

بررسی اثر تعویض متناوب قطبیت در راندمان حذف نفت خام از خاک به روش بیوالکتروکینتیک

بهروش خطایی (دانشجوی دکتری)

نادر مختارانی* (دانشیار)

حسین گنجی دوست (استاد)

دانشکده‌ی مهندسی عمران و محیط زیست، دانشگاه تربیت مدرس

مهندسی عمران شریف، (تابستان ۱۳۹۸)
دربی ۲ - ۳۵، شماره ۲/۲، ص. ۱۲۳-۱۳۶، (یادداشت شفاهی)

در پژوهش حاضر، اثر تعویض متناوب قطبیت در شرایط خاک، جمعیت میکروبی و در نتیجه راندمان حذف نفت خام از خاک رسی به روش بیوالکتروکینتیک در حضور سویه‌ی *Pseudomonas Putida* بررسی و به ارزیابی اثر غلظت اولیه‌ی نفت خام و گرادیان ولتاژ اعمال شده در میزان تصفیه‌ی خاک پرداخته شده است. طبق نتایج حاصل، در آزمایش‌های بدون تعویض قطبیت، به علت تغییرات شدید pH خاک و تأثیر آن در جریان الکترواسمز و فعالیت باکتری‌ها، با گذشت زمان از نرخ تجزیه‌ی نفت خام کاسته می‌شود. این در حالی است که با اعمال تعویض متناوب قطبیت، pH خاک در محدوده‌ی خنثی حفظ می‌شود و شرایط برای فعالیت بهتر باکتری‌ها و در نتیجه افزایش راندمان تصفیه مهیا می‌شود. در مطالعه‌ی حاضر، تعویض قطبیت یک ساعته باعث افزایش ۲۰ درصدی راندمان حذف آلاینده از خاک آلوده به ۶۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نفت خام، در مقایسه با حالت بدون تعویض قطبیت شد. همچنین، در فرایند مذکور، افزایش غلظت اولیه‌ی آلاینده و گرادیان ولتاژ منجر به افزایش میزان تجزیه و در نتیجه بهبود راندمان حذف آلاینده شد.

واژگان کلیدی: تصفیه‌ی خاک، آلودگی نفتی، بیوالکتروکینتیک، تعویض قطبیت، pH

۱. مقدمه

یکی از روش‌های تصفیه‌ی خاک‌های آلوده، استفاده از فرایندهای بیولوژیکی است. تصفیه‌ی بیولوژیکی عبارت از کاربرد میکروارگانیسم‌ها (به طور عمده باکتری‌ها) برای تجزیه‌ی آلاینده‌های مختلف و تبدیل آن‌ها به مواد ساده‌تر تحت شرایط زیستی مناسب است.^[۱] شرط موفقیت تصفیه‌ی بیولوژیکی حضور هم‌زمان میکروارگانیسم‌ها، آلاینده‌ها (غذای میکروارگانیسم‌ها)، گیرنده‌های الکترون و مواد مغذی ضروری برای رشد میکروارگانیسم‌هاست. اما در خاک‌های ریزدانه با هدایت هیدرولیکی پایین، به دلیل محدودیت در حرکت باکتری و آلاینده و نیز عدم نفوذ اکسیژن در خاک، انجام فرایند ذکر شده معمولاً با محدودیت همراه است.

روش استفاده شده‌ی دیگر در پاک‌سازی خاک‌های آلوده، فرایند الکتروکینتیک است که طی آن جریان الکتریسیته با شدت کم از میان الکترودهای تعبیه شده درون خاک عبور داده می‌شود.^[۲-۷] هدف اصلی از پاک‌سازی خاک به روش الکتروکینتیک، اثرگذاری در مهاجرت ذرات آلاینده تحت میدان مغناطیسی توسط ۳ عامل: الکترولیز،

* نویسنده مسئول

تاریخ: دریافت ۱۳۹۵/۱۰/۱، اصلاحیه ۱۳۹۶/۵/۱۶، پذیرش ۱۳۹۶/۵/۳۰.

DOI:10.24200/J30.2018.1919.2014

مهاجرت الکتریکی^۲ و الکتروفورسیز^۳ است.^[۲] روش الکتروکینتیک نسبت به سایر روش‌های تصفیه، کارایی بهتری در خاک‌های با نفوذپذیری پایین دارد.^[۸-۱۱] از دیگر مزایای روش الکتروکینتیک می‌توان به قابلیت تصفیه‌ی درجا، کوتاه بودن نسبی زمان تصفیه و کاهش هزینه‌ها اشاره کرد. با این حال، در این خصوص نیز محدودیت‌هایی وجود دارد که از مهم‌ترین آن‌ها تغییرات شدید pH در اطراف الکترودها و همچنین راندمان حذف ناچیز ترکیب‌های آلی غیرقطبی به دلیل حلالیت ضعیف و ظرفیت واجدبی کم است.^[۱۱]

به منظور کاهش محدودیت‌های هر یک از روش‌های ذکر شده و بهبود راندمان تصفیه‌ی آلاینده‌های مختلف، برخی پژوهشگران به تلفیق دو روش مذکور (با عنوان روش بیوالکتروکینتیک) پرداخته و به نتایج مطلوبی در مقیاس آزمایشگاهی دست یافته‌اند.^[۱۲-۱۴] روش بیوالکتروکینتیک، روشی است که در آن با هدف رساندن میکروارگانیسم‌ها، گیرنده‌های الکترون و مواد مغذی به آلاینده‌ها، یا حرکت دادن آلاینده‌ها به سمت میکروارگانیسم‌ها توسط میدان الکتریکی، تصفیه‌ی بیولوژیکی با فرایند الکتروکینتیک همراه می‌شود.^[۲۵] به طور کلی، تلفیق فرایند الکتروکینتیک و پاک‌سازی بیولوژیکی به این منظور طراحی می‌شود که میکروارگانیسم‌های موجود

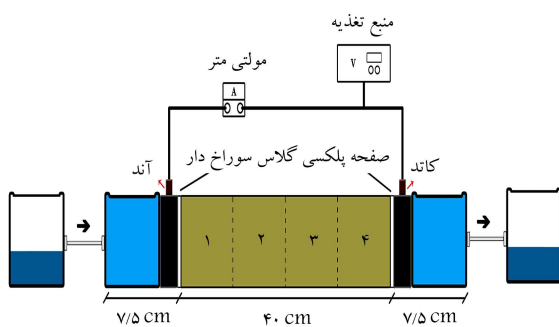
b.khat aei@modares.ac.ir
mokht arani@modares.ac.ir
h-ganji@modares.ac.ir

بیوالکتروکینتیک (بدون تعویض قطبیت) باعث مصرف بالای ترکیب‌های با فوری برای کنترل pH در اطراف الکترودها و تأثیر منفی آن در فعالیت میکروبی و همچنین گرم شدن محیط خاک شده است، در حالی که با تعویض قطبیت الکترودها مشکلات مذکور تعدیل شده است.^[۲۳] همچنین در سال ۲۰۱۶ در تصفیه‌ی خاک کائولن آلوده به دیزل با استفاده از فرایند بیوالکتروکینتیک با تعویض قطبیت، نتایج مشابهی گزارش شده است.^[۲۴] در تصفیه‌ی هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌یی به روش بیوالکتروکینتیک نیز تعویض قطبیت باعث ایجاد جریان الکتریکی پایدار، رشد بهتر میکروبه‌ها و تجزیه‌ی بیولوژیکی مؤثرتر آلاینده (راندمان حذف ۶۰٪) شده است.^[۲۴] با توجه به آلودگی خاک اطراف پالایشگاه‌ها و مخازن ذخیره‌ی نفت به نفت خام و ضرورت پاک‌سازی آن‌ها، در پژوهش حاضر به بررسی روش بیوالکتروکینتیک در تصفیه‌ی خاک رسی آلوده شده به نفت خام، در مقیاس آزمایشگاهی پرداخته شده است. طبق اطلاعات نویسندگان نوشتار حاضر، تاکنون از سویه‌ی باکتری *Pseudomonas Putida* به تنهایی در تصفیه‌ی خاک آلوده به نفت خام استفاده نشده است. لذا در پژوهش حاضر، تک سویه‌ی مذکور جهت تجزیه‌ی بیولوژیکی نفت خام تحت میدان الکتریکی استفاده شده است، تا آثار احتمالی تعویض قطبیت میدان الکتریکی در حیات و عملکرد سویه‌ی مذکور بررسی شود. همچنین در پژوهش حاضر به ارزیابی اثر تعویض متناوب قطبیت در شرایط خاک، تکثیر باکتری و تجزیه‌ی بیولوژیکی نفت خام پرداخته شده است. به علاوه، تأثیر پارامترهایی مانند میزان آلودگی و شدت میدان الکتریکی اعمال شده در عملکرد سیستم تصفیه مطالعه شده است.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. سیستم مورد استفاده

در پژوهش حاضر که در مقیاس آزمایشگاهی انجام شده است، از راکتورهای استوانه‌یی شکل به طول ۵۵ و قطر ۵ سانتی‌متر از جنس پلکسی‌گلاس، مطابق شکل ۱ جهت انجام آزمایش‌ها استفاده شد. در راکتورهای مذکور، محفظه‌ی میانی به طول ۴۰ سانتی‌متر، محل قرارگیری خاک و محفظه‌های طرفین هر یک به طول ۷/۵ سانتی‌متر جهت محلول‌های الکترولیت در نظر گرفته شد. در مجاورت محفظه‌ی آند و کاتد از ظروف مناسب، به ترتیب جهت نگهداری الکترولیت مصرفی و جمع‌آوری الکترولیت منتقل شده به سمت کاتد استفاده شد. همچنین محفظه‌های الکترولیت و محل قرارگیری خاک توسط صفحات دایره‌یی مشبک، از جنس پلکسی‌گلاس از یکدیگر جدا شدند. به منظور برقراری جریان نیز الکترودهای مسطح دایره‌یی به قطر ۴/۸ و ضخامت ۱ سانتی‌متر از جنس گرافیت استفاده شد.



شکل ۱. شماتیک راکتور بیوالکتروکینتیک.

در خاک با استفاده از مواد مغذی ویژه‌یی فعال شوند تا با رشد، تکثیر و متابولیسم آن‌ها، بتوان آلاینده‌های آلی را در خاک تجزیه کرد. به عبارت دیگر، در روش تلفیقی بیوالکتروکینتیک از یک طرف در فرایند الکتروکینتیک از طریق مکانیسم‌های الکترواسمز، مهاجرت الکتریکی و ...، جابه‌جایی آلاینده، باکتری‌ها و الکترولیت تسهیل می‌شود و از سوی دیگر، در فرایند بیولوژیکی با تجزیه‌ی آلاینده در هر بخش از خاک، زمان بر بودن روش الکتروکینتیک تعدیل می‌شود.

مزیت اصلی فرایند بیوالکتروکینتیک، قابلیت انتقال جهت دار باکتری‌ها از نقاط تزریق به سمت آلاینده است.^[۲۵] همچنین از فرایند بیوالکتروکینتیک جهت حذف انواع آلاینده (فلزات سنگین، رادیونوکلوئیدها و برخی مواد آلی فرار) از خاک‌های اشباع و غیراشباع، ماسه‌یی، سیلتی، رس‌های ریزدانه و نیز رسوب‌ها استفاده می‌شود. مزیت دیگر فرایند تلفیقی بیوالکتروکینتیک، پخش یکنواخت مواد مغذی در کل خاک و یا هدایت به سمت موقعیت خاص است. در مطالعات مختلف بیوالکتروکینتیک تاکنون از انواع باکتری‌ها، به صورت تک یا مخلوط در تصفیه‌ی خاک استفاده شده است.

برخی پژوهشگران در سال ۲۰۱۰ با انجام آزمایش روی خاک آلوده به نفت، از ترکیب باکتری‌های شامل *Pseudomonas aeruginosa*، *Bacillus sp.* و ... استفاده کرده‌اند.^[۱۹] در پژوهشی در سال ۲۰۱۱ نیز با کاربرد مخلوط باکتری‌های نفت‌خوار تحت گرادیان ولتاژ (۲ V/cm)، پس از ۱۰ روز، راندمان حذف ۳۶٪ حاصل شد.^[۲۶] همچنین در سال ۲۰۰۵، روش بیوالکتروکینتیک در تصفیه‌ی کائولن آلوده به پنتادکان در حضور باکتری‌های *Pseudomonas sp.* بررسی شد و بیشترین راندمان حذف آلاینده (حدود ۷۷٪) در 0.763 mA/cm^2 بعد از ۱۴ روز به دست آمد.^[۲۶] در مطالعه‌ی دیگر (۲۰۱۱)، نیز تصفیه‌ی خاک آلوده به دیزل با استفاده از روش بیوالکتروکینتیک با بهره‌گیری از مخلوط سویه‌های *Paenibacillus*، *Bacillus* و *Brevibacillus* بررسی شد.^[۲۷] همچنین در پژوهشی (۲۰۱۴)، از مخلوط ۱۳ سویه‌ی باکتری نفت‌خوار جهت تصفیه‌ی بیوالکتروکینتیک خاک لومی آلوده به نفت خام استفاده شد و راندمان حذف نفت پس از ۶۰ روز آزمایش، حدود ۲۵٪ به دست آمد.^[۲۸] باکتری‌های *Bacillus sp.* نیز در تصفیه‌ی بیولوژیکی خاک آلوده به گازوئیل تحت میدان الکتریکی، عملکرد خوبی از خود نشان داده‌اند.^[۲۹]

در کنار مزایای بیان شده برای روش بیوالکتروکینتیک، عواملی وجود دارد که در کارایی آن اثر منفی می‌گذارد و کاربرد آن را محدود می‌سازد. مهم‌ترین محدودیت در تلفیق روش الکتروکینتیک و تصفیه‌ی بیولوژیکی، تغییرات pH خاک حین فرایند الکتروکینتیک است که به علت الکترولیز آب در اطراف الکترودها ایجاد می‌شود. از آنجایی که میکروارگانیسم‌ها معمولاً در محدوده‌ی pH خنثی (۵ تا ۸)، فعالیت بهینه دارند؛ لذا تشکیل جبهه‌ی اسیدی و قلیایی به ترتیب در مجاورت الکترودهای آند و کاتد باعث کاهش جمعیت میکروبی و در نتیجه کاهش راندمان سیستم می‌شود.^[۲۹،۳۰]

یکی از راهکارهای پیشنهادی جهت حل مشکل ذکر شده، تعویض متناوب قطبیت الکترودهاست. در پژوهشی در سال ۲۰۰۵، روش الکتروکینتیک غیر یکنواخت (با معکوس شدن متناوب قطبیت) به منظور تسریع در انتقال و تجزیه‌ی بیولوژیکی درجای فنل، توسط مخلوط باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی فنل بررسی شد و براساس نتایج آن، تعویض قطبیت ضمن توزیع یکنواخت تر فنل، باعث افزایش راندمان حذف آن از خاک شده است.^[۳۰] مطالعات مشابهی در سال ۲۰۰۷، در تصفیه‌ی بیولوژیکی خاک آلوده به دی‌کاربونفلن انجام شده است که در آن با تعویض قطبیت میدان الکتریکی ضمن افزایش واجدیی و حرکت آلاینده در خاک، راندمان حذف ۷۳٪ از آلاینده طی ۱۵ روز گزارش شده است.^[۳۱]

در پژوهش دیگری (۲۰۱۵)، حذف دیزل از خاک آلوده با استفاده از فرایند

۲.۲. روش انجام آزمایش

نفت خام مورد استفاده در پژوهش حاضر با چگالی ۰/۷۷۵ گرم بر سانتی متر مکعب از شرکت بهره برداری نفت و گاز آقاجاری تهیه شد. در پژوهش حاضر، همچنین کلیه آزمایش‌ها با استفاده از خاک با مخلوطی از ۰/۷۵ رس کائولن و ۰/۲۵ ماسه ریزدانه انجام شد. از آنجا که رس اولیه مورد استفاده، توده‌های به هم چسبیده داشت، ابتدا خاک به خوبی کوبیده و سپس از الک ۲ میلی متری (الک نمره ۱۰) عبور داده شد. این تذکر لازم است که براساس دسته بندی انجام شده توسط اداره کشاورزی ایالات متحده (USDA)^۴، خاک مورد استفاده از نوع رس طبقه بندی شده است.^[۳۵]

در پژوهش حاضر، جهت انجام کلیه آزمایش‌ها، خاک حاوی غلظت مشخص از نفت خام با رطوبت ۲۸٪ استفاده شد. همچنین از محلول نوترینت برآ^۵ به عنوان الکترولیت استفاده شد. پس از قرار دادن خاک آلوده در داخل سلول، الکترودها در دو طرف آن جا گرفتند و محلول الکترولیت در محفظه‌های آند و کاتد ریخته شد. در نهایت نیز با برقراری جریان برق مستقیم با اختلاف پتانسیل ثابت توسط منبع تغذیه، آزمایش آغاز شد. همچنین به منظور اعمال جریان الکتریکی، از یک منبع تغذیه‌ی جریان مستقیم (مدل HY50 ۳۰ ساخت شرکت رایان نیک) با قابلیت تنظیم اختلاف پتانسیل ۵۰- ولت و بیشینه‌ی شدت جریان ۳۰ آمپر استفاده شد. شدت میدان الکتریکی مورد نظر در طول آزمایش به کمک مولتی متر اندازه گیری و کنترل شد.

به منظور فراهم کردن جریان الکترواسمز پیوسته و جلوگیری از معکوس شدن آن، کاهش سطح الکترولیت در محفظه‌ی آند و افزایش سطح آن در محفظه‌ی کاتد مرتباً کنترل و تنظیم شد. این تذکر لازم است که در آزمایش‌های بیوالکتروکینتیک غیر یکنواخت، یک دستگاه تعویض قطبیت در مدار الکتریکی قرار گرفت و به کمک آن، هر یک ساعت جهت جریان الکتریکی تغییر یافت. در جدول ۱، مشخصات و شرایط تعیین شده برای آزمایش‌های تلفیقی بیوالکتروکینتیک در دو بخش با و بدون تعویض قطبیت ارائه شده است. در پژوهش حاضر با انجام تعدادی آزمایش، علاوه بر ارزیابی تأثیر غلظت اولیه آلاینده، اختلاف پتانسیل اعمال شده و زمان، اثر تعویض قطبیت میدان الکتریکی در روند حذف آلاینده نیز بررسی شد.

۳.۲. سازگاری گونه‌ی میکروبی با نفت خام

سویه باکتری مورد استفاده در پژوهش حاضر، PTC ۱۶۹۴ Pseudomonas Putida

جدول ۱. مشخصات آزمایش‌های تلفیقی بیوالکتروکینتیک.

آزمایش	غلظت نفت (mg/Kg)	گرادیان ولتاژ (V/cm)	زمان (day)	تعویض قطبیت
۱	۴۰۰۰	۱/۲۵	۳۶	-
۲	۶۰۰۰	۱/۲۵	۳۶	-
۳	۶۰۰۰	۱/۵	۳۵	-
۴	۱۰۰۰۰	۱/۵	۳۵	-
۵	۲۰۰۰	۱/۵	۳۵	+
۶	۴۰۰۰	۱/۵	۳۵	+
۷	۶۰۰۰	۱/۵	۳۵	+
۸	۸۰۰۰	۱/۵	۳۵	+
۹	۱۰۰۰۰	۱/۵	۳۵	+

است. داموناس که از کلکسیون میکروارگانیزم‌های صنعتی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. Pseudomonas از جمله باکتری‌های نفت خوار است که اغلب از مکان‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی استخراج می‌شود.^[۳۶] محیط کشت انتخاب شده برای باکتری مذکور، نوترینت برآ^۶ بود که حاوی ۱ گرم عصاره‌ی گوشت، ۲ گرم عصاره‌ی مخمر، ۵ گرم پپتون^۶ و ۵ گرم نمک طعام در یک لیتر آب بوده است.

به منظور جلوگیری از ایجاد شوک و از بین رفتن میکروارگانیزم‌ها در تماس با غلظت بالای نفت خام، در ابتدا اقدام به سازگاری میکروارگانیزم‌ها با آلاینده‌ی نفتی شد. در پژوهش حاضر، از محلول نوترینت برآ^۶ با غلظت (mg/L) ۸۰۰۰ و نیز نفت خام جهت تغذیه‌ی میکروارگانیزم نفت خوار Pseudomonas Putida استفاده شد. در این راستا، ابتدا میکروارگانیزم‌ها توسط فقط محلول نوترینت برآ^۶ خوراک دهی شد و سپس با گذشت زمان با کاستن از غلظت نوترینت برآ^۶، بر غلظت نفت خام تزیقی افزوده شد. در پژوهش حاضر، در ابتدای دوره‌ی سازگاری، مقدار نفت خام برابر با صفر و در انتهای دوره‌ی سازگاری، به ۱۰۰۰۰ mg/L رسید.

۴.۲. تعیین زمان بهینه‌ی رشد میکروارگانیزم

هر میکروارگانیزم، یک منحنی رشد دارد که بسته به گونه‌های مختلف میکروبی، زمان آن متغیر است. هنگامی که میکروارگانیزم به بیشینه‌ی رشد خود می‌رسد، زمان بهینه برای فعالیت آن است. برای به دست آوردن منحنی رشد Pseudomonas Putida، ۸ ارلن ۲۵۰ میلی لیتری هر یک حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت نوترینت برآ^۶ آماده شد. در ادامه، درب هر ارلن با پنبه و فویل بسته شد و در داخل اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. سپس زیر هود لامینار فلو، سویه‌ی باکتری به هر کدام از ارلن‌ها تلقیح شد و داخل شیکر انکوباتور در سرعت ۱۸۰ دور بر دقیقه و دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شد. در نهایت نیز با نمونه‌گیری از ارلن‌ها در زمان‌های مشخص، چگالی نوری^۷ در طول موج ۶۰۰ نانومتر (OD_{۶۰۰}) با دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری و نمودار چگالی نوری نسبت به زمان رسم شد.^[۳۷]

۵.۲. روش آنالیز نمونه‌ها

پس از انجام آزمایش‌ها، از بخش‌های مختلف خاک (۴ بخش در جهت طولی راکتور) و نیز الکترولیت‌ها (در محفظه‌های آند و کاتد) در زمان‌های مورد نظر نمونه برداری و مقادیر pH، درصد رطوبت، کل هیدروکربن‌های نفتی (TPH)^۸ و جمعیت میکروبی اندازه‌گیری شد. در پژوهش حاضر، جهت استخراج و آنالیز نمونه‌های نفتی از حلال تتراکلرواتیلن، سیلیکازل و سولفات سدیم استفاده و غلظت ماده‌ی نفتی توسط دستگاه Infracal TOG/TPH Analyzer ساخت شرکت WILKS تعیین شد. مراحل استخراج TPH و تعیین غلظت آن، طبق دستورالعمل دستگاه TPH متر انجام شد.^[۳۸] به منظور تعیین pH نمونه‌ها نیز طبق استاندارد ROC EPA NIEA S۴۱۰/۶۰ T، ۴ گرم خاک در داخل بشر حاوی ۱۰ سی سی آب مقطر (نسبت خاک به آب برابر با ۱ به ۲/۵) ریخته و مخلوط آب و خاک به مدت ۱۵ دقیقه با شیکر به خوبی هم زده شد. پس از گذشت ۱۰ دقیقه و ته نشینی خاک، pH نمونه با استفاده از دستگاه pH متر Metrohm مدل ۶۹۱ تعیین شد.^[۳۹] جهت اندازه‌گیری رطوبت نمونه‌ها نیز مطابق استاندارد ASTM-D-۲۲۱، ابتدا ۵ گرم خاک درون بوتله‌ی چینی قرار گرفت و وزن آن اندازه‌گیری شد. در ادامه، نمونه‌ی خاک به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۱۰۵ درجه‌ی سلسیوس

نگهداری شد. سپس نمونه مجدداً توزین و درصد رطوبت آن طبق رابطه‌ی ۱ محاسبه شد:

$$(1) \quad 100 \times (\text{وزن مرطوب}) / (\text{وزن خشک} - \text{وزن مرطوب}) = \text{درصد رطوبت}$$

در پژوهش حاضر از محیط کشت نوترینت آگار در روند شمارش باکتری و نیز از سرم فیزیولوژی استریل به‌عنوان حلال رقیق‌کننده استفاده شد. به‌منظور انتقال باکتری‌ها از محیط خاک به رقیق‌کننده، ۱۰ گرم نمونه‌ی خاک به ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل شده در داخل یک ارلن اضافه شد. مخلوط مذکور به شدت تکان داده شد و سپس با استفاده از پیپت استریل، مقدار ۱ میلی‌لیتر از مایع روی محلول استخراج و به یک ویال که حاوی ۹ میلی‌لیتر محلول رقیق‌کننده بود، اضافه شد. در مرحله‌ی بعد، ۱ میلی‌لیتر از محلول ویال اول با ۹ میلی‌لیتر محلول رقیق‌کننده مخلوط و به ویال دوم اضافه شد. این روند تا ویال هشتم تکرار و رقت‌های موردنیاز برای شمارش باکتری آماده شد.

در ادامه، ۰/۱ میلی‌لیتر از هر یک از رقت‌های مذکور به پلیت‌های از قبل آماده شده، حاوی محیط کشت نوترینت آگار منتقل شد. حجم تلقیح شده به هر پلیت، به وسیله‌ی میله‌ی شیشه‌یی استریل به‌طور یکنواخت روی محیط کشت جامد پخش و پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت، اقدام به شمارش کلونی‌های تشکیل شده در سطح محیط کشت آگار شد. در نهایت نیز با در نظر گرفتن تعداد کلونی‌های رشد کرده و عامل رقت هر پلیت، با استفاده از رابطه‌ی ۲، تعداد واحدهای تشکیل دهنده‌ی کلونی در هر گرم خاک خشک محاسبه شد. [۳۹]

$$(2) \quad CFU = \frac{\text{تعداد کلونی‌های تشکیل شده در پلیت}}{\text{وزن خاک خشک} \times \text{فاکتور رقت} \times \text{حجم نمونه برداشت شده}}$$

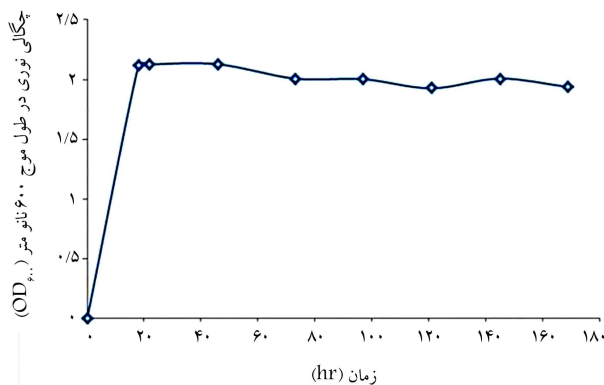
۳. نتایج و بحث

۳.۱. تعیین زمان بهینه‌ی رشد میکروارگانیسم‌ها

در پژوهش حاضر، منحنی تغییرات OD_{۶۰۰} در طول زمان برای گونه‌ی میکروبی مورد استفاده براساس روند ذکر شده در بند ۴.۲، ترسیم و زمان بهینه‌ی رشد میکروارگانیسم‌ها مطابق شکل ۲، حدود ۱۸ ساعت تعیین شد.

۳.۲. آزمایش‌های بیوالکتروکینتیک بدون تعویض قطبیت

در شکل ۳، راندمان حذف آلاینده در طول زمان برای آزمایش‌های بدون تعویض



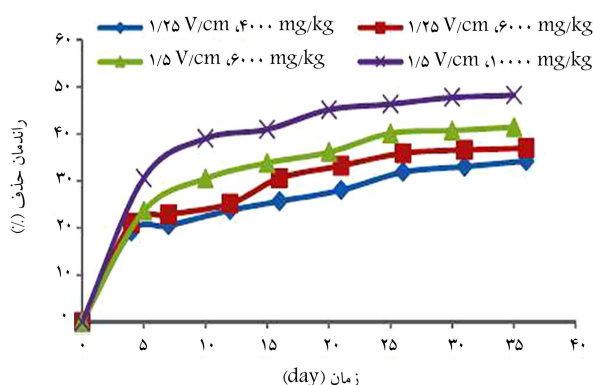
شکل ۲. منحنی رشد سویه‌ی *Pseudomonas Putida*.

قطبیت مشاهده می‌شود، که مطابق آن، کمترین راندمان حذف مربوط به اختلاف پتانسیل ۱/۲۵ ولت بر سانتی‌متر و غلظت نفت ۴۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به میزان ۳۴٪ است، در حالی که با افزایش غلظت نفت به ۶۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، راندمان حذف به حدود ۳۷٪ افزایش یافته است. این تذکر لازم است که در این حالت با افزایش غلظت نفت خام (منبع کربن) برای باکتری‌ها، تکثیر و رشد آن‌ها بیشتر می‌شود و به تبع آن مقدار بیشتری از نفت خام تجزیه و مصرف می‌شود. در ادامه، با ثابت نگه داشتن غلظت نفت و افزایش اختلاف پتانسیل اعمال شده به ۱/۵ ولت بر سانتی‌متر، راندمان حذف به بیش از ۴۱٪ افزایش یافت. بدیهی است که با افزایش گرادیان ولتاژ اعمال شده، میدان الکتریکی قوی‌تری شکل می‌گیرد و در شدت جریان الکترواسمز و مهاجرت الکتریکی اثر مثبت می‌گذارد. از سوی دیگر، افزایش مذکور در راندمان حذف، نشان‌دهنده‌ی تأثیر بیشتر گرادیان ولتاژ نسبت به غلظت اولیه‌ی نفت در راندمان حذف است. همچنین در گرادیان ولتاژ ثابت (۱/۵ ولت بر سانتی‌متر) با افزایش غلظت نفت به ۱۰۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، راندمان حذف بیش از ۴۸٪ حاصل شد. در پژوهش انجام شده‌ی در سال ۲۰۰۵ نیز افزایش راندمان حذف در اثر افزایش غلظت اولیه‌ی آلاینده (پنتادکان) گزارش شده است. [۲۶] به‌علاوه، از شکل ۳ این‌طور برداشت می‌شود که روند تغییر راندمان حذف نسبت به زمان در ۴ آزمایش مذکور مشابه یکدیگر است.

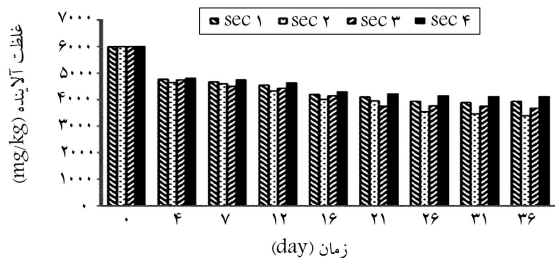
جهت بررسی روند تغییر غلظت نفت خام، از بخش‌های مختلف هر راکتور در فواصل زمانی مشخص نمونه‌برداری شد. شکل ۴، نشان‌دهنده‌ی نتایج آزمایش‌های انجام شده در بخش کنونی است. همان‌طور که پیشتر نیز بیان شد، در آزمایش‌های بدون تعویض قطبیت، pH خاک به‌شدت متغیر است و با تشکیل ناحیه‌ی اسیدی و بازی به ترتیب در مجاورت آند و کاتد، میزان تجزیه‌ی میکروبی کاهش می‌یابد. همان‌طور که در شکل ۴ نیز مشاهده می‌شود، میزان حذف آلاینده در مجاورت آند و کاتد کمتر از بخش میانی راکتور بوده است. از سوی دیگر، وقتی pH در آند به میزان زیادی کم می‌شود، حرکت آب منفذی به‌شدت کاهش می‌یابد و با گذشت زمان از جریان الکترواسمز کاسته و در نتیجه حرکت الکترولیت و نیز باکتری‌های در خاک کم می‌شود. [۲۹] بنابراین از آنجایی که به علت غیرقطبی و نامحلول بودن نفت خام در آب، آلاینده‌ی مذکور در راکتور حرکتی ندارد و محیط کشت و باکتری‌ها نیز فقط از طریق جریان الکترواسمز جابه‌جا می‌شوند، نرخ تجزیه کاهش می‌یابد.

۳.۳. آزمایش‌های بیوالکتروکینتیک با تعویض قطبیت

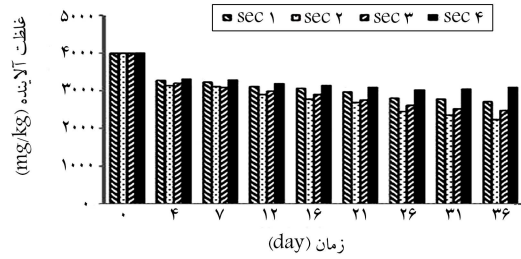
شکل ۵، راندمان حذف آلاینده در طول زمان برای آزمایش‌های با تعویض قطبیت را



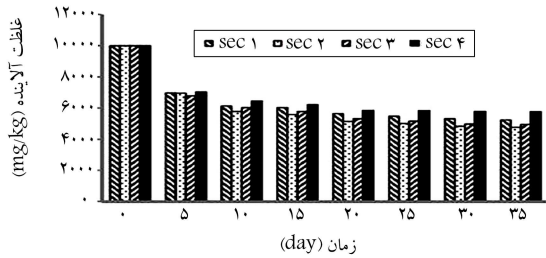
شکل ۳. متوسط راندمان حذف آلاینده در آزمایش‌های بیوالکتروکینتیک بدون تعویض قطبیت.



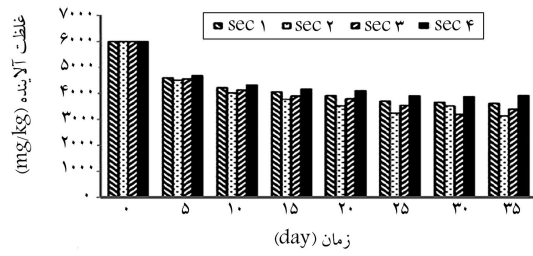
ب) گرادیان ولتاژ ۱/۵ V/cm، غلظت نفت خام ۶۰۰۰ mg/kg



الف) گرادیان ولتاژ ۱/۵ V/cm، غلظت نفت خام ۴۰۰۰ mg/kg

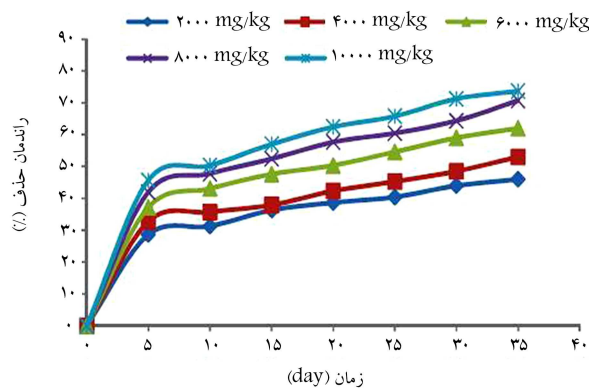


ت) گرادیان ولتاژ ۱/۵ V/cm، غلظت نفت خام ۱۰۰۰۰ mg/kg



پ) گرادیان ولتاژ ۱/۵ V/cm، غلظت نفت خام ۶۰۰۰ mg/kg

شکل ۴. تغییر غلظت آلاینده در بخش‌های مختلف راکتور در فرایند بیوالکتروکینتیک بدون تعویض قطبیت.



شکل ۵. متوسط راندمان حذف آلاینده در آزمایش‌های بیوالکتروکینتیک با تعویض قطبیت.

است که باکتری‌ها در فرایند با تعویض قطبیت بدون توجه به جهت میدان الکتریکی، در اثر دی‌الکتروفورسیز به سمت الکترودها حرکت می‌کنند.^[۱۷] بدین ترتیب، میزان مصرف آلاینده توسط باکتری‌ها در اطراف الکترودها بیشتر می‌شود. مشابه این روند در پژوهشی در سال ۲۰۰۹ نیز گزارش شده است.^[۲۹]

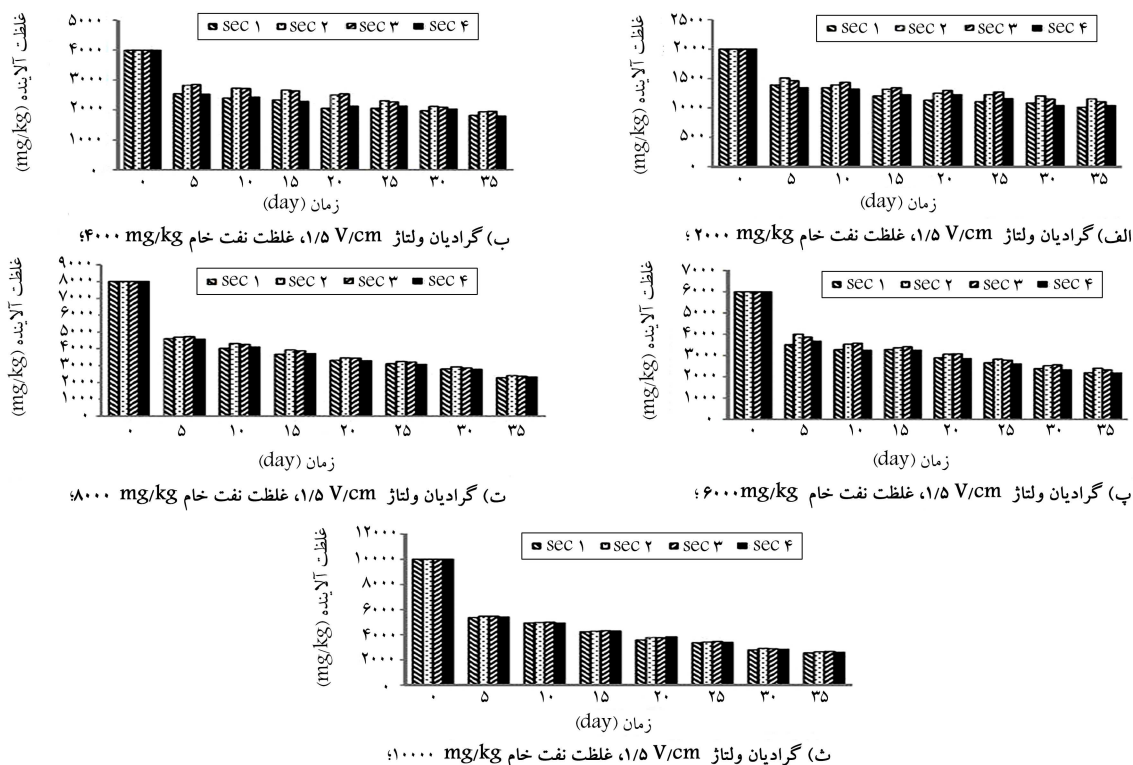
۴.۳. بررسی تغییرات pH و درصد رطوبت

همان‌طور که پیشتر اشاره شد، در فرایند الکتروکینتیک بدون تعویض قطبیت به علت کاهش شدید pH در آند، حرکت آب منفذی و جریان الکترواسمز به شدت کم می‌شود. از طرف دیگر، به دلیل قلیایی شدن محیط در اطراف کاتد، پدیده‌ی سیمانی شدن خاک ممکن است رخ دهد.^[۲۹] بنابراین با گذشت زمان در اثر کاهش انتقال باکتری‌ها از نرخ تجزیه‌ی آلاینده کاسته خواهد شد.

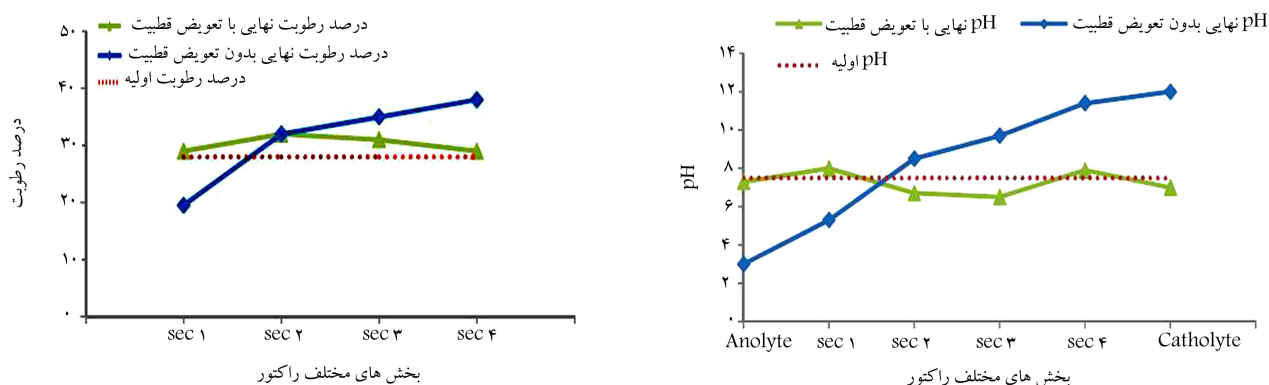
همان‌طور که در شکل ۷ مشاهده می‌شود، در فرایند الکتروکینتیک بدون تعویض قطبیت به علت تشکیل جبهه‌های اسیدی و بازی در مجاورت الکترودهای آند و کاتد، میزان pH در آنولیت و کاتولیت به ترتیب از ۳ تا ۱۲ در تغییر بوده است. این

نشان می‌دهد. جهت امکان مقایسه‌ی نتایج بخش کنونی با آزمایش‌های بدون تعویض قطبیت، در کلیه‌ی آزمایش‌ها اختلاف پتانسیل ثابت ۱/۵ ولت بر سانتی‌متر استفاده شده است. در آزمایش‌های مذکور با کاربرد سیستم تعویض قطبیت، جهت قطبیت الکترودها هر ۱ ساعت تغییر یافت. علت انتخاب زمان تناوب ۱ ساعت، مؤثرتر بودن زمان تناوب ۱ ساعت طبق مطالعاتی در سال‌های ۲۰۰۵ و ۲۰۰۶ بوده است.^[۳۰] مطابق شکل ۵، راندمان حذف نفت خام ارتباط مستقیمی با غلظت آلاینده‌ی مذکور داشته است، به طوری که با افزایش غلظت نفت، راندمان حذف با روند مشابهی افزایش یافته است. در آزمایش‌های اشاره شده با کاربرد غلظت‌های مختلف نفت خام (۲۰۰۰، ۴۰۰۰، ۶۰۰۰، ۸۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، به ترتیب راندمان‌های حذف ۴۶، ۵۳/۱، ۶۲، ۷۰/۷۲ و ۷۳/۷ درصد در زمان ۳۵ روز حاصل شد. در بیان علت این امر می‌توان گفت که در آزمایش‌های تلفیقی بیوالکتروکینتیک، با افزایش غلظت نفت، مواد غذایی قابل دسترس میکروارگانیسم‌ها افزوده و در نتیجه فعالیت میکروبی بیشتر می‌شود. نتایج مشابهی در مطالعه‌ی در سال ۲۰۰۵ بر روی تصفیه‌ی خاک آلوده به هیدروکربن‌های نفتی گزارش شده است.^[۲۶] به منظور ارزیابی نحوه‌ی تغییر غلظت نفت خام در آزمایش‌های بیوالکتروکینتیک با تعویض قطبیت، از بخش‌های مختلف هر راکتور در فواصل زمانی مشخص نمونه‌برداری شد. نتایج آزمایش‌های انجام‌شده در بخش حاضر در شکل ۶ ارائه شده است.

مطابق شکل ۶، با افزایش غلظت آلاینده از ۲۰۰۰ به ۱۰۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، راندمان حذف آلاینده در سیستم افزایش یافته است. همان‌طور که پیشتر نیز بیان شد، با افزایش غلظت نفت خام در دسترس باکتری‌ها، تکثیر و رشد فعالیت آن‌ها افزایش می‌یابد و در نتیجه میزان بیشتری از نفت خام تجزیه و مصرف می‌شود. دلیل دیگر افزایش راندمان حذف نفت خام را می‌توان به ضعیف شدن پیوند آلاینده با ذرات خاک در اثر افزایش غلظت نفت مرتبط دانست.^[۲۶] همچنین در پژوهش حاضر، راندمان حذف در بخش‌های میانی راکتور نسبت به بخش‌های مجاور آند و کاتد کمتر بود که علت آن را می‌توان به بیشتر بودن تعداد باکتری‌های در مجاورت الکترودها در مقایسه با بخش میانی راکتور نسبت داد. این تذکر لازم



شکل ۶. تغییر غلظت آلاینده در بخش‌های مختلف راکتور در فرایند بیوالکتروکینتیک با تعویض قطبیت.



شکل ۸. تغییرات درصد رطوبت در بخش‌های مختلف راکتور با روش بیوالکتروکینتیک با و بدون تعویض قطبیت (گرادیان ولتاژ ۱/۵ ولت بر سانتی‌متر، غلظت نفت خام ۶۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و زمان ۳۵ روز).

شکل ۷. تغییرات pH در بخش‌های مختلف راکتور با روش بیوالکتروکینتیک با و بدون تعویض قطبیت (گرادیان ولتاژ ۱/۵ ولت بر سانتی‌متر، غلظت نفت خام ۶۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و زمان ۳۵ روز).

نتایج ذکر شده در مطالعات انجام شده‌ی در سال‌های ۲۰۰۵، ۲۰۰۹، ۲۰۱۲، ۲۰۱۵ و ۲۰۱۶ نیز گزارش شده است. [۳۴-۳۲، ۳۰، ۲۴، ۱۷]

۵.۳. بررسی تغییرات جمعیت میکروبی

شکل ۹، روند تغییرات جمعیت میکروبی در بخش‌های مختلف خاک را در زمان‌های مختلف، در آزمایش بیوالکتروکینتیک بدون تعویض قطبیت نشان می‌دهد. همان‌طور که قبلاً نیز بدان اشاره شد، تلقیح باکتری درون خاک قبل از شروع آزمایش به صورت سراسری بود و باکتری‌های آداپته شده کاملاً با خاک مخلوط شده‌اند. در نتیجه تعداد اولیه‌ی باکتری‌ها در بخش‌های مختلف راکتور تقریباً یکسان بوده است. گرچه به علت شوک الکتریکی جزئی در شروع آزمایش، تعداد اولیه‌ی باکتری‌ها کم می‌شود،

در حالی است که در آزمایش‌های با تعویض قطبیت، به علت تغییر متناوب جهت جریان الکترواسمز و به تبع آن جهت حرکت جبهه‌های اسیدی و بازی در هر ساعت، میزان pH در بخش‌های مختلف راکتور در محدوده‌ی ۶/۵ تا ۸ در تغییر بوده، که محدوده‌ی مناسبی برای انجام فرایندهای بیولوژیکی است.

از سوی دیگر مطابق شکل ۸، در آزمایش‌های بدون تعویض قطبیت، به علت جریان یک طرفه‌ی الکترواسمز، میزان درصد رطوبت در مجاورت آند ۷ تا ۱۰ درصد کاهش و در مجاورت کاتد ۷ تا ۱۳ درصد افزایش یافته است. این در حالی است که در آزمایش‌های با تعویض قطبیت، میزان تغییرات درصد رطوبت در بخش‌های مختلف خاک ناچیز بود و فقط در بخش میانی راکتور، نوسانات جزئی که احتمالاً ناشی از خروج الکترولیت از خاک مجاور آند و کاتد است، مشاهده می‌شود. مشابه

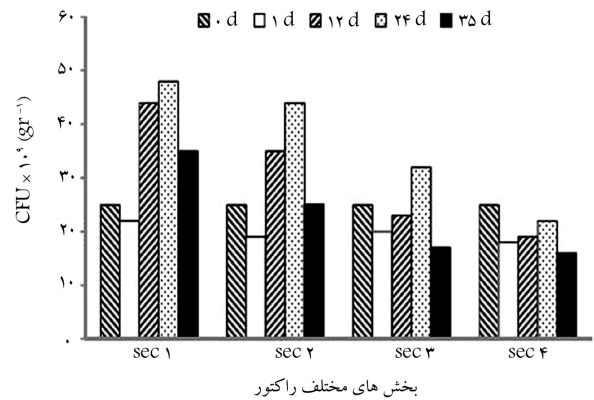
در نتیجه افزایش جمعیت میکروبی شده است.^[۲۲] در مطالعات سایر پژوهشگران نیز مشاهده شده است که فرایند بیوالکتروکینتیک با قطبیت متغیر برای رشد باکتری ها و فعالیت آنزیمی آن ها مناسب است و ویژگی های خاک را یکنواخت نگه می دارد.^[۳۲،۳۳] بنابراین به علت کنترل pH در فرایند با تعویض قطبیت، شرایط مساعدتری برای حیات باکتری ها در طول آزمایش فراهم بوده است. این امر منجر به رشد و تکثیر بیشتر باکتری ها و در نتیجه افزایش میزان تجزیه ی زیستی نفت خام شده است.^[۱۷] همچنین همان طور که پیشتر توضیح داده شد، تعداد باکتری ها در مجاورت الکترودها بیشتر از بخش میانی راکتور هستند که علت این امر به حرکت باکتری ها در اثر دیالکتروفورسیز در میدان الکتریکی غیر یکنواخت مرتبط است. بنابراین تعویض قطبیت میدان الکتریکی اعمال شده نه فقط اثر منفی و نامطلوب در حیات سوبه ی باکتری *Pseudomonas Putida* نداشته است، بلکه رشد و تکثیر آن را نیز بهبود بخشیده است.

۴. نتیجه گیری

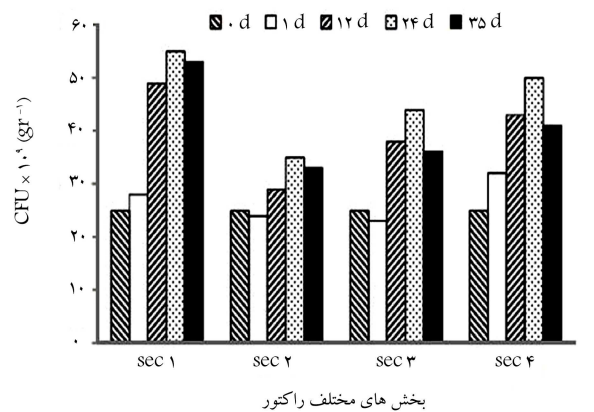
در پژوهش حاضر، اثر تعویض متناوب قطبیت الکترودها در عملکرد فرایند بیوالکتروکینتیک به منظور تصفیه ی خاک رسی آلوده به نفت خام در حضور سوبه ی *Pseudomonas Putida* و در مقیاس آزمایشگاهی بررسی شد. براساس نتایج حاصل، در فرایند بیوالکتروکینتیک بدون تعویض قطبیت با اعمال اختلاف پتانسیل ۱٫۵ ولت بر سانتی متر به توده ی خاک آلوده به ۶۰۰۰ میلی گرم نفت خام بر کیلوگرم خاک، راندمان حذف ۴۱٪ حاصل شد. در شرایط مذکور، تعویض متناوب قطبیت باعث افزایش ۲۰ درصدی راندمان حذف نفت خام از خاک شد. پایین بودن نسبی راندمان حذف در فرایند بیوالکتروکینتیک بدون تعویض قطبیت را می توان به تغییرات شدید pH و رطوبت در طول راکتور و در نتیجه تأثیر آن در جریان الکترواسمز و کاهش فعالیت میکروبی با گذشت زمان مرتبط دانست. این در حالی است که با تعویض متناوب قطبیت و تثبیت pH در بازه ی ۶٫۵ تا ۸ و تغییرات ناچیز رطوبت خاک، فعالیت میکروبی افزایش و راندمان حذف بهبود می یابد. در پژوهش حاضر، همچنین اثر تغییر غلظت اولیه ی آلاینده و گرادیان ولتاژ اعمال شده در راندمان حذف نفت خام بررسی شد. براساس نتایج آزمایش ها، در فرایند بیوالکتروکینتیک (با و بدون تعویض قطبیت) با افزایش غلظت اولیه ی نفت خام تا ۱۰۰۰۰ میلی گرم در لیتر میزان فعالیت میکروبی افزایش یافته است که باعث بهبود تجزیه و حذف نفت خام از خاک می شود. همچنین با اعمال اختلاف پتانسیل بیشتر، میدان الکتریکی قوی تری بر سیستم حاکم شده است، که با انتقال بیشتر مواد، باعث افزایش راندمان حذف آلاینده می شود. در پژوهش حاضر، تعویض قطبیت میدان الکتریکی اعمال شده نه فقط اثر منفی و نامطلوب در حیات سوبه ی باکتری *Pseudomonas Putida* نداشته است، بلکه باعث افزایش میزان رشد و تکثیر سلولی نیز شده است. براساس نتایج پژوهش حاضر، فرایند بیوالکتروکینتیک (با تعویض قطبیت)، علی رغم زمان بردن و مصرف انرژی نسبتاً بالا، در تصفیه ی درجای خاک های ریزدانه ی آلوده به مواد نفتی حتی در مقیاس واقعی می تواند استفاده شود.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از اداری پژوهش دانشگاه تربیت مدرس برای حمایت مالی از پژوهش حاضر تشکر و قدردانی می شود.



شکل ۹. روند تغییرات جمعیت میکروبی در بخش های مختلف راکتور بیوالکتروکینتیک بدون تعویض قطبیت (گرادیان ولتاژ ۱٫۵ ولت بر سانتی متر، غلظت نفت خام ۶۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم و زمان ۳۵ روز).



شکل ۱۰. روند تغییرات جمعیت میکروبی در بخش های مختلف راکتور بیوالکتروکینتیک با تعویض قطبیت (گرادیان ولتاژ ۱٫۵ ولت بر سانتی متر، غلظت نفت خام ۶۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم و زمان ۳۵ روز).

ولی با گذشت زمان به رشد و تکثیر خود ادامه می دهند.

از آنجا که باکتری ها در شرایط pH خنثی و قلیایی، با سطحی منفی دارند، تحت مهاجرت الکتریکی و الکتروفورسیز به سمت آند حرکت می کنند.^[۲۶] از سوی دیگر، جریان الکترواسمز قادر است باکتری ها را همراه خود از آند به سمت کاتد انتقال دهد. بنابراین هر سه مکانیسم یاد شده در انتقال باکتری ها اثر دارند. با توجه به شکل ۹ مشاهده می شود که تعداد باکتری ها در خاک مجاور آند بیشتر از کاتد هستند؛ لذا می توان نتیجه گرفت که در فرایند مذکور، مکانیسم مهاجرت الکتریکی نقش بیشتری در انتقال باکتری ها دارد. از سوی دیگر، به علت تغییرات شدید pH در طول زمان، جبهه ی اسیدی و بازی قوی شکل گرفته در آند و کاتد اثر منفی در حیات باکتری ها می گذارد و مطابق شکل ۹، در انتهای آزمایش (پس از گذشت ۳۵ روز) تعداد باکتری به میزان محسوسی کاهش می یابد. در مطالعاتی در سال های ۲۰۰۹ و ۲۰۱۰ نیز نتیجه یی مشابه گزارش شده است.^[۲۱،۱۷]

تغییرات جمعیت میکروبی در بخش های مختلف راکتور بیوالکتروکینتیک با تعویض قطبیت نیز در شکل ۱۰ ارائه شده است. همان طور که مشاهده می شود، تعویض قطبیت نه فقط باعث توزیع یکنواخت تر باکتری ها نسبت به حالت بدون تعویض قطبیت شده است، بلکه با یکنواخت کردن ویژگی های خاک مانند رطوبت و pH و همچنین توزیع مواد مغذی در داخل راکتور باعث افزایش فعالیت باکتری ها و

پانوشتها

1. electrolysis
2. electromigration
3. electrophoresis
4. United States department of agriculture
5. nutrient broth
6. peptone
7. optical density
8. total petroleum hydrocarbons

منابع (References)

1. Yeung, A.T. "Remediation technologies for contaminated sites", In: Advances in Environmental Geotechnics, Zhejiang University Press, Hangzhou, paper No: 328-369 (2010).
2. Virkutyte, J., Sillanpaa, M. and Lotostenmaa, P. "Electrokinetic soil remediation-critical overview", *Science of the Total Environment*, **289**(1), pp. 97-121 (2002).
3. Acar, Y.B. and Alshawabkeh, A.N. "The principles of electrokinetics remediation", *Env. Sci. Technol.*, **27**(13), pp. 2638-2647 (1993).
4. Lageman, R. "Electroreclamation: Applications in Netherlands", *Environ. Sci. Technol.*, **27**(13), pp. 2648-2650 (1993).
5. Mitchell, J.K. "Fundamentals of Soil Behavior", John Wiley & Sons, New York (1993).
6. Ottosen, L.M., Hansen, H.K. and Hansen, C.B. "Water splitting at ion-exchange membranes and potential differences in soil during electro-dialytic soil remediation", *J. Appl. Electrochem*, **30**(11), pp. 1199-1207 (2000).
7. Pamukcu, S. and Wittle, J.K. "Electrokinetic removal of selected heavy metals from soil", *Environ. Prog.*, **11**(3), pp. 241-250 (1992).
8. Cameselle, C. and Reddy, K.R. "Development and enhancement of electro-osmotic flow for the removal of contaminants from soils", *Electrochim. Acta*, **86**, pp. 10-22 (2012).
9. Ghazanfari, E. and Pamukcu, S. "Mathematical modeling of electrokinetic transport and enhanced oil recovery in porous geo-media", In: Chilingar, G.V., Haroun, M. (Eds.), *Electrokinetics for Petroleum and Environmental Engineers*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 177-236 (2014).
10. Paillat, T., Moreau, E., Grimaud, P.O. and et al. "Electrokinetic phenomena in porous media applied to soil decontamination", *IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insul.*, **7**(5), 693-704 (2000).
11. Huang, D., Xu, Q., Cheng, J. and et al. "Electrokinetic remediation and its combined technologies for removal of organic pollutants from contaminated soils", *Electrochemical Science*, **7**(5), pp. 4528-4544 (2012).
12. Jackson, W.A., Jeon, M.A., Pardue, J.H. and et al. "Enhanced natural attenuation of perchlorate in soils using electrokinetic injection", In: 6th International In Situ and On Site Bioremediation Symposium, paper no: 273-280 (2001).
13. Wick, L.Y., Mattle, P.A., Wattiau, P. and et al. "Electrokinetic transport of PAH-degrading bacteria in model aquifers and soil", *Environmental Science & Technology*, **38**(17), pp. 4596-4602 (2004).
14. Wick, L.Y., Shi, L. and Harms, H. "Electro-bioremediation of hydrophobic organic soil-contaminants: A review of fundamental interactions", *Electrochimica Acta*, **52**(10), pp. 3441-3448 (2007).
15. Wick, L.Y., Buchholz, F., Fetzer, I. and et al. "Responses of soil microbial communities to weak electric fields", *Science of the Total Environment*, **408**(20), pp. 4886-4893 (2010).
16. Lohner, S.T., Katzoreck, D. and Tiehm, A. "Electromigration of microbial electron acceptors and nutrients: (II) transport in groundwater", *Environmental Science and Health: Part A*, **43**(8), pp. 922-925 (2008).
17. Harbottle, M.J., Lear, G., Sills, G.C. and et al. "Enhanced biodegradation of pentachlorophenol in unsaturated soil using reversed field electrokinetics", *Environmental management*, **90**(5), pp. 1893-1900 (2009).
18. Lee, K.Y. and Kim, K.W. "Heavy metal removal from shooting range soil by hybrid electrokinetics with bacteria and enhancing agents", *Environmental Science & Technology*, **44**(24), pp. 9482-9487 (2010).
19. Li, T., Guo, S., Wu, B. and et al. "Effect of electric intensity on the microbial degradation of petroleum pollutants in soil", *Environmental Sciences*, **22**(9), pp. 1381-1386 (2010).
20. Li, X., Liu, Y., Zeng, G. and et al. "Direct current stimulation of thiobacillus ferrooxidans bacterial metabolism in a bioelectrical reactor without cation-specific membrane", *Bioresource Technology*, **101**(15), pp. 6035-6038 (2010).
21. Kim, S.H., Han, H.Y., Lee, Y.J. and et al. "Effect of electrokinetic remediation on indigenous microbial activity and community within diesel contaminated soil", *Science of the Total Environment*, **408**(16), pp. 3162-3168 (2010).
22. Xu, W., Wang, C., Liu, H. and et al. "A laboratory feasibility study on a new electrokinetic nutrient injection pattern and bioremediation of phenanthrene in a clayey soil", *Hazardous Materials*, **184**(1), pp. 798-804 (2010).
23. Wan, C., Du, M., Lee, D.J. and et al. "Electrokinetic remediation and microbial community shift of B-cyclodextrin-dissolved petroleum hydrocarbon-contaminated soil", *Applied microbiology and biotechnology*, **89**(6), pp. 2019-2025 (2011).
24. Li, F., Guo, S. and Hartog, N. "Electrokinetics-enhanced biodegradation of heavy polycyclic aromatic hydrocarbons in soil around iron and steel industries", *Electrochimica Acta*, **85**, pp. 228-234 (2012).
25. DeFlaun, M.F. and Condee, C.W. "Electrokinetic transport of bacteria", *Hazardous Materials*, **55**(1), pp. 263-277 (1997).
26. Kim, S.J., Park, J.Y., Lee, Y.J. and et al. "Application of a new electrolyte circulation method for the ex situ electrokinetic bioremediation of a laboratory-prepared pentadecane contaminated kaolinite", *Hazardous Materials*, **118**(1), pp. 171-176 (2005).

27. Kim, S.H., Han, H.Y., Lee, Y.J. and et al. "Effect of electrokinetic remediation on indigenous microbial activity and community within diesel contaminated soil", *Science of the Total Environment*, **408**(16), pp. 3162-3168 (2010).
28. Guo, S., Fan, R., Li, T. and et al. "Synergistic effects of bioremediation and electrokinetics in the remediation of petroleum-contaminated soil", *Chemosphere*, **109**, pp. 226-233 (2014).
29. Yousefi-Kebria, D. "Bioremediation of petroleum hydrocarbons-contaminated soil by non-uniform electrokinetic", Ph.D. Thesis, Environmental engineering, Tarbiat Modares University (2009).
30. Luo, Q., Zhang, X., Wang, H. and Qian, Y. "The use of non-uniform electrokinetics to enhance in situ bioremediation of phenol-contaminated soil", *Hazardous materials*, **121**(1), pp. 187-194 (2005).
31. Fan, X., Wang, H., Luo, Q. and et al. "The use of 2D non-uniform electric field to enhance in situ bioremediation of 2, 4-dichlorophenol-contaminated soil", *Hazardous Materials*, **148**(1), pp. 29-37 (2007).
32. Ramirez, E.M., Camacho, J.V., Rodrigo, M.A. and et al. "Effect of electric field on the performance of soil electro-bioremediation with a periodic polarity reversal strategy", *Chemosphere*, **146**, pp. 300-307 (2016).
33. Mena, E., Villasenor, J., Canizares, P. and et al. "Effect of electric field on the performance of soil electro-bioremediation with a periodic polarity reversal strategy", *Chemosphere*, **146**, pp. 300-307 (2016).
34. Li, T., Wang, Y., Guo, S. and et al. "Effect of polarity-reversal on electrokinetic enhanced bioremediation of Pyrene contaminated soil", *Electrochimica Acta*, **187**, pp. 567-575 (2016).
35. Soil Survey Division Staff. Soil survey manual, Soil Conservation Service, U.S. Department of Agriculture Handbook 18 (1993).
36. Obayori, O.S., Ilori, M.O., Adebuseye, S.A. and et al. "Degradation of hydrocarbons and biosurfactant production by Pseudomonas sp. strain LP1", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **25**(9), pp. 1615-1623 (2009).
37. Samaei, M.R. "Combined bioaugmentation and biostimulation to cleanup soil contaminated with hexadecane in-slurry bioreactors", Ph.D. Thesis, Environmental Health Engineering, Tarbiat Modares University (2013).
38. www.wilksIR.com
39. Taccari, M., Milanovic, V., Comitini, F. and et al. "Effects of biostimulation and bioaugmentation on diesel removal and bacterial community", *International Biodegradation and Biodegradation*, **66**(1), pp. 39-46 (2012).
40. Luo, Q., Wang, H., Zhang, X. and et al. "In situ bio-electrokinetic remediation of phenol-contaminated soil by use of an electrode matrix and a rotational operation mode", *Chemosphere*, **64**(3), pp. 415-422 (2006).