیند. شوینده های زیستی شامل گروههای گلیکو لیپیدها، لیپو پپیدها، فسفو لیپیدها، اسیدهای چرب، چربیهای طبیعی، پلیمرها و ترکیبات ذره ای دیگر می‌باشد. بسیاری از این ترکیبات غیر یونی یا خنثی می‌باشند فقط تعداد کمی از آنها کاتیونی می‌باشند. CMC^۱ شوینده های زیستی بصورت کلی از ۱ تا ۲۰۰ mg/L می‌باشد و جرم مولکولی آنها از ۵۰۰ تا ۱۵۰۰ داتسون می‌باشد. این شوینده ها به صورت بالقوه سودمندیهای قابل رقابتی باشوینده های سنتز شده، بخصوص در تجزیه پذیری و سمیت دارند. به عنوان مثال گلیکو لیپیدهای حاصل از رادوکوکوس ۴۱۳۸، ۵۰٪ سمیت کمتری نسبت به Tween۸۰ در آزمایش حلالیت نفتالین دارد. خاک رس و مواد هوموسی تاثیر شوینده ها (چه سنتزی و چه زیستی) را در روشهای اصلاح و تصفیه خاک و آبهای زیرزمینی در محل کاهش می‌دهند [۱].



بوجود می‌آیند، کاهش کشش‌های سطحی و بین سطحی، کاهش نیروی موئینگی، رطوبت پذیری و افزایش زاویه تماس می‌باشند. در این مکانیسم (در غلظت‌های کمتر از CMC) شوینده‌ها باعث کاهش کشش‌های سطحی و بین سطحی بین فازهای هوا-آب، نفت-آب و خاک-آب می‌گردند. شوینده‌هایی که با سطح بین دو فاز خاک و نفت در تماس هستند، زاویه تماس را افزایش داده و از سوی دیگر باعث کاهش نیروی کشش بین سطوح خاک و نفت می‌گردند. و عامل اصلی چسبیدن ذرات خاک به نفت یعنی همان نیروی موئینگی، کم می‌شود. مکانیسم تحریک به بار یونی شوینده‌ها بستگی دارد. بنابراین جذب شوینده‌ها آنیونی به فلزات موجود در خاک ممکن است سبب کاهش غلظت موثر آنها در خاک گردد. با جذب بخشی از شوینده‌ها بر روی خاک میزان تاثیر آنها برای تحریک آلاینده‌های نفتی و در نهایت تصفیه خاک کاهش می‌یابد. از اینرو ایجاد مکانیسم تحریک در خاک ممکن است با مقادیر بیشتری از شوینده رخ دهد. زمانیکه میزان سورفاکتانت بیش از غلظت بحرانی باشد، حلالیت ترکیبات نفتی در آب با تولید رشته‌های منومری شوینده‌ها (اجزای تشکیل دهنده میسل) افزایش می‌یابد. چنانچه گفته شد، یک مولکول شوینده دارای دو انتها است که یک سر آن آبگریز و انتهای دیگر آن آبدوست است. انتهای آبگریز مولکولهای شوینده بصورت یک خوشه در داخل ساختمان میسل تجمع یافته و انتهای آبدوست آنها در سطح خارجی ساختمان میسل در تماس با فاز آبی قرار می‌گیرند. در نتیجه قسمت داخلی یک میسل بصورت یک محیط مناسب و سازگار برای مولکولهای آبگریز مواد آلی درمی‌آید و قادر است ذرات نفتی را از سطح خاک جدا کرده و بصورت محلول درآورد. این فرایند با عنوان انحلال شناخته شده است. شوینده‌های زیستی از طریق تسهیل و اجذبی آلاینده‌های نفتی از خاک و یا بوسیله پخش کردن ذرات نفت چسبیده به سطح خاک بصورت قطرات ریز به درون فاز مایع (آب) به گونه‌ای که براحتی در دسترس میکروارگانیسمها قرار گرفته و تجزیه شوند به فرآیند اصلاح زیستی خاکهای آلوده به ترکیبات نفتی کمک می‌نمایند [۱۲]. با توجه به وجود انواع مولکولهای مختلف هیدروکربنها و پیچیدگی و گستردگی خواص فیزیکی و شیمیایی آنها در نفت خام طبیعی و حلالیت بسیار کم اکثر آنها و نداشتن امکان دسترسی به کشش بین سطحی بسیار پائین، در عملیات شستشوی خاک، تاثیر مکانیسم انحلال ترکیبات نفتی در حذف آلاینده‌های نفتی از خاک، جزئی و تقریباً قابل صرف نظر کردن است. لذا عمده حذف ترکیبات نفتی از خاک مربوط به مکانیسم تحریک خواهد بود [۱۳]. توجه به شوینده‌های

زیستی در مقایسه با شوینده‌های مصنوعی روز به روز افزایش می‌یابد. علت این امر وجود برتریهای شاخصی است که شوینده‌های زیستی نسبت به شوینده‌های مصنوعی دارند. مهمترین مزایای شوینده‌های زیستی عبارتند از [۱۹]، [۱۸]، [۱۷]، [۱۶]، [۱۵]، [۱۴]:

- ۱- سهولت تهیه آنها از منابع طبیعی تجدیدپذیر
- ۲- سمیت کمتر نسبت به انواع مصنوعی
- ۳- زیست تخریب پذیری
- ۴- فعالیت سطحی بسیار عالی نسبت به شوینده‌های مصنوعی
- ۵- سازگاری با محیط زیست پس از تخلیه پساب حاصل از فرایند شستشوی خاک به محیط
- ۶- فعالیت و توانایی تا درجه حرارت حدود ۹۰ درجه سانتیگراد
- ۷- حفظ توانایی تا pH حدود ۱۲
- ۸- توانایی در تحمل غلظت تا بیش از ۱۰ درصد نمک محلول در آب.

گرچه شوینده‌های زیستی خود به عنوان یک ماده مهم در رفع آلودگی خاک مطرح گردیده اند ولی باید توجه کرد که این شوینده‌ها در بسیاری از فرایندهای زیستی از جمله فرایند اصلاح زیستی خاکهای آلوده نفتی تولید می‌شوند. در این تحقیق سعی شده است تولید این شوینده‌ها در شرایط غیر سترون و طبیعی بدون توجه به نوع و مقدار آنها بررسی و نیز تأثیرشان که با توجه به مکانیسمهای تحریک و انحلال بر راندمان حذف آلودگی‌ها مورد مطالعه قرار گیرد.

۲- مواد مصرفی و روشهای انجام آزمایش

برای بدست آوردن شوینده‌های زیستی تطابق یافته با هیدروکربن‌های نفتی از خاکهای آلوده به مواد نفتی از نهر کوچکی در اطراف پالایشگاه تهران که مدت‌ها در معرض آلودگی‌های نفتی قرار داشتند استفاده شد. برای اینکه تنوع میکروبی مناسبی بدست آید از اعماق مختلف نمونه‌هایی تهیه گردید. برای نمونه برداری از مطالعات انجام شده قبلی استفاده شد [۲۱]، [۲۰]. این باکتریها سپس در مدت طولانی در شرایط آزمایشگاهی به نفت خام وفق داده شدند. از آنجا که ماهیت فرایند مورد بررسی در این تحقیق هوازی است پس از تطبیق باکتریها با نفت خام در شرایط بی‌هوازی، باکتریها به مدت ۱۰ روز در کنار نفت خام هوادهی شدند. خاک کائولینیت استفاده شده در این تحقیق علاوه بر ریز دانه بودن و خاصیت بافیری کم، دارای نفوذ پذیری بسیار پایین می‌باشد و احتمال شناور شدن و واجذبی خود به خودی نفت خام از آن بسیار پایین

FeSO ₄	CaCl ₂ .2H ₂ O	MgCl ₂ .2H ₂ O	(NH ₄) ₂ SO ₄	K ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄	ماده شیمیایی
۰/۰۳	۰/۰۴	۰/۲	۲	۴/۳	۳/۴	مقدار (g/l)

جدول (۳): مشخصات محلول حاوی عناصر جزئی

H ₂ BO ₃	ZnSO ₄	CuSO ₄	MoCO ₃	MnCl ₂	مواد شیمیایی
۱۳	۶۰	۶	۸۰	۴۰	مقدار (mg/l)

درون هر ارلن ۲۰g خاک کائولینیت ریخته سپس ml ۱۲ از محلول استوک اضافه شد و به مدت ۴ دقیقه کل مخلوط با یک همزن میله ای مخلوط گردید تا مخلوط همگن گردد. پس از آلوده سازی نمونه های خاک به نفت خام، میزان ml ۲۰ مایع تلقیح آماده شده توسط راکتورهای هوازی، به هر ظرف غیر از نمونه های شاهد اضافه گردید. از آنجا که راکتورهای شاهد نباید فعالیت زیستی داشته باشد به ظروف شاهد، ۹۰ cc آب مقطر حاوی ۲۰mg/lit کلرید جیوه (به منظور جلوگیری از فعالیت میکروبی) اضافه شد تا حجم کلی محتویات راکتورهای شاهد در حدود ۱۰۰ cc ثابت باشد. به راکتورهای اصلی ۷۰ cc محلول حاوی مواد مغذی و عناصر اضافه گردید تا حجم راکتورهای شاهد نیز در حدود ۱۰۰ cc ثابت باشد. از آنجا که در طول مدت آزمایش تبخیر طبیعی وجود دارد، حجم تبخیر شده از مایع هر راکتور با محلول مناسب هر کدام با توجه به توضیحات ذکر شده به ازای هر دو روز یکبار اضافه می گشت. پس از آماده سازی راکتورها به منظور ایجاد یکنواختی کامل رطوبت آلودگی نفتی و باکتریها، نمونه ها به مدت ۲۴ ساعت دیگر در این حالت نگهداری شدند. سپس نمونه ها بر روی یک لرزاننده ساخت ایران با سرعت تقریبی ۱۰۰ rpm اقرار داده شدند. جدول (۴) مشخصات نمونه های شاهد و اصلی را نشان می دهد جهت اطمینان از نتایج نهایی به جای سه مرتبه نمونه برداری از هر راکتور، تعداد تکرار به راکتورها اختصاص داده شد، به این معنی که هر سه راکتور مؤید یک دوره زمانی و یک غلظت بودند، لذا با نمونه برداری از هر راکتور، در نهایت ۳ داده جهت پارامترهای مورد بررسی بدست می آمد. با توجه به آنکه تناوب نمونه گیری هر ۲ روز یکبار انتخاب گردید، به ازای هر نوبت نمونه گیری ۸ راکتور از روی لرزاننده برداشته می شد که از این تعداد، ۳ راکتور حاوی خاک آلوده به ۵۰۰۰۰ ppm نفت خام همراه میکرواورگانیزم، ۳ راکتور حاوی خاک آلوده به ۱۰۰۰۰ ppm نفت خام همراه میکرواورگانیزم و ۱ راکتور شاهد آلوده به ۵۰۰۰۰ ppm نفت خام و راکتور شاهد دیگری آلوده به ۱۰۰۰۰ ppm نفت خام بود. نمونه ها پس از برداشتن

است. از سوی دیگر به علت فقدان مواد آلی در این خاک، مقایسه و اندازه گیری میزان غلظت آلودگی مواد نفتی و نیز بررسی اثرات مواد آلی بر فرایند در شرایط کنترل شده ای انجام می پذیرد. کائولینیت مورد نیاز با نام تجاری کائولن از شرکت خاکهای معدنی ایران تهیه گردید. این نوع خاک علاوه بر کاربرد آزمایشگاهی بیشتر در صنایع چینی سازی کاربرد دارد (جدول ۱).

جدول (۱): مشخصات خاک کائولینیت مصرفی

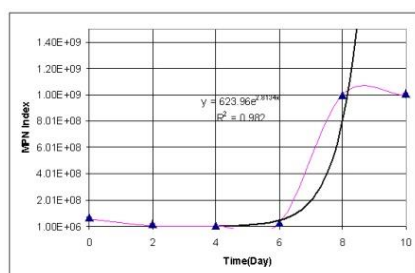
حد روانی و حد خمیری خاک	۵۳ و ۳۴ درصد
pH خاک	۶/۷
دانسیته خشک ماکزیمم	۱/۵۲ گرم بر سانتیمتر مکعب
رطوبت بهینه	۲۵/۶۶ درصد
تخلخل نمونه	۳۷ درصد
ضریب نفوذ پذیری	۶ × ۱۰ ^{-۶} سانتیمتر بر ثانیه
ظرفیت تبادل کاتیونی (CEC)	۲/۲ میلی اکی والان بر صد گرم
سطح ویژه	۲۸ متر مربع بر گرم

نفت خام مورد استفاده از نوع نفت خام سنگین با جرم حجمی ۰/۸۷۱ گرم بر سانتیمتر مکعب و تولیدی داخل کشور بوده و از پالایشگاه تهران تهیه گردید. استخراج نفت در تمامی مراحل با استفاده از دی کلرومتان خالص از شرکت مرک انجام شد. برای تهیه محلول استوک نفت از استن با درجه خلوص بالا (مخصوص کروماتوگرافی) از شرکت مرک با شماره ۱۳ استفاده شد. محیط کشت معدنی حاوی ۹۷۵ میلی لیتر محیط کشت غنی سازی (جدول ۲) و ۲۵ میلی لیتر محلول عناصر جزئی با pH= ۶/۸ (جدول ۳) بود. مواد شیمیایی یاد شده از شرکت های مرک، فلوکا، آلد ریچ، سیگما و دیفکو تهیه شدند. این نوع محیط کشت بر اساس مطالعات قبلی [۲۲] انتخاب گردید. از ۸۸ عدد ارلن مایر ۱۰۰ cc استفاده شد. خاک با آلودگیهای متفاوت ۵۰۰۰۰ mg/kg و ۱۰۰۰۰۰ mg/kg به صورت مصنوعی تهیه گردید. درون هر ارلن ۲۰gr خاک کائولینیت ریخته سپس ml ۱۲ از محلول استوک اضافه شد و به مدت ۴ دقیقه کل مخلوط با یک همزن میله ای مخلوط گردید تا مخلوط همگن گردد.

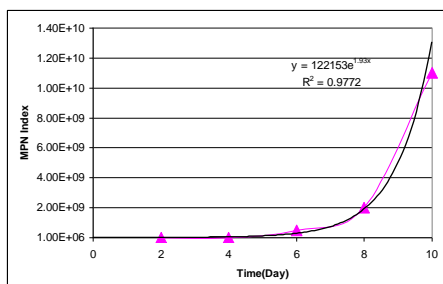
جدول (۲): مشخصات محلول مواد مغذی مورد استفاده



نمونه های ۱۰۰۰۰ ppm و ۵۰۰۰۰ ppm رشد باکتریها در ۸ روز اول به صورت نمایی می باشد و سپس رشد آنها ثابت می شود و در واقع باکتریها به یک فاز پایدار می رسند. ملاحظه می شود، باکتریها در هر دو نمونه ۱۰۰۰۰ ppm و ۵۰۰۰۰ ppm دارای فاز تاخیری حدود ۲ روز می باشند و این به جهت نیاز باکتریها به زمان جهت تطبیق با محیط می باشد. میزان جمعیت میکروبی در نمونه های ۱۰۰۰۰ ppm بسیار کندتر از نمونه های ۵۰۰۰۰ ppm افزایش می یابد و به نظر می رسد دلیل این مساله تاثیر غلظت آلاینده های نفتی (غذای مورد تغذیه باکتریها) است، چرا که میزان غلظت آلاینده ها هم در فاز مایع و هم در فاز جامد در کلیه زمانهای نمونه گیری در نمونه ۱۰۰۰۰ ppm کمتر از نمونه های ۵۰۰۰۰ ppm است.



نمودار (۱): نمودار رشد جمعیت میکروبی در نمونه های آلوده به ۱۰۰۰۰ ppm



نمودار (۲): نمودار رشد جمعیت میکروبی در نمونه های آلوده به ۵۰۰۰۰ ppm

۳-۲- تفسیر نمودار شوینده های زیستی و تغییرات کشش سطحی

همانطور که در نمودارهای (۴) و (۵) آمده از دو مجموعه نمونه های ۱۰۰۰۰ ppm و ۵۰۰۰۰ ppm مشهود است، نمودارهای رسم شده حاکی از اختلاف این نمودارها با نمودارهای متعارف تغییرات کشش سطحی در برابر غلظت می باشد.

از روی لرزاننده به مدت ۱ ساعت به حال خود رها می شد تا خاک موجود در فاز مایع به طور کامل ته نشین شود. سپس اندازه گیری pH با استفاده از یک دستگاه pH متر رومیزی انجام می پذیرفت. پس از اندازه گیری pH مایع یک نمونه در حدود ۲ CC برای سنجش MPN از مایع جدا کرده و بقیه مایع موجود در هر راکتور به یک ظرف دیگر منتقل می گشت و توسط یک دستگاه مگنت برقی به مدت ۱ دقیقه مخلوط می شد و در نهایت یک نمونه ۲ CC توسط پیپت جهت استخراج مایع - مایع جدا می شد. یک نمونه حدود ۱۰ CC نیز از مایع جهت سنجش کشش سطحی برداشته می شد. برای نمونه برداری از فاز جامد، ابتدا توسط یک همزن میله ای کل باقیمانده را به طور کامل مخلوط نموده و سپس یک نمونه دو گرمی برداشته می شد. برای استخراج نفت از محیط مایع از روش استخراج مایع- مایع استفاده شد. به منظور اطمینان از روش اجرایی آزمایشات و تعیین میزان دقت در آزمایشات، در کلیه موارد فوق استخراج با محلول های با غلظت معین نیز انجام شد [۲۰]، [۲۳].

جدول (۴): مشخصات نمونه های شاهد و اصلی

نمونه ها	تعداد	غلظت آلودگی Ppm	حجم (cc)	محتویات مایع	وزن خاک (gr)
اصلی ۱	۳۳	۵۰۰۰۰	۱۰۰	نوترینت + باکتری	۲۰
اصلی ۲	۳۳	۱۰۰۰۰	۱۰۰	نوترینت + باکتری	۲۰
شاهد ۱	۱۱	۵۰۰۰۰	۱۰۰	HgCl _۲ + آب مقطر	۲۰
شاهد ۲	۱۱	۱۰۰۰۰	۱۰۰	HgCl _۲ + آب مقطر	۲۰

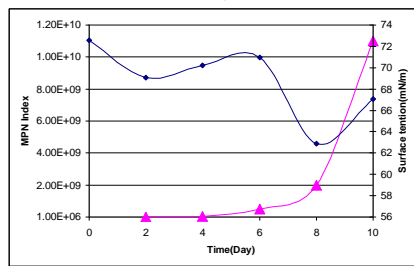
استخراج ترکیبات نفتی بر اساس روش پیشنهادی EPA برای غلظت بالای ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم خاک و غلظتهای کمتر بکار گرفته شد [۲۴]. اندازه گیری نفت بوسیله دستگاه طیف سنجی فلورسانس نشری مدل Shimadzu RF-۵۰۰۰ انجام شد. تولید شوینده های زیستی در طی آزمایشات بوسیله اندازه گیری میزان کشش سطحی نمونه های مایع بدست آمده از حفرات در طی دوره آزمایش بررسی گردید. کشش سطحی بوسیله یک دستگاه تانسیموتر^۱ مدل K12(HR) ساخت شرکت KRUSS آلمان و با استفاده از روش حلقه دونای^۲ اندازه گیری شد. جهت شمارش میکروبی نمونه ها از آزمایش MPN استفاده گردید [۲۵].

۳- مقایسه نتایج و بحث

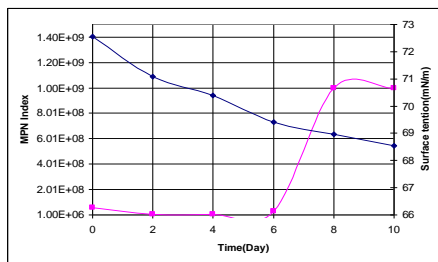
۳-۱- تغییرات توده میکروبی

همانطور که نمودارهای (۱) و (۲) مشخص است در هر دو

۱۰۰۰۰ ppm نسبت به ۵۰۰۰۰ ppm کمتر بوده است (مطالعه و مقایسه ها برای بیست روز انجام شده است).



نمودار (۴): تغییرات کشش سطحی و مقایسه آن با تغییرات MPN در نمونه های ۵۰۰۰۰ ppm



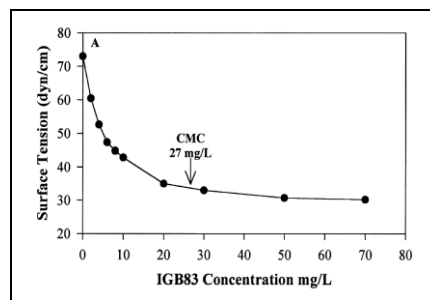
نمودار (۵): تغییرات کشش سطحی و مقایسه آن با تغییرات MPN در نمونه های ۱۰۰۰۰ ppm

شاید این مورد به دلیل تجمع مواد شوینده با وجود ثبات در افزایش باکتریها اتفاق افتاده است. گفتنی است با آنکه در این تحقیق آهنگ تولید و تجمع شوینده ها مورد بررسی قرار نگرفته است، به نظرمی رسد آهنگ تجمع به دلیل از بین رفتن قسمتی از شوینده ها بلافاصله پس از تولید، کمتر از آهنگ تجمع باشد.

۳-۳- بررسی حذف آلاینده های نفتی در خاک

با توجه به تغییرات غلظت نفت خام مجموعه نمونه های ۵۰۰۰۰ ppm و ۱۰۰۰۰ ppm حذف نفت خام از خاک با توجه به سه فرضیه بررسی شده است:

- ۱- حذف نفت از خاک با توجه به فرآیند اصلاح زیستی بوده و میزان نفت خام مشاهده شده در فاز مایع خود بخودی یا در اثر تکان خوردن ظروف بوده است.
- ۲- حذف نفت از خاک با توجه به فرآیند اصلاح زیستی بوده و میزان نفت خام مشاهده شده در فاز مایع به دلیل تولید شوینده های زیستی می باشد.
- ۳- حذف نفت از خاک با توجه به فرآیند اصلاح زیستی می باشد ولی تولید شوینده های زیستی باعث افزایش دسترسی زیستی^۱ و در نتیجه افزایش راندمان حذف شده است. به عبارت دیگر تولید شوینده های زیستی بیش از آنچه تصور می شود در فرآیند اصلاح زیستی نقش داشته اند.



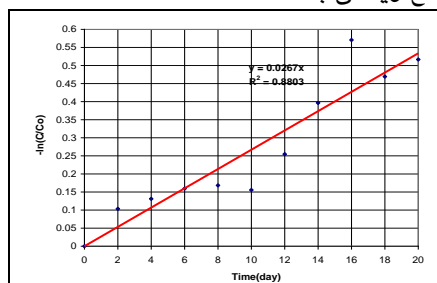
شکل (۳): تغییرات کشش سطحی غلظت یک نمونه، شوینده خالص در برابر غلظت [۲۴]

همانطور که در نمودار (۳) مشخص است. چنانچه نمودار غلظت یک شوینده خالص در برابر کشش سطحی رسم شود، نمودار حاصل همواره حالت نزولی داشته و تقعر منحنی حاصل به سمت بالا خواهد بود. در حالی که در نمودارهای (۴) و (۵) که نمودارهای حاصل از تغییرات غلظت شوینده در برابر کشش سطحی است، با آنکه کشش سطحی به صورت کلی سیر نزولی دارد ولی در بعضی قسمتها تقعر منحنی غیر عادی به نظر می رسد. این مورد برای مجموعه نمونه های ۵۰۰۰۰ ppm در روزهای دوم و ششم نیز مشهود است. در نمونه های ۱۰۰۰۰ ppm در روز ۱۴ یک صعود ناگهانی وجود دارد و سپس سیر نزولی ادامه می یابد. در روند حاصل از تحقیق با مقایسه نمودار تغییرات کشش سطحی با نمودار تغییرات غلظت TPH در فاز مایع مشاهده می شود که در روز ششم غلظت TPH در محیط مایع بالا است. با توجه به تحقیقات انجام شده توسط پرنیلا لیلجکویست^۸ و همکارانش [۲۵] که بر روی شوینده های سنتزی و تاثیر مواد نفتی بر نقطه CMC و منحنی کشش سطحی انجام شده است، می توان اتفاق رخ داده را به تمایل مواد نفتی در تشکیل پیوند با مولکولهای شوینده های تولید شده و تاثیر در کاهش کشش سطحی ایجاد شده در محیط نسبت داد. همانطور که در نمودارهای (۴) و (۵) مشهود است به نظر می رسد که به دلیل تغییرات غلظت TPH در دو سیستم ۵۰۰۰۰ ppm و ۱۰۰۰۰ ppm آهنگ تغییرات کشش سطحی نیز متفاوت است. با مقایسه دو نمودار (۴) و (۵)، ملاحظه می شود که کاهش کشش سطحی در سیستم ۱۰۰۰۰ ppm در نهایت تا میزان ۶۲/۲۲ mN/m (حداکثر کاهش در روز چهارم ۵۷/۲۲ mN/m ثبت شده است) کاهش می یابد، در حالی که این میزان در سیستم ۵۰۰۰۰ ppm تا میزان ۵۵/۵۰ mN/m کاهش داشته است. شاید با توجه به نمودارهای ۴ و ۵ به دلیل توانایی کمتر باکتریها در سیستم ۱۰۰۰۰ ppm نسبت به ۵۰۰۰۰ ppm در افزایش توده میکروبی، توانایی این سیستم در تولید شوینده زیستی و آهنگ کاهش کشش سطحی در سیستم

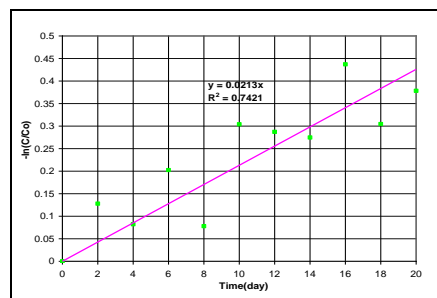
ع- نتیجه گیری

ع-۱- بررسی فرض انتقال خود بخودی یا تاثیر تکان خوردن ظروف بر انتقال نفت از فاز خاک به فاز مایع

قبل از بررسی فرض انتقال خود بخودی یا تاثیر تکان خوردن ظروف بهتر است نتایج به دست آمده از آزمایش با معادله درجه اول کلاسیک که جهت فرایند اصلاح زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرد تطبیق داده شود. با توجه به معادله درجه اول $\ln C/C_0 = kt$ (رابطه ۱) [۲۶] می‌توان نتایج بدست آمده رابا نمودارهای (۶) و (۷) بازنویسی نمود. همانطور که در این نمودارها مشاهده می‌شود، ضریب K برای نمونه های ppm ۱۰۰۰۰ مقداری کمتر از ppm ۵۰۰۰۰ می‌باشد و دلیل آن شاید کاهش دسترسی زیستی یا به عبارت دیگر تاثیر منبع کربنی برفرایند اصلاح زیستی باشد.

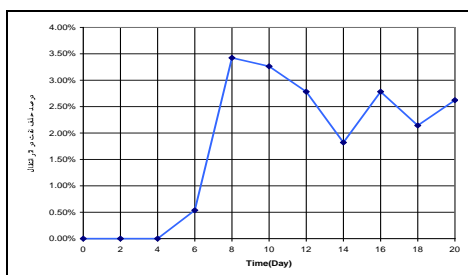


نمودار (۶): تغییرات TPH در طی ۲۰ روز فرایند در خاک آلوده به ppm ۵۰۰۰۰

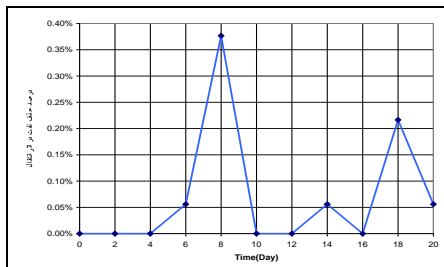


نمودار (۷): تغییرات TPH در طی ۲۰ روز فرایند در خاک آلوده به ppm ۱۰۰۰۰

این معادله به شرطی برای فرایند صحیح می‌باشد که کل فرایند حذف حاصل از اصلاح زیستی باشد در حالی که با توجه به نمودار (۸) و (۹) دریافت می‌شود، قسمتی از حذف نفت در فاز خاک مربوط به انتقال نفت از فاز خاک به فاز مایع است، پس نیاز است که معادله بازنویسی شود.



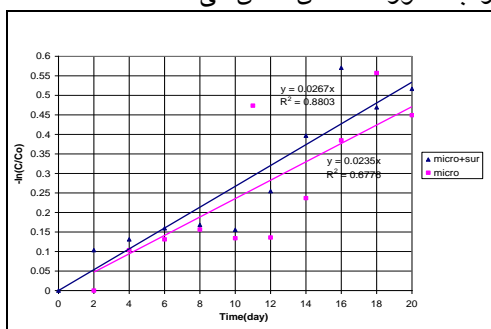
نمودار (۸): درصد حذف نفت ناشی از انتقال در نمونه های ppm ۵۰۰۰۰



نمودار (۹): درصد حذف نفت ناشی از انتقال در نمونه های ppm ۱۰۰۰۰

ع-۲- بررسی فرض تولید شوینده های زیستی و انتقال نفت خام از فاز خاک به فاز مایع

انتقال نفت خام از فاز خاک به فاز مایع دلیل دیگری غیر از تکان خوردن یا انتقال خود بخودی دارد، لذا با توجه به تولید شوینده های زیستی و تاثیر آنها بر واجدبی آلاینده های نفتی می‌توان این انتقال را به تولید این شوینده ها نسبت داد. چنانچه تاثیر شوینده های زیستی بر واجدبی و انتقال نفت خام از فاز خاک به فاز مایع مورد قبول باشد، می‌توان نمودارهای (۸) و (۹) را با در نظر گرفتن میزان نفت خام موجود در فاز مایع و کسر آن از غلظت نفت خام در فاز خاک اصلاح نمود. نمودارهای (۱۰) و (۱۱) معادله سینتیکی حذف بیولوژیکی نفت در خاک را به صورت خالص نشان می‌دهد.



نمودار (۱۰): اصلاح معادله سینتیکی نمونه های ppm ۵۰۰۰۰

۴-۳- ارائه یک مدل سینتیکی جهت بررسی نقش شوینده های زیستی بر انتقال و واجذبی نفت خام از خاک آلوده

چنانچه شوینده ای مرحله، مرحله به آب اضافه شود، به تناسب افزایش شوینده قبل از رسیدن به نقطه CMC حلالیت ترکیبات نفتی هم بیشتر می شود. پس می توان فرض کرد که غلظت ترکیبات نفتی در فاز مایع همواره در حال افزایش می باشد. از طرفی در محیط مایع نیز مانند محیط جامد باکتریها موجود بوده و آلودگی نفتی انتقال یافته به محیط مایع مورد مصرف باکتریها قرار خواهد گرفت. لذا غلظت نفت خام از طرفی در محیط مایع بالا رفته و از طرف دیگر این غلظت مورد تاثیر مصرف باکتریها قرار می گیرد. چنانچه غلظت نفت خام در زمان t و $t-1$ به ترتیب C_t و C_{t-1} فرض شود، با توجه به اینکه تغییرات غلظت و واجذبی یا به عبارت دیگر انتقال آلاینده های نفتی را می توان ΔC در نظر گرفت و C_t را با فرض اینکه در فرایند تنها انتقال نفت اتفاق افتد بدست آورد:

$$C_t = C_{t-1} + \Delta C \quad (۲)$$

همانطور که در رابطه بالا مشخص است تنها عامل متغیری که فرض شده است ΔC می باشد و عوامل دیگر دخالت داده نشده است. با بررسی تاثیر باکتریها در حذف نفت در محیط مایع، رابطه ۲ حاصل می شود.

$$C_t = C_{t-1} + \Delta C - K_t C_{t-1} \quad (۳)$$

در رابطه بالا K_t ضریب تغییر غلظت نفت خام در زمان t نسبت به زمان $t-1$ در اثر فعالیت باکتریها می باشد. چنانچه معادله سینتیکی درجه ۱ زوال را برای زمانهای $t-1$ و t بازنویسی می شوند:

$$-Ln(C_t/C_0) = kt \quad (۴)$$

$$-Ln(C_{t-1}/C_0) = k(t - \Delta t) \quad (۵)$$

و لذا برای K_t رابطه ۶ حاصل خواهد شد:

$$K_t = \frac{C_t}{C_0} = \frac{C_0 e^{-kt}}{C_0 e^{-k(t-\Delta t)}} = e^{-k\Delta t} \quad (۶)$$

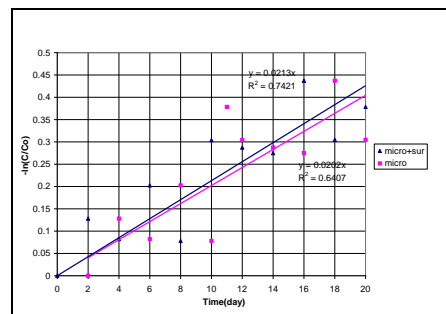
به عبارت دیگر K_t به زمان وابسته بوده و رابطه ۷ حاصل خواهد شد:

$$C_t = C_{t-1} + \Delta C - e^{-k\Delta t} C_{t-1} \quad (۷)$$

که همان ضرایب سینتیکی است که در بخش ۴-۲ به دست آمده است. چنانچه رابطه ۷ را برای ΔC مرتب شود رابطه ۸ به دست خواهد آمد:

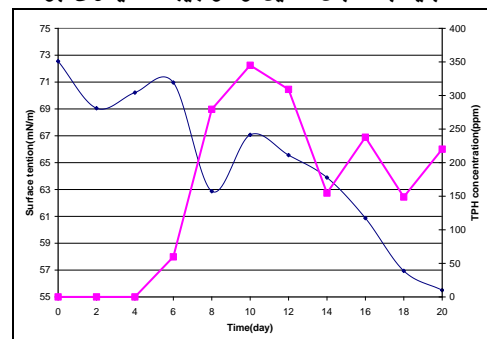
$$\Delta C = C_t - C_{t-1} + e^{-k\Delta t} C_{t-1} \quad (۸)$$

از آنجا که ΔC ماهیت تجمعی دارد می توان میزان تجمع ناشی



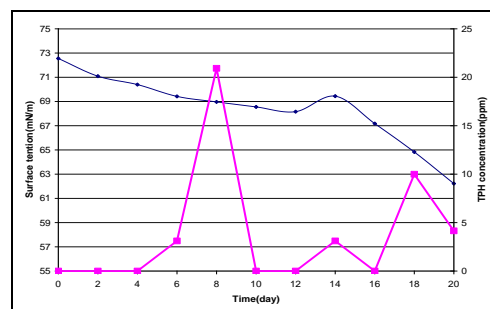
نمودار (۱۱): اصلاح معادله سینتیکی در نمونه های ۱۰۰۰۰ ppm

در نگاه اول نتایج و بررسی ارائه شده صحیح به نظر می رسد اما با توجه به نمودارهای (۱۲) و (۱۳) ملاحظه می شود که فرض در نظر گرفته شده این نمودار را توجیه نمی کند. همانطور که اشاره شد شوینده های زیستی بر واجذبی و انتقال نفت خام موثراند، لذا هر چه غلظت شوینده های زیستی بیشتر و به نقطه CMC نزدیک شوند، تاثیر آنها بر واجذبی آلاینده های نفتی بیشتر خواهد شد در حالی که با توجه به نمودارهای (۱۲) و (۱۳) به نسبت افت کشش سطحی (افزایش غلظت شوینده ها در محیط) واجذبی آلاینده های نفتی اتفاق نیفتاده است و برعکس از روز دهم به بعد در نمونه های ۱۰۰۰۰ ppm و همچنین در نمونه های ۵۰۰۰۰ ppm غلظت نفت خام در محیط مایع کاهش نیز داشته است. پس دلایل ذکر شده نمی تواند تغییرات غلظت نفت در فاز مایع را توجیه کند و جهت تفسیر داده ها باید به دنبال دلایل و توجیحات دیگری بود.



نمودار (۱۲): تغییرات کشش سطحی و مقایسه آن با تغییرات TPH در

نمونه های ۵۰۰۰۰ ppm

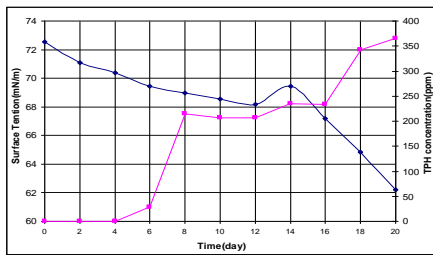


نمودار (۱۳): تغییرات کشش سطحی و مقایسه آن با تغییرات TPH در

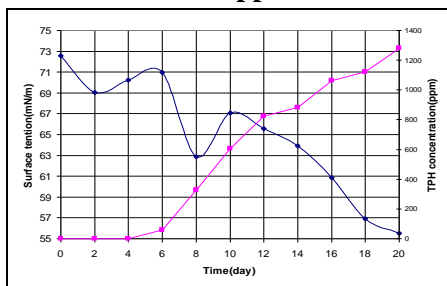
نمونه های ۱۰۰۰۰ ppm



نمودار (۱۵): میزان تجمع نفت خام در زمانهای مختلف بر اثر انتقال در نمونه های ۱۰۰۰۰ ppm



نمودار (۱۶): میزان تجمع نفت خام در زمانهای مختلف بر اثر انتقال در مقایسه با کشش سطحی در نمونه های ۱۰۰۰۰ ppm



نمودار (۱۷): میزان تجمع نفت خام در زمانهای مختلف بر اثر انتقال در مقایسه با کشش سطحی در نمونه های ۵۰۰۰۰ ppm

۴-۴- بررسی راندمان واقعی شوینده ها بر حذف نفت خام از خاک آلوده

چنانچه نتایج بدون مباحث بخش ۴-۳ در نظر گرفته شود. حداکثر تاثیر مستقیم شوینده ها در انتقال نفت خام از فاز جامد به مایع و در واقع حذف نفت خام در نمونه های ۵۰۰۰۰ ppm در حد ۵٪ به دست می آید که به معنی تاثیر ۱۰٪ حذف از کل راندمان حذف نفت خام از خاک می باشد. حال چنانچه نمودارها با فرضیات بخش ۴-۳ رسم شود، ملاحظه خواهد شد که علاوه بر تاثیر مستقیم ۵٪ در حذف نفت خام، شوینده های زیستی به میزان ۱۴٪ در افزایش دسترسی زیستی موثر بوده و لذا تاثیر شوینده ها در حذف نفت خام از خاک در حد ۱۹٪ می باشد و به نسبت حذف مستقیم ناشی از فعالیت میکروارگانیسمها به ۲۱٪ کاهش می یابد. یعنی به نسبت همان اندازه که میکروارگانیسمها در حذف نفت خام دخیل بوده اند شوینده های تولید شده توسط آنها نیز در حذف نفت خام از خاک سهم داشته اند. نمودارهای (۱۸) مقایسه عوامل مختلف بر حذف نفت در فرایند اصلاح زیستی برای نمونه های ۵۰۰۰۰ ppm را نشان می دهد.

از انتقال نفت خام به محیط مایع را بر اساس رابطه ۹ بازنویسی نمود:

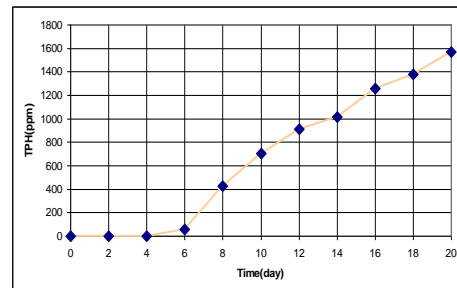
$$\delta_i = \sum_{i=1}^n \Delta C = \sum_{i=1}^n (C_i - C_{i-1} + e^{-k\Delta t} C_{i-1}) \quad (9)$$

که δ_i میزان تجمع نفت خام در زمان i بر اثر انتقال می باشد و از آنجا که در بخش قبلی ثابت شد که این انتقال بر اثر تولید شوینده ها می باشد، می توان آن را میزان تجمع نفت خام تحت تاثیر شوینده زیستی برشمرد. در این تحقیق ضریب k برای مجموعه نمونه های ۱۰۰۰۰ ppm برابر 0.213 day^{-1} و برای نمونه های ۵۰۰۰۰ ppm 0.267 day^{-1} بدست آمد، بنابراین δ_i را می توان برای نمونه ها به صورت روابط ۱۰ (۱۰۰۰۰ ppm) و ۱۱ (۵۰۰۰۰ ppm) بازنویسی کرد:

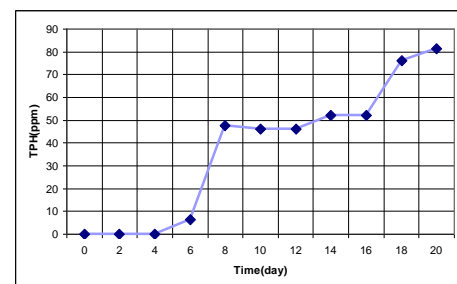
$$\delta_i = \sum_{i=1}^n \Delta C = \sum_{i=1}^n (C_i - C_{i-1} + e^{-0.0213\Delta t} C_{i-1}) \quad (10)$$

$$\delta_i = \sum_{i=1}^n \Delta C = \sum_{i=1}^n (C_i - C_{i-1} + e^{-0.0267\Delta t} C_{i-1}) \quad (11)$$

با رسم نمودار دو رابطه ۱۰ و ۱۱، نمودارهای ۱۴ و ۱۵ حاصل می شود. با مقایسه دو نمودار (۱۴) (۱۵) با نمودارهای (۱۲) و (۱۳) نقش شوینده های زیستی تولیدی در فرآیند اصلاح زیستی به طور کامل مشخص می شود. نمودارهای (۱۶) و (۱۷) مقایسه تغییرات کشش سطحی و تغییرات غلظت تجمع نفت خام را نمایش می دهد و در هر دو مجموعه نمونه های ۵۰۰۰۰ ppm و ۱۰۰۰۰ ppm با کاهش کشش سطحی، افزایش تجمع غلظت نفت خام مشهود است.

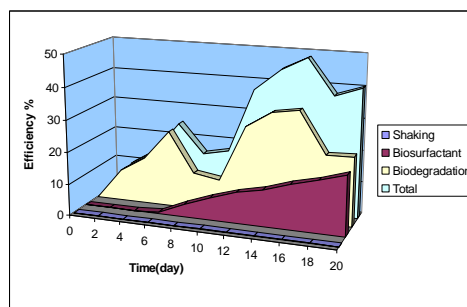


نمودار (۱۴): میزان تجمع نفت خام در زمانهای مختلف بر اثر انتقال در نمونه های ۵۰۰۰۰ ppm



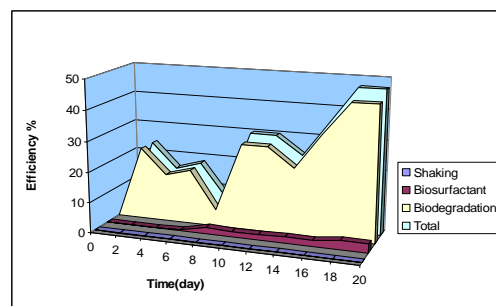
۶- مراجع

- [۱] Mulligan, C.N.; 'Environment application for biosurfactants,' Environmental pollution, 133:183-198, 2005.
- [۲] Lang, S.; 'Biological amphiphiles'. Current opinion in colloid and interface science. 7:12-20, 2002.
- [۳] Kosaric, N., et al.; Biosurfactants and Biotechnology. Marcel Dekker, New York/Basel, 1987.
- [۴] Healy, et al.; 'Microbial production of biosurfactants. Resource Conserv'. Recycl. 18 (1-4): 41-57, 1996.
- [۵] Mulligan, C.N., Eftekhari, F.; 'Remediation with surfactant foam of PCP-contaminated soil'. Engineering Geology, 70: 269-279, 2003.
- [۶] Kuyukina, M.S., et al.; 'Effect of biosurfactants on crude oil desorption and mobilization in a soil system'. Environment International, 2004.
- [۷] Rosen, M.J.; 'Surfactants and Interfacial Phenomena'. John Wiley, New York, 1989.
- [۸] Deshpande, S., et al.; Surfactant selection for enhancing ex situ soil washing. Water Resource 33 (2): 351-360, 1999.
- [۹] Vigon, B.W., Rubin, A.J.; 'Practical considerations in the surfactant-aided mobilisation of contaminants in aquifers'. J. Water Pollut. Control Fed. 61(7): 1233-1240, 1989.
- [۱۰] Mulligan, C.N., et al.; 'Surfactant enhanced remediation of contaminated soil: a review'. Eng. Geology 60: 371-380, 2001.
- [۱۱] Cheah, E.P.S., et al.; 'Simulation of soil washing with surfactants'. J. Hazard. Mater. 59 (2-3): 107-122, 1998.
- [۱۲] Rahman K.S ,et al, "Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant". Bioresource Technology, 81: 25-32, 2002.
- [۱۳] USEPA, Treatment technologies for site cleanup. Annual Status Report, Office of Solid Waste and Emergency Response (5102G), 10Th ed, 2001.
- [۱۴] Franc, D.S, et al. ; "Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria". J. Ind. Microbiol. 8, 237-246, 1991.
- [۱۵] Harvey, S., et al.; "Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant". BIO/Technol, 8:228-230,1990.
- [۱۶] Jain, D.K., Lee, H., Trevors, J.T. "Effect of addition of Pseudomonas aeruginosa UG2 inocula or biosurfactants on biodegradation of selected hydrocarbons in soil". J. Ind. Microbiol. 10: 87-93, 1992.



نمودار (۱۸): مقایسه عوامل مختلف بر حذف نفت در فرایند اصلاح زیستی برای نمونه های ۵۰۰۰۰ ppm

چنانچه مقایسه فوق برای نمونه های ۱۰۰۰۰ ppm نیز صورت پذیرد ملاحظه می شود که نسبت تاثیر شوینده های زیستی بر حذف نفت خام با در نظر گرفتن فرض بخش ۳-۴ از کمتر از ۱٪ به ۷٪ افزایش می یابد که در مقایسه با نمونه های ۵۰۰۰۰ ppm کمتر است، زیرا همانطور که در بخشهای قبلی بحث گردید شاید بدلیل کاهش دسترسی زیستی به علت غلظت پایین نفت خام، فعالیت میکروارگانیسمها و نیز شوینده های تولید شده توسط آنها کاهش یافته و لذا واجد بی نفت خام از خاک کمتر می باشد. نمودارهای (۱۹) مقایسه عوامل مختلف بر حذف نفت برای نمونه های ۱۰۰۰۰ ppm را نشان می دهد.



نمودار (۱۹): مقایسه عوامل مختلف بر حذف نفت در فرایند اصلاح زیستی برای نمونه های ۱۰۰۰۰ ppm

در نهایت می توان معادله سنتتیک فرایند اصلاح زیستی در خاک را دوباره اصلاح نمود که در انتها ضریب k برای نمونه های ۵۰۰۰۰ ppm، 0.244 day^{-1} و برای نمونه های ۱۰۰۰۰ ppm برابر 0.211 day^{-1} حاصل می گردد که به دلیل تاثیر بسیار ناچیز در نتایج بحث شده از بازنویسی دوباره روابط ۹ و ۱۰ و تکرار محاسبه راندمان خودداری شده است.

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله لازم می دانند که از آقای دکتر محمدرضا دوستی و سرکارخانم دکتر بیبا آیتی بخاطر همکاری شان در انجام این تحقیق قدردانی نمایند.

- Lang, S., Wullbrandt, D. "Rhamnose lipids-biosynthesis, microbial production and application potential. Appl. Microbiol. Biotechnol." 51(1): 22-32, 1999. [۱۷]
- Muller, H., Blaszczyk, R.R., Wagner, F., Kosaric, N.; "Biosurfactants for environmental contro". In: Kosaric, N. (Ed), Surfactant Science Series, 48:447-469, 1993. [۱۸]
- Urum, K., Pekdemir, T., Copur, M.; "Optimum conditions for washing of crude oil-contaminated soil with biosurfactant solutions". Process Safety Environ. Protect. B 81 (3):203-209, 2003. [۱۹]
- رضایی، ر.؛ "تعیین تاثیر افزایش مواد هوموسی بر فرآیند اصلاح زیستی خاکهای آلوده به هیدروکربن های نفتی". رساله دکترا، بخش مهندسی عمران، محیط زیست، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده فنی و مهندسی، تهران، ۱۳۸۲. [۲۰]
- (n.d.). Retrieved from <http://www.EPA.gov> [۲۱]
- دوستی، م.ر.؛ حذف توأم سرب و آلاینده های نفتی از خاکهای آلوده بوسیله فن آوری بیوالکتروکینتیک". رساله دکترا، بخش مهندسی عمران، مهندسی محیط زیست، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده فنی و مهندسی، ۱۳۸۴. [۲۲]
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater; 19th ed, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA, 1995. [۲۳]
- Maier, R.M., Soberon-Chavez, G.; "Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids: biosynthesis and potential applications". Appl. Microbiol. Biotechnol. 54 (5): 625-633, 2000. [۲۴]
- Pemilla Liljekvist.; "Comparing Decyl-β-maltoside and octaethyleneglycol Mono n-Decyl Ether in Mixed Micelles with Dodecyl Benzenesulfonate". Journal of Colloid and interface Science, 222: 165-169, 2005. [۲۵]
- Tchobanoglous, G.; "Wastewater Engineering "Third Edition Metcalf & Eddy, Inc. McGraw-Hill, 1991. [۲۶]

۷- زیرنویسها

- Critical Micelle Concentration^۱
 . Mobilization^۲
 . Solubilization^۳
 . Micelles^۴
 ppm.^۵ برابر ۱ mg/kg در فاز خاک و برابر ۱ ml/l در فاز مایع است.
^۱ Surface Tensiometer . (Fisher Scientific Tensiometer model 21)
^۲ Du Nouy Ring Method (ASTM D971)
^۳ Pernilla Liljekvist^۴
^۵ Bioavailability^۶

۱. این رابطه جهت محیط جامد به دست آمده است، ولی با توجه به اینکه نوع باکتریها و تعداد آنها احتما لا در محیط جامد و مایع متفاوت نمی باشد و از آنجا که در محیط مایع دسترسی زیستی برای باکتریها بیشتر است، رابطه به دست آمده برای محیط مایع محافظه کارانه بوده و به واقعیت نزدیک است.

