



فصلنامه علوم محیطی، دوره چهاردهم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۵

۱۴۹-۱۶۴

## مدل سازی کنتیک زیست پالایی آب زیرزمینی آلوده به ترکیبات BTEX

حمیدرضا ناصری<sup>۱</sup> و کمال خدایی<sup>۲\*</sup>

<sup>۱</sup> دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زمین، گروه زمین شناسی، تهران، ایران

<sup>۲</sup> دانشگاه شهید بهشتی، پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، گروه زمین شناسی محیطی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۲۲

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۸

ناصری، ح.ر.، و ک. خدایی. ۱۳۹۵. مدل سازی کنتیک زیست پالایی آلودگی آب زیرزمینی به ترکیبات BTEX. فصلنامه علوم محیطی. ۱۴ (۴): ۱۶۴-۱۴۹.

**سابقه و هدف:** ترکیبات هیدروکربنی در اثر تصادفات در موقع حمل و نقل، ذخیره سازی و یا فرآیندهای پالایشگاهی به ویژه در کشورهای تولیدکننده نفت منابع آب زیرزمینی را (هم در منطقه غیراشباع و هم در منطقه اشباع) آلوده می کنند. با توجه به پیچیدگی های حاکم بر محیط آب زیرزمینی، تاکنون پژوهش چندانی در ارتباط با پاک سازی این آلودگی ها در ایران انجام نشده است. ترکیبات بنزن، تولوئن، اتیل بنزن و زایلن (BTEX) به دلیل حلالیت نسبتا بالا در آب و خاصیت سرطان زایی که دارند، از دیگر ترکیبات نفتی خطرناک تر هستند. این تحقیق با هدف مدل سازی کنتیک زیست پالایی نمونه های آب زیرزمینی آلوده به BTEX انجام شده است.

**مواد و روش ها:** نمونه های آلوده آب زیرزمینی از محدوده پالایشگاه تهران تهیه شده و به روش غنی سازی، باکتری های تجزیه کننده ترکیبات BTEX غربال گری و جداسازی شدند. پس از شناسایی مولکولی باکتری های جدا شده، سویه BTEX-30 *Pseudomonas sp.* که بهترین عملکرد را در بین سایر سویه های باکتریایی داشت برای بررسی های کنتیک انتخاب شد. آزمایشات کنتیک در بطری های شیشه ای ۵۰۰ میلی لیتری با درپوش پیچی تفلونی برای جلوگیری از نشست بخارات ترکیبات BTEX به محیط در شیکر انکوباتور با دور موتور ۱۰۰ دور در دقیقه، در دمای ۳۴ درجه سانتی گراد و با pH برابر ۷/۶ انجام شده است. کنتیک زیست پالایی برای دو حالت تک سوبسترا (غلظت هر کدام از سوبستراها ۲۵۰ میلی گرم بر لیتر) و مخلوط ترکیبات BTEX (مجموع غلظت سوبستراها ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر به نسبت مساوی) بررسی شده است. همچنین برای به دست آوردن رطوبت بهینه زیست پالای در منطقه غیر اشباع آب زیرزمینی، رطوبت های مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

**نتایج و بحث:** بر اساس نتایج به دست آمده، معادله مونود بهترین برازش را هم برای کنتیک تک سوبسترا و هم برای مخلوط سوبستراها نشان می دهد. حداکثر نرخ مخصوص زیست پالایی ( $\mu_{max}$ ) برای ترکیبات بنزن، تولوئن و اتیل بنزن به ترتیب ۰/۴۵، ۰/۴۳ و ۰/۳۵ در ساعت به دست آمد. باکتری قادر به تجزیه زایلن در حالت تک سوبسترا نبود. حداکثر نرخ مخصوص زیست پالایی برای مخلوط سوبستراها، ۰/۴۴، ۰/۴۵، ۰/۳۸ و ۰/۳۳ در ساعت به ترتیب برای بنزن، تولوئن، اتیل بنزن و زایلن به دست آمد. نکته قابل توجه تجزیه زایلن در حضور بنزن و تولوئن است که با افزایش جمعیت باکتریایی در اثر تجزیه بنزن و تولوئن، آنزیم های مورد نیاز برای تجزیه زایلن در دسترس قرار گرفته و باعث تجزیه زایلن نیز می شود.

\* Corresponding Author. E-mail Address: khodaei@acecr.ac.ir

نتیجه‌گیری: باکتری *Pseudomonas sp. BTEX-30* هم در محیط آبی و هم در رطوبت‌های بالای ۲۰ درصد خاک غیراشباع قادر به زیست‌پالایی ترکیبات BTEX است، با وجود این بهترین عملکرد را در رطوبت ۶۰ درصد نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: آب زیرزمینی، کنتیک زیست‌پالایی، معادله مونود، منطقه غیراشباع.

## مقدمه

کرده و به سطح آب زیرزمینی می‌رسند. همیشه بخشی از سیال مایع که از این منطقه عبور می‌کند توسط مکانیسم‌های مختلفی نگه داشته می‌شود و به‌طور کامل زهکشی نمی‌شود. زمانی که منطقه غیراشباع به ترکیبات نفتی آلوده می‌شود، تا زمانی که به‌طور کامل حذف نشود، با هر بارندگی یا هر نوع تغذیه سطحی آب زیرزمینی، ترکیبات نفتی شسته شده و مجدداً آب زیرزمینی را آلوده می‌کنند. بنابراین پاک‌سازی منطقه غیراشباع از اقدامات اساسی برای حذف و جلوگیری از آلودگی آب زیرزمینی است. فناوری‌های متداول در پاک‌سازی خاک در منطقه غیراشباع شامل پاک‌سازی زیستی و شست‌وشوی خاک‌های آلوده با آب یا حلال، استخراج بخار خاک (SVE) و روش‌های حرارتی هستند. بر مبنای تحقیقات انجام شده، روش‌های مبتنی بر حذف بیولوژیکی نسبت به روش‌های دیگر از نظر اقتصادی و زیست‌محیطی برتر هستند (El-Naas *et al.*, 2014; Farhadian *et al.*, 2008; Firmino *et al.*, 2015b; Khodaei *et al.*, 2017). با توجه به تنوع شرایط محیطی و میکروارگانیسم‌ها و اثر عوامل متعدد اقلیمی، زمین‌شناسی، هیدروژئولوژی و هیدروژئوشیمی بر عملکرد میکروارگانیسم‌ها در محیط آب زیرزمینی، تحقیقات برای یافتن روش‌های عملکردی بهینه همچنان ادامه دارد.

طراحی مناسب و توسعه فرایندهای زیست‌پالایی، به مقدار زیادی وابسته به اطلاع از شرایط بهینه عملکردی میکروارگانیسم‌ها و پارامترهای کنتیک زیست‌پالایی است (Lin *et al.*, 2007). در سال‌های گذشته بسیاری از تلاش‌های محققان بر مکانیسم و

فعالیت‌های گسترده نفتی در ایران به‌عنوان یکی از کشور های نفت‌خیز جهان یکی از مهم‌ترین عوامل تهدیدکننده منابع آب و خاک است. به دلیل اینکه منابع آب زیرزمینی در معرض دید نیستند، معمولاً آلودگی منابع آب زیرزمینی زمانی شناسایی می‌شوند که آلودگی از طریق چاه‌ها، چشمه‌ها و قنات به سطح زمین راه پیدا می‌کند. در این شرایط پاک‌سازی آلودگی‌های منابع آب زیرزمینی و خاک زیرسطحی بسیار پرهزینه، پیچیده و نیازمند دانش فنی است. بنزن، تولوئن، اتیل‌بنزن و ایزومرهای زایلین (BTEX) از ترکیبات نفتی آروماتیک هستند. این ترکیبات به دلیل حلالیت نسبی بالا در آب از عمده‌ترین آلاینده‌های آب زیرزمینی محسوب می‌شوند. این ترکیبات هم در فاز محلول و هم در فاز گازی باعث آلودگی منطقه غیراشباع می‌شوند. طبق تقسیم‌بندی سازمان محیط زیست آمریکا این ترکیبات جزو ۱۰۰ ترکیب شیمیایی بسیار خطرناک طبقه‌بندی می‌شوند (ATSDR, 2007). بنابراین بررسی‌های گسترده‌ای درباره پاک‌سازی آلودگی‌های نفتی (BTEX) منابع آب و خاک در دنیا انجام می‌شود (da Silva *et al.*, 2013; Di Martino *et al.*, 2012; Firmino *et al.*, 2015a; Jin *et al.*, 2013; Khodaei *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2012; Nagarajan and Loh, 2015; Stasik *et al.*, 2015; Xin *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013).

منطقه غیراشباع از سطح زمین تا سطح آب زیرزمینی را شامل می‌شود و چون در این منطقه تمام فضاهای خالی خاک از آب پر نشده است به آن منطقه غیراشباع گفته می‌شود. وقتی که ترکیبات نفتی در سطح یا در زیر زمین تخلیه می‌شوند از این منطقه عبور

تهیه شدند. محلول پایه معدنی مورد استفاده در این تحقیق مطابق جدول ۱ تهیه شده است. تمام مواد شیمیایی استفاده شده در محلول پایه معدنی از شرکت Merck آلمان تهیه شده است.

## نمونه برداری از آب آلوده، جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری ها

نمونه برداری از آب زیرزمینی آلوده به ترکیبات نفتی از محدوده پالایشگاه تهران از چهار حلقه چاه انجام شده است. نمونه اول از نفت آزاد روی سطح آب زیرزمینی برداشت شده و نمونه های بعدی هرکدام به فواصل ۳۰ متر در جهت جریان آب زیرزمینی از فاز محلول آلودگی برداشت شده است. برای نمونه برداری از ظروف شیشه ای با حجم یک لیتر استفاده شده است. نمونه ها در مجاورت یخ در مدت کمتر از ۲ ساعت بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند. پارامترهای دما، اکسیژن محلول، pH و هدایت الکتریکی با استفاده از دستگاه مولتی پارامتر 350 Multi parameter اندازه گیری شده است. به منظور جلوگیری از تابش مستقیم نور به نمونه ها طی زمان حمل نمونه ها به آزمایشگاه از بطری های شیشه ای تیره رنگ استفاده شد.

جداسازی باکتری ها به روش غنی سازی انجام شده است. برای این منظور ۱۰ میلی لیتر از آب زیرزمینی آلوده و ۲۵۰ میلی گرم در لیتر ترکیبات BTEX (به نسبت مساوی) به عنوان تنها منبع کربنی به ۱۵۰ میلی لیتر محلول پایه معدنی اضافه شد. محلول پایه معدنی قبل استریل شده و pH آن با استفاده از NaOH یک مولار روی ۷/۵ تنظیم شده بود. غنی سازی در بطری های شیشه ای ۵۰۰ میلی لیتری با درپوش تفلونی پیچی برای جلوگیری از نشست بخارات ترکیبات BTEX به فضای آزاد انجام شد. آزمایشات غنی سازی باکتری در داخل شیکر انکوباتور با دور ۱۰۰ دور در دقیقه و دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت دو هفته انجام شده است.

کنتیک واکنش ها در فرایند زیست پالایی ترکیبات نفتی متمرکز شده است (Fernández et al., 2016; Kermanshahi pour et al., 2006; Littlejohns and Daugulis, 2008; Morlett-Chávez et al., 2010; Nagarajan and Loh, 2015; Qin et al., 2009).

در این تحقیق کنتیک زیست پالایی ترکیبات BTEX توسط باکتری *Pseudomonas* sp. BTEX-30 جداسازی شده از آب زیرزمینی آلوده به ترکیبات نفتی در محدوده پالایشگاه تهران در محیط آبی بررسی می شود. همچنین شرایط بهینه رطوبت برای زیست پالایی ترکیبات BTEX در منطقه غیراشباع آب زیرزمینی برای عملیاتی کردن آن در شرایط صحرائی تعیین می شود.

جدول ۱- ترکیب شیمیایی مورد استفاده در تهیه محلول پایه معدنی

Table 1. Chemical components of the mineral salt solution

ترکیب شیمیایی (Chemical compound)	مقدار (Amount)	
NaNO <sub>3</sub>	0.5	g
NH <sub>4</sub> Cl	1	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	2.14	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.09	g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2	g
Trace Salts Solution	1	ml
Distilled Water	1000	ml
Trace Salts Solution:		
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	300	mg
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	180	mg
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	130	mg
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	40	mg
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	20	mg
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1	mg
CaCl <sub>2</sub>	1000	mg
HCl (0.1 M)	1000	ml

## مواد و روش ها

### مواد شیمیایی مورد استفاده

ترکیبات مونوآروماتیک مانند بنزن، تولوئن، زایلن (m-Xylene) و اتیل بنزن از کمپانی Merck با درجه خلوص بالای ۹۹/۵ در صد (HPLC grade) تهیه شدند. همین طور محیط کشت Tripticase Soy Agar، نمک های معدنی و ترکیبات شیمیایی دیگر با درجه خلوص بالا (Analytic grade) از شرکت Merck آلمان

دما و میزان مواد مغذی بر اساس نتایج حاصل از بهینه‌سازی پارامترها به روش RSM تنظیم شد (Khodaei *et al.*, 2017). برای تمامی آزمایشات ۱۵۰ میلی‌لیتر از آب زیرزمینی بالادست پالایشگاه تهران استفاده شده است. پس از تنظیم پارامترهای pH و افزودن مواد مغذی به محلول پایه آب زیرزمینی، بطری‌ها در دمای ۱۲۰ درجه و به مدت ۲۰ دقیقه اوتکلاد شدند. سوسپانسیونی از باکتری با جمعیت باکتریایی حدود  $10^9$  cfu در سرم نمکی استریل تهیه کرده و ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به بطری‌ها اضافه شد. برای هر آزمایش کنتیک سه بطری آزمایش و یک بطری دقیقاً مشابه نمونه‌های دیگر ولی بدون سوسپانسیون باکتری به عنوان نمونه کنترلی تهیه شد. تمام نمونه‌ها در شیکر انکوباتور با دور موتور ۱۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در تواتر زمانی مناسب یک میلی‌لیتر از پورت نمونه‌برداری بطری‌ها نمونه‌گیری شده و کدورت نمونه‌ها با استفاده از اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۵۰ نانومتر به عنوان شاخص رشد باکتریایی اندازه‌گیری شد. همزمان یک میلی‌لیتر از فضای فوقانی نمونه‌ها برای آنالیز GC با استفاده از سرنگ Gastight همپلتون نمونه‌گیری شد. مدت زمان انجام تمام آزمایش‌ها تا ۷۲ ساعت بود.

### بررسی رطوبت بهینه برای زیست‌پالایی در منطقه غیراشباع

برای یافتن رطوبت بهینه زیست‌پالایی در منطقه غیراشباع از بطری‌های شیشه‌ای ۵۰۰ میلی‌لیتری با درپوش تفلونی حاوی سپتوم سیلیکونی برای نمونه‌گیری گاز از فضای فوقانی استفاده شدند. حدود ۳۰۰ میلی‌لیتر ما سه استاندارد اوتاوا به بطری‌ها اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شدند. بدین ترتیب تمام رطوبت ما سه‌ها از بین رفته و استریل شدند. سپس یک لیتر آب زیرزمینی استریل استاندارد مطابق نتایج

سپس از این محیط غنی‌سازی شده ۱۰۰ میکرولیتر مایع روی پلیت‌های TSA کشت داده شده و از روی شکل ظاهری کلونی‌ها، جدا سازی باکتری‌ها انجام شده است. در مجموع چهار سویه باکتریایی شناسایی مولکولی شده و در نهایت سویه *Pseudomonas sp. BTEX-30* که از قابلیت بیشتری برای تجزیه ترکیبات BTEX برخوردار بود برای بررسی کنتیک واکنش انتخاب شد (Khodaei *et al.*, 2017).

### کنتیک واکنش‌های زیست‌پالایی با استفاده از باکتری *Pseudomonas sp. BTEX-30*

آزمایشات کنتیک به دو روش تک‌سوسپترا و مخلوط چهار ترکیب BTEX انجام شده است. در روش تک‌سوسپترا هر کدام از ترکیبات بنزن، تولوئن، اتیل بنزن و ام-زایلین به صورت تک‌سوسپترا به عنوان تنها منبع غذایی باکتری مورد استفاده قرار گرفته و قابلیت زیست‌پالایی باکتری بررسی شده است. در حالت دوم هر چهار ترکیب بنزن، تولوئن، اتیل بنزن و ام-زایلین به صورت مخلوط و با نسبت یکسان به عنوان منبع غذایی استفاده و قابلیت زیست‌پالایی باکتری بررسی شده است. تمامی آزمایشات در بطری‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری انجام شده است. یک پورت نمونه‌گیری در قسمت انتهایی بطری‌ها طوری تعبیه شده است که از طریق سپتوم سیلیکونی قابل نمونه‌برداری باشد. درپوش بطری‌ها از جنس تفلون انتخاب شد و روی در تفلونی یک محل با سپتوم سیلیکونی طراحی شد که برای نمونه‌برداری از فضای فوقانی استفاده شود. یکی دیگر از سپتوم‌ها برای تعبیه شیر یک‌طرفه برای جریان هوا از محیط بیرون به داخل بطری و جلوگیری از خروج بخارات ترکیبات BTEX استفاده می‌شود. با توجه به اینکه بخارات ترکیبات BTEX فرار هستند و برای افزایش دقت آزمایش‌ها، درپوش از نوع پیچشی انتخاب شد که از نشت بخارات BTEX جلوگیری شود. پارامترهای pH

که  $S$  غلظت سوبسترا (میلی گرم در لیتر)،  $Y_{X/S}$  بازده توده سلولی (میلی گرم سلول به ازای میلی گرم سوبسترا) است.

ضریب بازده توده سلولی در معادله (۲) مصرف ترکیبات سوبسترا هم از فاز گاز و هم از فاز مایع (به دلیل فراریت ترکیبات BTEX) را شامل می شود و فرض بر این است که تبادل بین فازها خیلی سریع انجام می شود.

چندین مدل برای توصیف نرخ مخصوص رشد برای معادلات (۱) و (۲) ایجاد شده است (El-Naas *et al.*, 2014). معروف ترین مدل کنتیک برای زیست پالایی تک سوبسترا، مدل مونود (Monod) است که در معادله (۳) نشان داده شده است.

$$\mu_i = \frac{\mu_{max_i} S_i}{K_{S_i} + S_i} \quad (3)$$

یکی از روش های تخمین پارامترهای کنتیک  $\mu_{max}$  و  $K_S$  شامل برازش معادله (۳) برای نرخ های مخصوص رشد به دست آمده از آزمایش ها به عنوان تابعی از غلظت سوبسترا در آزمایشات تک سوبسترا است.

در مواردی ترکیبات BTEX به عنوان عامل بازدارنده رشد برای برخی سویه های باکتریایی گزارش شده است که در این صورت مدل اصلاح شده مونود که به مدل اندرو (Andrew) معروف است (معادله (۴)) می تواند به داده های حاصل از آزمایش های تک سوبسترا بهتر برازش داده شود.

$$\mu_i = \frac{\mu_{max_i} S_i}{K_{S_i} + S_i + \frac{S_i^2}{K_I}} \quad (4)$$

برای بیان نرخ رشد توده سلولی در حالتی که چندین سوبسترا به صورت مخلوط در محیط باشند، برای بیان نرخ رشد مخصوص مجموع کنتیک ها معادله (۵) می تواند به عنوان نرخ مخصوص رشد در نظر گرفته شود و در معادله (۱) و (۲) مورد استفاده قرار

به دست آمده برای پارامترهای pH، دما و میزان مواد مغذی تهیه و یک میلی لیتر سوسپانسیون باکتریایی با غلظت اولیه حدود ۲۰ میلی گرم بر لیتر به محلول اضافه شد. سپس با استفاده از محلول آماده شده تعداد ۵ بطری با درصدهای رطوبت ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ و یک بطری ماسه خشک بدون رطوبت و باکتری آماده و به هر کدام از بطری ها ۷۵ میکروگرم ترکیبات BTEX به نسبت مساوی اضافه شد. تمامی بطری ها در انکوباتور با دمای ۳۴ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شدند. سپس یک میلی لیتر از فضای فوقانی بطری ها نمونه گیری شد و میزان BTEX باقیمانده در بطری ها مقایسه شد. هر قدر میزان BTEX باقی مانده کمتر باشد نشان دهنده تجزیه بیولوژیکی بهتر و رطوبت بهینه برای زیست پالایی در منطقه غیراشباع است.

## نتایج و بحث

### کنتیک زیست پالایی ترکیبات BTEX

بررسی های زیادی درباره کنتیک و مدل سازی زیست پالایی ترکیبات BTEX انجام شده است. تعیین کنتیک زیست پالایی دقیق برای طراحی و بهینه سازی راکتورهای بیولوژیکی، پاک سازی آلودگی آب زیرزمینی و خاک و تصفیه پساب های صنعتی از اهمیت زیادی برخوردار است. بر اساس موازنه مواد، فرض می شود که رشد سلولی متناسب با جمعیت سلولی بوده و با استفاده از معادله (۱) توصیف می شود (El-Naas *et al.*, 2014).

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (1)$$

که  $X$  غلظت توده سلولی (میلی گرم بر لیتر) و  $\mu$  نرخ مخصوص رشد توده سلولی (در ساعت) است. کاهش میزان سوبسترا نیز از معادله (۲) به دست می آید:

$$\frac{dS_i}{dt} = -\frac{\mu_i X}{Y_{X/S}} \quad (2)$$

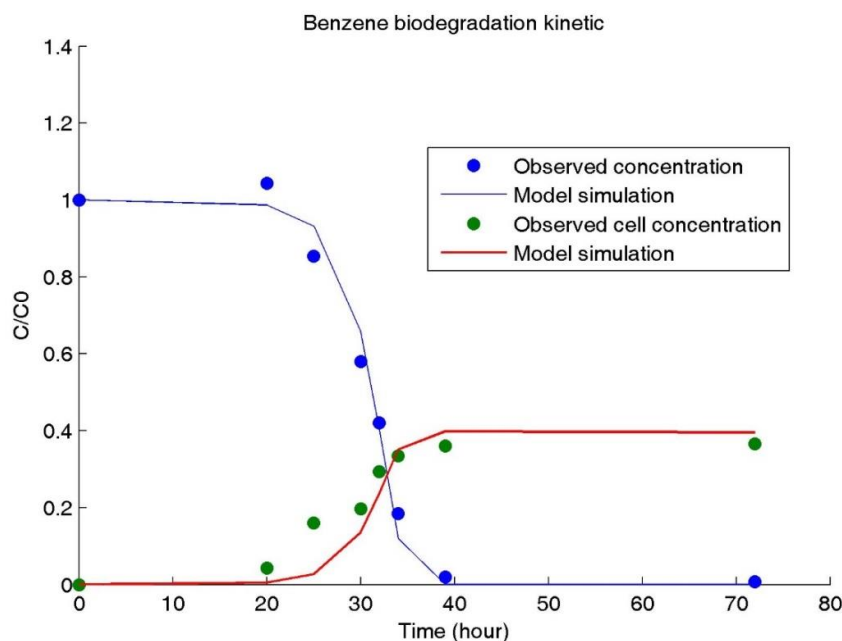
گیرد.

معادله (۵)

$$\begin{aligned} \mu &= \mu_1 + \mu_2 + \dots + \mu_n \\ &= \frac{\mu_{max_1} S_1}{K_{S_1} + S_1} + \frac{\mu_{max_2} S_2}{K_{S_2} + S_2} \\ &\quad + \dots + \frac{\mu_{max_n} S_n}{K_{S_n} + S_n} \end{aligned}$$

باکتری شروع شده و به صورت نمایی ادامه پیدا می‌کند. معمولاً اگر شرایط ثابت باشد و سوبسترا به مقدار کافی فراهم شود، پس از طی مدت زمانی رشد نمایی متوقف شده و مکانیسم‌های کنترل جمعیت باکتری فعال می‌شوند. با توجه به اینکه بنزن به عنوان تنها منبع کربنی مورد استفاده قرار گرفته است، کاهش میزان بنزن دقیقاً با افزایش جمعیت باکتریایی همزمان شده است. غلظت اولیه مورد استفاده در این آزمایش‌ها ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر بوده است. غلظت اولیه باکتری هم حدود ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر بود. با شروع رشد نمایی باکتری، بیش از ۹۰ درصد بنزن در مدت کمتر از ۲۰ ساعت به مصرف باکتری رسیده است. توقف رشد نمایی باکتری در این آزمایش به دلیل اتمام منبع کربنی بوده است. پارامترهای کنتیک برای بنزن در حالت تک سوبسترا در جدول ۲ ارائه شده است. حداکثر نرخ مخصوص رشد (در ساعت)، بازده توده سلولی (میلی‌گرم سوبسترا در میلی‌گرم توده سلولی) برای بنزن به ترتیب ۰/۴۵ و ۰/۳۹۹ توسط مدل محاسبه شده است.

در این تحقیق برای انجام مدل‌سازی کنتیک از نرم‌افزار MATLAB استفاده شده است. در شکل‌های ۱ تا ۳ نتایج حاصل از آزمایش زیست‌پالایی و کنتیک تجزیه زیستی بنزن، تولوئن و اتیل بنزن توسط سویه باکتریایی *Pseudomonas sp. BTEX-30* ارائه شده است. با توجه به شکل‌های فوق، داده‌های آزمایشگاهی با رابطه مونود برازش خوبی نشان می‌دهند. در آزمایش‌های تجزیه بنزن، شروع زیست‌پالایی با یک تاخیر زمانی حدود ۲۰ ساعت صورت گرفته است. این تاخیر زمانی برای سازگاری باکتری با محیط و انجام مکانیسم‌های لازم برای تولید آنزیم‌های مورد نیاز برای تجزیه و استفاده از سوبسترا اتفاق افتاده است. پس از بیان ژن‌های مورد نیاز برای تولید آنزیم‌ها، رشد و تکثیر

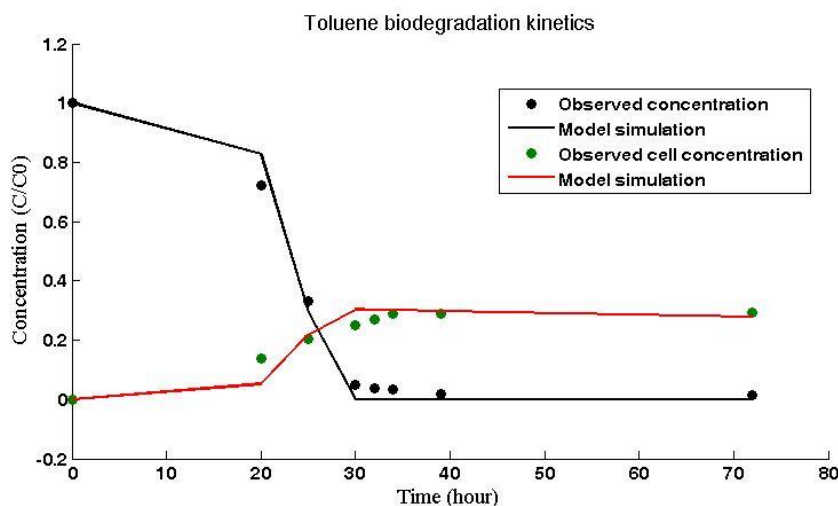


شکل ۱- کنتیک واکنش تجزیه زیستی بنزن توسط سویه باکتریایی *Pseudomonas sp. BTEX-30*.  $C_0$  غلظت اولیه است

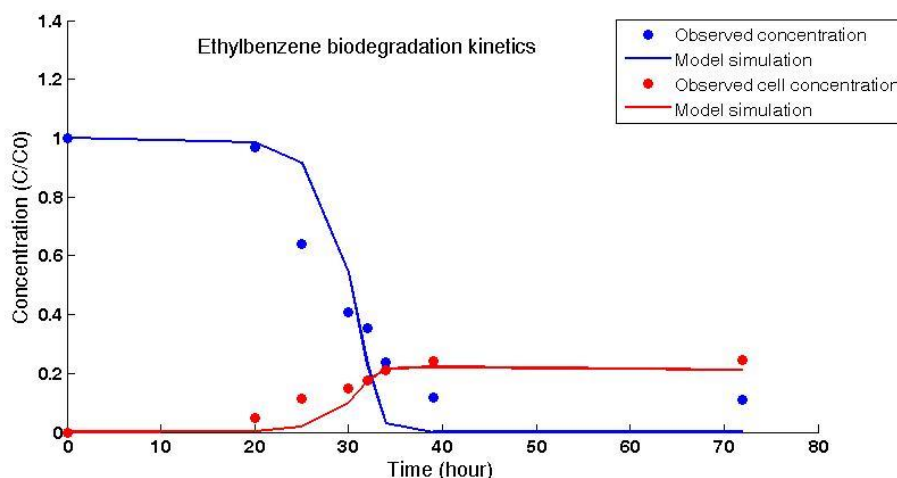
Fig. 1- Biodegradation kinetics of benzene by *Pseudomonas sp. BTEX\_30*.  $C_0$  represents the initial concentration

تجزیه تولوئن زودتر از بقیه ترکیبات شروع شده بود به طوری که شروع مرحله رشد نمایی را از دست دادیم و زمان دقیق شروع مرحله رشد نمایی مشخص نشد. به نظر می‌رسد سرعت تجزیه همانند بنزن باشد ولی میزان زیتوده تولیدی در تولوئن مقداری کمتر از بنزن مشاهده شد. توقف رشد نمایی باکتری در این آزمایش به دلیل اتمام منبع کربنی بوده است. پارامترهای کنتیک برای تولوئن در حالت تک‌سوبسترا در جدول ۲ ارائه شده است. حداکثر نرخ مخصوص رشد (در ساعت) و بازده توده سلولی (میلی گرم سوبسترا در میلی گرم توده سلولی) برای اتیل بنزن به ترتیب ۰/۳۵ و ۰/۲۷ توسط مدل محاسبه شده است.

تجزیه تولوئن زودتر از بقیه ترکیبات شروع شده بود به طوری که شروع مرحله رشد نمایی را از دست دادیم و زمان دقیق شروع مرحله رشد نمایی مشخص نشد. به نظر می‌رسد سرعت تجزیه همانند بنزن باشد ولی میزان زیتوده تولیدی در تولوئن مقداری کمتر از بنزن مشاهده شد. توقف رشد نمایی باکتری در این آزمایش به دلیل اتمام منبع کربنی بوده است. پارامترهای کنتیک برای تولوئن در حالت تک‌سوبسترا در جدول ۲ ارائه شده است. حداکثر نرخ مخصوص رشد (در ساعت) و بازده توده سلولی (میلی گرم سوبسترا در میلی گرم توده سلولی) برای تولوئن به ترتیب



شکل ۲- کنتیک واکنش تجزیه زیستی تولوئن توسط سویه باکتریایی *Pseudomonas sp. BTEX-30*.  $C_0$  نشان دهنده غلظت اولیه است  
Fig. 2- Biodegradation kinetics of toluene by *Pseudomonas sp. BTEX\_30*.  $C_0$  represents the initial concentration



شکل ۳- کنتیک واکنش تجزیه زیستی اتیل بنزن توسط سویه *Pseudomonas sp. BTEX-30*.  $C_0$  نشان دهنده غلظت اولیه است  
Fig. 3- Biodegradation kinetics of ethylbenzene by *Pseudomonas sp. BTEX\_30*.  $C_0$  represents the initial concentration

با تجزیه تولوئن و بنزن، آنزیم‌های مورد نیاز برای تجزیه زایلن به اندازه کافی توسط سویه باکتریایی تولید می‌شود و بنابراین قابلیت تجزیه زایلن نیز فراهم می‌شود. تجزیه همزمان ترکیبات غیرقابل تجزیه به همراه ترکیبات قابل تجزیه در پژوهش‌های دیگران نیز گزارش شده است (Baboshin *et al.*, 2003; Zhong *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010).

شکل ۵ نتایج حاصل از مدل‌سازی کنتیک در حالتی که تمام ترکیبات بنزن، تولوئن، اتیل بنزن و زایلن با هم و به صورت مخلوط به عنوان منبع کربنی مورد استفاده قرار گرفتند را نشان می‌دهد. پارامترهای کنتیک در این حالت در جدول ۳ ارائه شده است.

جدول ۳- کنتیک واکنش تجزیه زیستی ترکیبات BTEX در حالت مخلوط توسط سویه باکتریایی *Pseudomonas* sp. BTEX-30

Table 3. Biodegradation kinetic parameters of mixed BTEX compounds by *Pseudomonas* sp. BTEX-30

$K_s$	Y	$\mu_{max}$	ترکیب Compound
0.15	0.4	0.44	بنزن (Benzene)
0.3	0.33	0.45	تولوئن (Toluene)
0.22	0.22	0.38	اتیل بنزن (Ethylbenzene)
0.22	0.2	0.33	زایلن (m-Xylene)

### رطوبت بهینه برای فعالیت باکتری در منطقه غیراشباع

میکروارگانیسم‌ها در منطقه غیراشباع به دلیل اینکه بخشی از خلل و فرج محیط متخلخل با فاز گازی (هوا) پر شده است، نسبت به منطقه اشباع دسترسی کمتری به آب دارند (Holden and Fierer, 2005). محتوای رطوبتی خاک به صورت پتانسیل رطوبتی (آبی) که مجموع پتانسیل ماتریکس، پتانسیل اسمزی و پتانسیل گرانشی است، بیان می‌شود. در حالی که پتانسیل گرانشی ثابت است، پتانسیل ماتریکس و اسمزی می‌توانند تغییر کنند و

در آزمایش‌هایی که زایلن به عنوان تنها منبع کربنی استفاده شده بود، کدورتی مشاهده نشد و غلظت زایلن باقی‌مانده در طول آزمایش تغییر چندانی نشان نمی‌داد که حاکی از ناتوانی باکتری در تجزیه تک‌سوبسترا زایلن است. برای اطمینان از صحت نتایج، آزمایش با غلظت‌های ۷۵، ۵۰ و ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر نیز تکرار شد و نتایج مشابهی به دست آمد.

پارامترهای کنتیک واکنش برای هر کدام از ترکیبات در حالتی که به صورت تک‌سوبسترا به عنوان منبع کربن مورد استفاده قرار گرفته‌اند در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۲- پارامترهای کنتیک زیست‌پالایی برای هر کدام از ترکیبات بنزن، تولوئن و اتیل بنزن

Table 2. Biodegradation kinetic parameters of benzene, toluene and ethylbenzene

$K_s$	Y	$\mu_{max}$	ترکیب Compound
0.32	0.4	0.45	بنزن (Benzene)
0.3	0.3	0.43	تولوئن (Toluene)
0.32	0.27	0.35	اتیل بنزن (Ethylbenzene)

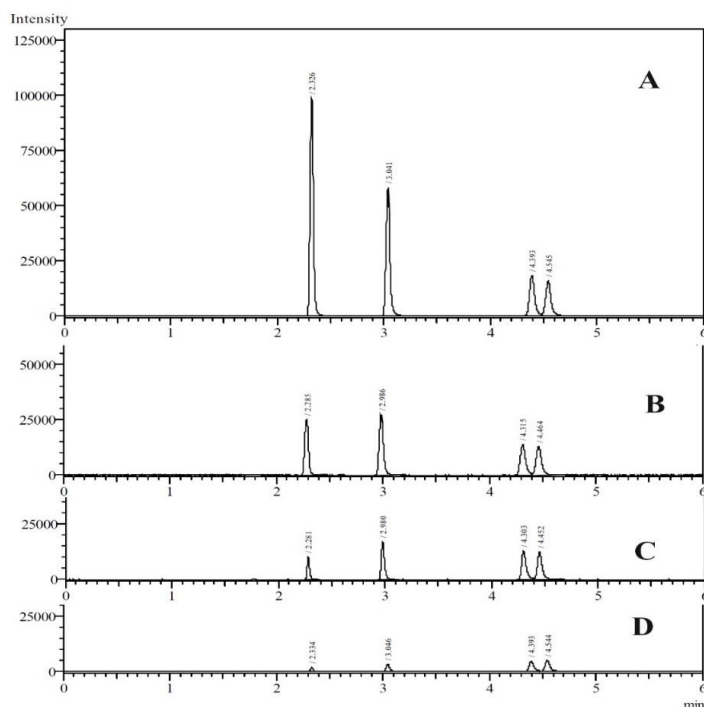
تقریباً تمام پارامترهای کنتیک در هر سه ترکیب BTE نزدیک به هم هستند و تفاوت فاحشی مشاهده نمی‌شود. با وجود این، میزان تولید زیتوده سلولی در بنزن بیشتر از سایرین بوده (۰/۴) و در اتیل بنزن کمترین مقدار (۰/۲۷) را دارد.

برخلاف زمانی که ترکیبات BTEX به صورت تک‌سوبسترا به عنوان منبع کربنی مورد استفاده قرار گرفتند، در حالتی که ترکیبات به صورت مخلوط به عنوان منبع هیدروکربنی معرفی شدند، نتایج نشان داد که سویه باکتریایی قادر به تجزیه کل ترکیبات بوده و زایلن نیز تجزیه شده است. شکل ۴ نتایج حاصل از آزمایش‌های GC را در چهار بازه زمانی نشان می‌دهد. البته تجزیه زایلن زمانی شروع می‌شود که تقریباً نیمی از بنزن و تولوئن به مصرف رسیده است.



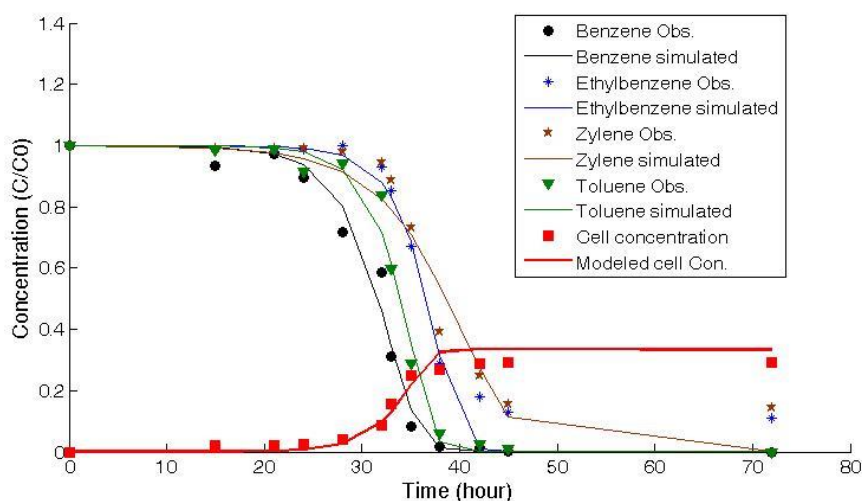
کاهش میزان آب، دسترسی به مواد غذایی را برای میکروارگانیسم‌ها کاهش می‌دهد (Or et al., 2007). در این مقیاس، به دلیل خاصیت آب‌گریزی، باکتری‌ها ترجیحا جذب سطح آب/هوا می‌شوند تا سطح آب/خاک (Powelson and Mills, 1996).

میکروارگانیسم‌ها را تحت تاثیر قرار دهند (Chowdhury and Saha, 2012). در صورت کاهش پتانسیل ماتریکس، دسترسی به آب کمتر می‌شود. در مقیاس حفره، مکانیزم اولیه تهیه سوسترها برای میکروارگانیسم‌ها از طریق ذرات آب آویزان به دانه‌های خاک صورت می‌گیرد و در نتیجه



شکل ۴- کروماتوگراف‌های GC در زمان‌های مختلف آزمایش، ۱۵ ساعت پس از شروع (A)، ۳۲ ساعت پس از شروع (B)، ۳۸ ساعت پس از شروع (C) و ۴۲ ساعت پس از شروع (D)

Fig. 4- GC chromatographs of batch experiments after 15 (A), 32 (B), 38 (C) and 42 (D) hours, respectively



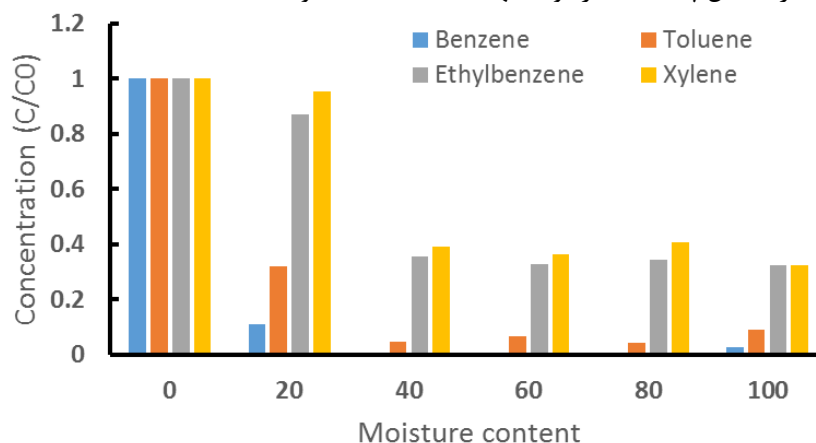
شکل ۵- کنتیک واکنش تجزیه زیستی ترکیبات BTEX را به صورت مخلوط توسط سویه باکتریایی *Pseudomonas* sp. BTEX-30 نشان دهنده غلظت اولیه است

Fig. 5- Biodegradation kinetics of mixed BTEX compounds by *Pseudomonas* sp. BTEX\_30. C0 represents the initial concentration

برای باکتری به کاررفته در این تحقیق در محدوده ۴۰ تا ۸۰ درصد از کل فضاهای خالی است. به عبارتی وقتی که آب در محیط متخلخل ۴۰ تا ۸۰ درصد فضای خالی را پر کرده باشد، باکتری بهترین عملکرد را دارد. دلیل اختلاف عملکرد باکتری *Pseudomonas sp.* BTEX-30 مورد استفاده در این تحقیق با برخی از پژوهش‌های پیشین، که عملکرد بهینه آنها در محدوده ۶۰ درصد رطوبت گزارش شده است، این است که باکتری *Pseudomonas sp.* BTEX-30 قابلیت فعالیت با مقدار اکسیژن حدود ۲۵ درصد اکسیژن مورد نیاز باکتری‌های هوازی دیگر را دارد. این مسئله با سه سویه باکتری دیگر که در این تحقیق غربال‌گری و شناسایی شده بودند مقایسه شد. باکتری *Pseudomonas sp.* BTEX-30 در شرایط کاملاً بی‌هوازی نیز مورد آزمایش قرار گرفت که پس از وقفه ۱۲ روزه فعالیت باکتری برای تجزیه ترکیبات BTEX شروع شد. بیشترین میزان کاهش ترکیبات BTEX در مدت زمان ۷۲ ساعت حدود ۳۰ درصد شرایط هوازی بود. لازم به توضیح است که در تمامی آزمایش‌ها بنزن اولین ترکیبی است که به طور کامل تجزیه می‌شود. در رطوبت‌های ۴۰ تا ۸۰ درصد، بنزن به طور کامل تجزیه شده بود.

در مقیاس ماکرو، مکانیزم انتقال را همرفت آب و انتشار کنترل می‌کنند (Or et al., 2007). اثر اولیه تغییر در میزان آب در مقیاس ماکرو بر انتشار گاز و انتقال همرفتی سوبسترا منعکس می‌شود. با کاهش میزان آب، درصد فاز هوا و سطح ویژه افزایش پیدا کرده و انتشار گاز و تبادل گاز با اتمسفر بهبود پیدا می‌کند (Or et al., 2007). همزمان مسیرهای انتشار آب کاهش پیدا خواهد کرد. فعالیت‌های باکتریایی در منطقه غیراشباع با نرخ تولید  $CO_2$  ارزیابی شده است. نتایج پژوهش‌ها تاکنون نشان داده که مقادیر بهینه رطوبتی خاک بین ۵۰ تا ۶۰ درصد است (Skopp et al., 1990). اگر پتانسیل ماتریس بیشتر کاهش یابد، تنش‌های فیزیولوژیکی مهم‌ترین عامل محدودکننده فعالیت باکتریایی خواهد بود (Stark and Firestone, 1995). اثرات فیزیولوژیکی کاهش دسترسی به آب موجب کاهش تحرک سلولی، کاهش نرخ رشد، و مکانیزم‌های سلولی و در نهایت کاهش بقا می‌شود (Potts, 1994).

شکل ۶ میزان باقیمانده ترکیبات BTEX را در فضای فوقانی نمونه‌ها در درصدهای مختلف رطوبت نشان می‌دهد. نکته مهم و قابل توجه این است که بهترین عملکرد باکتری از رطوبت ۴۰ تا ۸۰ درصد است. همان‌طور که از شکل پیداست، رطوبت بهینه



شکل ۶- میزان باقی‌مانده ترکیبات BTEX در درصدهای مختلف رطوبت منطقه غیراشباع پس از ۷۲ ساعت تجزیه توسط باکتری *Pseudomonas sp.* BTEX-30

Fig. 6- Residual BTEX compound after 72 hours biodegradation by *Pseudomonas sp.* BTEX-30 in unsaturated soil with different moisture contents

## نتیجه گیری

برای بازده توده سلولی نیز مشاهده می شود. در حالت مخلوط سوبستراها، باز هم حداکثر نرخ مخصوص زیست پالایی ( $\mu_{max}$ ) برای تولوئن و بنزن نزدیک به هم بوده و اتیل بنزن و زایلن در رتبه های بعدی هستند. تجزیه زایلن در شرایطی که مخلوط سوبستراها به عنوان منبع کربنی به کار رفتند، احتمالاً ناشی از افزایش رشد باکتری و تولید آنزیم های مورد نیاز برای تجزیه زایلن در اثر مصرف بنزن و تولوئن است. برای عملیاتی کردن زیست پالایی در شرایط میدانی نیاز به اطلاع از رطوبت بهینه برای زیست پالایی در منطقه غیراشباع آب زیرزمینی است که نتایج این تحقیق نشان می دهد سویه باکتریایی *Pseudomonas* sp. BTEX-30 در محدوده رطوبتی ۴۰ تا ۸۰ درصد عملکرد خیلی خوبی دارد ولی بهترین عملکرد در رطوبت ۶۰ درصد اتفاق می افتد.

## سپاس گذاری

از جناب آقای دکتر میرزایی، رئیس محترم پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، و آقای دکتر جلیل بدراقی، معاون محترم پژوهشکده، بابت فراهم کردن امکانات لازم برای انجام این پژوهش صمیمانه قدردانی می شود.

ترکیبات BTEX از حلالیت نسبتاً بالای در آب برخوردار هستند و در منطقه غیراشباع علاوه بر اینکه به صورت محلول در آب انتقال می یابند، به صورت انتشار گازی نیز حرکت کرده و باعث گسترش آلودگی در منابع آب، خاک و هوا می شوند. بنابراین با توجه به اهمیت این ترکیبات، در این تحقیق کنتیک زیست پالایی در نمونه های آب زیرزمینی آلوده به ترکیبات BTEX در منطقه پالایشگاه تهران توسط سویه باکتریایی *Pseudomonas* sp. BTEX-30 در دو حالت تک سوبسترا و مخلوط سوبستراها بررسی شد. در حالت تک سوبسترا ترکیبات بنزن، تولوئن و اتیل بنزن توسط باکتری تجزیه شدند ولی باکتری قادر به تجزیه و مصرف زایلن نبود. ولی در آزمایش هایی که مخلوط سوبستراها به عنوان منبع کربنی مورد استفاده قرار گرفتند، تمامی ترکیبات توسط باکتری تجزیه شدند. بر اساس نتایج مدل سازی کنتیک، معادله مونود برازش خوبی با داده های آزمایشگاهی در هر دو حالت تک سوبسترا و مخلوط سوبستراها نشان می دهد. حداکثر نرخ مخصوص زیست پالایی ( $\mu_{max}$ ) در حالت تک سوبسترا برای بنزن و تولوئن تقریباً یکسان بوده و اتیل بنزن در رتبه بعدی قرار می گیرد. همین ترتیب

## منابع

ATSDR, 2007. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Toxicological profile for xylene, Atlanta, GA. 438.

Baboshin, M.A., Finkel'shtein, Z.I. and Golovleva, L.A., 2003. Fluorene cometabolism by *Rhodococcus rhodochrous* and *Pseudomonas fluorescens*. *Mikrobiologiya*. 72, 194-198.

Chowdhury, S. and Saha, P.D., 2012. Batch and continuous (fixed-bed column) biosorption of

Cu(II) by *Tamarindus indica* fruit shell. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 30, 369-378.

da Silva, M.L.B., Gomez, D.E. and Alvarez, P.J.J., 2013. Analytical model for BTEX natural attenuation in the presence of fuel ethanol and its anaerobic metabolite acetate. *Journal of Contaminant Hydrology*. 146, 1-7.

Di Martino, C., López, N.I. and Raiger Iustman, L.J., 2012. Isolation and characterization of

- benzene, toluene and xylene degrading *Pseudomonas* sp. selected as candidates for bioremediation. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 67, 15-20.
- El-Naas, M.H., Acio, J.A. and El Telib, A.E., 2014. Aerobic biodegradation of BTEX: Progresses and Prospects. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2, 1104-1122.
- Farhadian, M., Vachelard, C., Duchez, D. and Larroche, C., 2008. In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: A review. *Bioresource Technology*. 99, 5296-5308.
- Fernández, E.L., Merlo, E.M., Mayor, L.R. and Camacho, J.V., 2016. Kinetic modelling of a diesel-polluted clayey soil bioremediation process. *Science of The Total Environment*. 557-558, 276-284.
- Firmino, P.I.M., Farias, R.S., Barros, A.N. and Buarque, P.M.C., Rodríguez, E., Lopes, A.C., dos Santos, A.B., 2015a. Understanding the anaerobic BTEX removal in continuous-flow bioreactors for ex situ bioremediation purposes. *Chemical Engineering Journal*. 281, 272-280.
- Firmino, P.I.M., Farias, R.S., Buarque, P.M.C., Costa, M.C., Rodríguez, E., Lopes, A.C. and dos Santos, A.B., 2015b. Engineering and microbiological aspects of BTEX removal in bioreactors under sulfate-reducing conditions. *Chemical Engineering Journal*. 260, 503-512.
- Holden, P.A. and Fierer, N., 2005. Microbial processes in the vadose zone. *Vadose Zone Journal*. 4, 1-21.
- Jin, H.M., Choi, E.J. and Jeon, C.O., 2013. Isolation of a BTEX-degrading bacterium, *Janibacter* sp. SB2, from a sea-tidal flat and optimization of biodegradation conditions. *Bioresource Technology*. 145, 57-64.
- Kermanshahi pour, A., Karamanev, D. and Margaritis, A., 2006. Kinetic modeling of the biodegradation of the aqueous p-xylene in the immobilized soil bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*. 27, 204-211.
- Khodaei, K., Nassery, H.R., Asadi, M.M., Mohammadzadeh, H. and Mahmoodlu, M.G., 2017. BTEX biodegradation in contaminated groundwater using a novel strain (*Pseudomonas* sp. BTEX-30). *International Biodeterioration & Biodegradation*. 116, 234-242.
- Lin, C.W., Cheng, Y.W. and Tsai, S.L., 2007. Multi-substrate biodegradation kinetics of MTBE and BTEX mixtures by *Pseudomonas aeruginosa*. *Process Biochemistry*. 42, 1211-1217.
- Lin, C.W., Wu, C.H., Tang, C.T. and Chang, S.H., 2012. Novel oxygen-releasing immobilized cell beads for bioremediation of BTEX-contaminated water. *Bioresource Technology*. 124, 45-51.
- Littlejohns, J.V., Daugulis and A.J., 2008. Kinetics and interactions of BTEX compounds during degradation by a bacterial consortium. *Process Biochemistry*. 43, 1068-1076.
- Morlett-Chávez, J.A., Ascacio-Martínez, J.Á., Rivas-Estilla, A.M., Velázquez-Vadillo, J.F., Haskins, W.E., Barrera-Saldaña, H.A. and Acuña-Askar, K., 2010. Kinetics of BTEX biodegradation by a microbial consortium acclimatized to unleaded gasoline and bacterial strains isolated from it. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 64, 581-587.
- Nagarajan, K., Loh and K.C., 2015. Formulation of microbial cocktails for BTEX biodegradation. *Biodegradation*. 26, 51-63.

- Or, D., Smets, B.F., Wraith, J.M., Dechesne, A. and Friedman, S.P., 2007. Physical constraints affecting bacterial habitats and activity in unsaturated porous media – a review. *Advances in Water Resources*. 30, 1505-1527.
- Potts, M., 1994. Desiccation tolerance of Prokaryotes. *Microbiological Reviews*. 58, 755-805.
- Powelson, D.K. and Mills, A.L., 1996. Bacterial enrichment at the gas-water interface of a laboratory apparatus. *Applied and Environmental Microbiology*. 62, 2593-2597.
- Qin, X.S., Huang, G.H. and He, L., 2009. Simulation and optimization technologies for petroleum waste management and remediation process control. *Journal of Environmental Management*. 90, 54-76.
- Skopp, J., Jawson, M.D. and Doran, J.W., 1990. Steady-state aerobic microbial activity as a function of soil water content. *Soil Science Society of America Journal*. 54, 1619-1625.
- Stark, J.M. and Firestone, M.K., 1995. Mechanisms for soil moisture effects on activity of nitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 61, 218-221.
- Stasik, S., Wick, L.Y. and Wendt-Potthoff, K., 2015. Anaerobic BTEX degradation in oil sands tailings ponds: Impact of labile organic carbon and sulfate-reducing bacteria. *Chemosphere*. 138, 133-139.
- Xin, B.P., Wu, C.H., Wu, C.H. and Lin, C.W., 2013. Bioaugmented remediation of high concentration BTEX-contaminated groundwater by permeable reactive barrier with immobilized bead. *Journal of Hazardous Materials*. 244-245, 765-772.
- Zhang, L., Zhang, C., Cheng, Z., Yao, Y. and Chen, J., 2013. Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene by the bacterium *Mycobacterium cosmeticum* byf-4. *Chemosphere*. 90, 1340-1347.
- Zhong Y., Zou S., Lin L., Luan T., Qiu R. and Tam N.F., 2010. Effects of pyrene and fluoranthene on the degradation characteristics of phenanthrene in the cometabolism process by *Sphingomonas* sp. strain PheB4 isolated from mangrove sediments. *Marine Pollution Bulletin*. 60, 2043-2049
- Zhou, Y.Y., Chen, D.Z., Zhu, R.Y. and Chen, J.M., 2011. Substrate interactions during the biodegradation of BTEX and THF mixtures by *Pseudomonas oleovorans* DT4. *Bioresource Technology*. 102, 6644-6649.





Environmental Sciences Vol.14 / No.4 / Winter 2017

149-164

## Modelling the biodegradation kinetics of BTEX contaminated groundwater

Hamid Reza Nasser<sup>1</sup> and Kamal Khodaei<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Earth Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Research Institute of Applied Sciences (ACECR), Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Received: April 27, 2016

Accepted: November 12, 2016

Nasser<sup>1</sup>, H.M. and Khodaei, K., 2017. Modelling the biodegradation kinetics of BTEX contaminated groundwater. *Environmental Sciences*. 14(4), 149-164.

**Introduction:** Petroleum hydrocarbons releases into the groundwater resources (both in saturated and unsaturated porous media) as a consequence of accidental spills during the transport, refining and storing stages especially in oil producing countries. There is no study related to cleaning of oil polluted groundwater in Iran due to the complexity of conditions governing groundwater aquifers. Benzene, toluene, ethylbenzene and xylene isomers (known as BTEX) are the most dangerous among other hydrocarbons due to their high solubility and carcinogenic potential. This research is aimed at the bioremediation kinetics modelling of BTEX contaminated groundwater.

**Materials and methods:** Bacteria isolation was performed by enrichment of polluted groundwater samples taken from the site of Tehran Oil Refinery. The *Pseudomonas* sp. BTEX-30 strain was selected among isolated bacteria for biodegradation kinetic modelling due to its high performance in BTEX biodegradation. Kinetic experiments were carried out in 500 ml glass vials with Teflon screw caps to prevent any BTEX vapour leakage. Upstream unpolluted groundwater was selected as the base solution and pH values of samples were adjusted to 7.6. Samples were incubated in a vertical rotary shaker with 100 rpm, 35 centigrade degrees for 72 hours. Kinetic experiments were performed for the single substrate with a concentration of 250 mgL<sup>-1</sup> and the mixed substrate with a concentration of 500 mgL<sup>-1</sup> BTEX (1:1:1:1). Different moisture contents were used to find the optimum moisture content for the biodegradation in the unsaturated zone.

**Results and discussion:** Results show the Monod equation had the best fit for the experimental kinetic data. Maximum specific biodegradation rates in single substrate experiments were 0.45 h<sup>-1</sup>, 0.43 h<sup>-1</sup> and 0.35 h<sup>-1</sup> for benzene, toluene, and ethylbenzene, respectively. *Pseudomonas* sp. BTEX-30 strain was not able to degrade m-xylene in single substrate experiments and the maximum specific biodegradation rates in the mixed substrate

---

\* Corresponding Author. *E-mail Address:* khodaei@acecr.ac.ir, khodaeik@yahoo.com

experiments were  $0.44 \text{ h}^{-1}$ ,  $0.45 \text{ h}^{-1}$ ,  $0.38 \text{ h}^{-1}$  and  $0.33 \text{ h}^{-1}$  for benzene, toluene, ethylbenzene, and m-xylene, respectively. m-Xylene was degraded in mixed substrate experiments in the presence of benzene and toluene due to Increased cell growth and introduction of the enzymes incorporating in m-xylene degradation.

**Conclusion:** *Pseudomonas* sp. BTEX-30 strain was able to degrade BTEX compounds in liquid and unsaturated soil with 20% soil moisture; however, the optimum soil moisture content for biodegradation was obtained at 60 %.

**Keywords:** Biodegradation kinetics, Groundwater, Monod equation, Unsaturated zone.

