Downloaded from ijhe.tums.ac.ir at 21:36 IRST on Wednesday October 17th 2018

مجله سلامت و محیط زیست، فصلنامه‌ی علمی پژوهشی
انجمن علمی بهداشت محیط ایران
دوره نهم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۵، صفحات ۲۱۱ تا ۲۲۲

Available online: http://ijhe.tums.ac.ir

مقاله پژوهشی

ارزیابی باکتری‌های جدا شده از لجن فعال حاصل از تصفیه فاضلاب شهری منطقه ویژه عسلویه جهت زیست فزونی خاک‌های آلوده به کروزن

فرشید کفیل زاده[۱*]، زینب خالدی[۲]

۱- (نویسنده مسئول): دانشیار گروه زیست شناسی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران
۲- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران

اطلاعات مقاله:

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۲۶
تاریخ ویرایش: ۹۵/۰۳/۱۸
تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۳/۲۶
تاریخ انتشار: ۹۵/۰۶/۲۸

واژگان کلیدی: اصلاح زیستی، زیست فزونی، لجن فعال، کروزن، سودوموناس پوتیدا

پست الکترونیکی نویسنده مسئول:
Kafilzadeh@jia.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: *زیست فزونی (Bioaugmentation) یکی از روش‌های برتر در اصلاح زیستی (Bioremediation) خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی است. هدف از تحقیق حاضر ارزیابی میزان تاثیر باکتری‌های جدا شده از لجن فعال حاصل از تصفیه فاضلاب شهری منطقه ویژه عسلویه جهت زیست فزونی خاک‌های آلوده به کروزن و بررسی رشد باکتری‌های جدا شده در حضور غلظت‌های متفاوت این فرآورده است.*

روش بررسی: *نمونه‌برداری از لجن فعال دو کمپ تصفیه خانه منطقه عسلویه صورت گرفت. جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده با کشت نمونه‌ها بر روی محیط پایه معدنی انجام گردید. تست آمیزندگی (Emulsification) و ارزیابی میزان رشد باکتری‌ها در غلظت‌های متفاوت کروزن انجام گردید. باکتری‌های جدا شده جهت زیست فزونی و سنجش میزان پاکسازی زیستی، به خاک‌های آلوده به ترکیب نفتی کروزن تلقیح شدند و میزان تجزیه زیستی توسط دستگاه طیف سنجی مادون قرمز (IR) اندازه گیری گردید.*

یافته‌ها: *در این مطالعه، ۳ باکتری سودوموناس پوتیدا، سراشیا مارسسنس و پروتئوس میرابیلیس از لجن فعال بعنوان باکتری‌های تجزیه‌کننده کروزن جداسازی و شناسایی شدند. با توجه به تست‌های آمیزندگی، سنجش رشد باکتری‌ها در غلظت‌های مختلف کروزن، نتایج حاصل از زیست فزونی ستون‌های خاک آلوده به کروزن و کاهش سطح کل هیدروکربن‌های نفتی (TPHs)، باکتری سودوموناس پوتیدا بعنوان قوی‌ترین باکتری تجزیه‌کننده این فرآورده نفتی شناخته شد. این باکتری با میزان آمیزندگی ۳/۸ توانست ۷۱/۰۳ درصد از کل هیدروکربن‌های نفتی را در طی ۳۰ روز کاهش دهد.*

نتیجه‌گیری: *با توجه به سازگار شدن باکتری‌های سودوموناس پوتیدا، سراشیا مارسسنس و پروتئوس میرابیلیس موجود در لجن فعال با انواع آلاینده‌های موجود در فاضلاب، می‌توان از آنها به‌عنوان باکتری‌های غیربومی جهت زیست فزونی و پاکسازی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی استفاده کرد.*

Please cite this article as: Kafilzadeh F, Khaledi Z. Evaluation of the isolated bacteria from activated sludge of Asalouyeh Special Zone municipal wastewater treatment for bioaugmentation of kerosene-contaminated soils. Iranian Journal of Health and Environment. 2016;9(2):211-22.

Downloaded from ijhe.tums.ac.ir at 21:36 IRST on Wednesday October 17th 2018

مقدمه

صنعت پالایش نفت، نفت خام را به بیش از ۲۵۰۰ محصول تصفیه شده تبدیل می‌کند. گاز نفتی مایع، بنزین، کروزن (نفت سفید)، سوخت هواپیما، سوخت گازوئیل، سوخت‌های نفتی، گریس و مواد سوخت برای صنعت پتروشیمی نتایج مستقیم این فعالیت‌ها هستند (۱). کروزن مایع هیدروکربنی بی‌رنگ و قابل اشتعال است و از تقطیر جزء به جزء نفت خام در دمای ۱۵۰ و ^{0}C ۲۷۰ بدست می‌آید (۲). کروزن اولین بخش سوخت بعد از تقطیر بعضی از ساختارهای خیلی فرار از قبیل نفتا و بنزن است (۳). این مایع هیدروکربنی از پارافین (آلکان‌ها)، سیکلوپارافین (سیکلوآلکان‌ها)، آروماتیک‌ها و اولفین‌ها تشکیل شده است (۴). کروزن به‌عنوان بخش اصلی بیش از ۶۰ درصد سوخت‌های هواپیمایی (جت)، در سیستم گرمایی و بعنوان یک تمیزکننده یا حلال استفاده می‌شود (۵). استفاده از مقادیر زیاد ترکیبات نفتی موجب آلودگی بالای محیط زیست می‌شود. بالا رفتن مقدار هیدروکربن‌های نفتی در خاک موجب کاهش معنی‌داری در کیفیت خاک می‌گردد و این خاک‌ها غیرقابل استفاده می‌شوند (۶). مدت زمان تماس طولانی و غلظت بالای فرآورده‌های نفتی در بدن ممکن است موجب گسترش بیماری‌های کبدی و کلیوی شود و امکان آسیب به مغز استخوان و خطر سرطان را افزایش دهد (۲). یکی از بهترین پیشنهادات در اصلاح خاک‌های آلوده استفاده از میکروارگانیسم‌هایی است که قادر به تجزیه ترکیبات سمی در فرایند اصلاح زیستی (Bioremediation) هستند. اصلاح زیستی یک روش جذاب جهت پاکسازی هیدروکربن‌های نفت خام است زیرا در نواحی وسیع قابل کاربرد و کم هزینه است و منجر به از بین رفتن کامل آلودگی می‌شود (۷). دو تکنیک اصلاح زیستی وجود دارد که می‌توانند در تمام تکنولوژی‌های در دسترس جهت به حداکثر رسیدن بازده تیمار استفاده شوند: تحریک زیستی، که باعث افزایش فعالیت میکروارگانیسم‌های بومی از طریق اضافه کردن مواد غذایی و پذیرنده نهایی الکترون می‌گردد و زیست فزونی (Bioaugmentation)، که باعث افزایش تجزیه مواد آلاینده از طریق اضافه کردن گونه‌های میکروبی تجزیه‌کننده خارجی می‌گردد (۸). تصور می‌شود وقتی تحریک زیستی کافی نباشد زیست فزونی، رویکردی است که باید بکار رود (۹). در طول چند سال اخیر، ترکیبات آلاینده از قبیل حشره‌کش‌ها، مواد نفتی و تعداد زیادی از مواد شیمیایی با استفاده از زیست فزونی، با موفقیت پاکسازی شده‌اند (۱۰). Aislabie و همکاران در سال ۲۰۰۶، اصلاح زیستی هیدروکربن‌ها را در خاک‌های آلوده مناطق قطبی مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که شرایط محیطی در خاک‌های قطبی از قبیل نوسانات دمایی خاک، کاهش سطح مواد مغذی، رطوبت و pH نامناسب بعنوان فاکتورهای محدودکننده فعالیت میکروبی و کاهنده تجزیه زیستی هیدروکربن‌هاست. مطالعه آنها ثابت کرد که استفاده از انواعی از باکتری‌های تجزیه‌کننده از قبیل رودوکوکوس (Rhodococcus) و سودوموناس (Pseudomonas) بعنوان باکتری‌های غیربومی، برای اصلاح زیستی خاک‌های آلوده قطبی مناسب است (۱۱). سیستم تصفیه فاضلاب از قبیل لجن فعال به فعالیت جمعیت ارگانیسم‌های زنده وابسته است. اکثر باکتری‌های موجود در لجن فعال متعلق به جنس‌های گرم منفی هستند. جنس‌های اصلی شامل آکروموباکتر (Achromobacter)، آلکالی‌ژنز (Alcaligenes)، باسیلوس (Bacillus)، فلاووباکتریوم (Flavobacterium)، میکروکوکوس (Micrococcus) و سودوموناس هستند (۱۲). Hosseini و همکاران در سال ۲۰۰۷، دو باکتری سودوموناس بتلی (P. beteli) و اسینتوباکتر جونسونی (Acinetobacter johnsonii) را از لجن فعال جداسازی کردند که به ترتیب قادر به تجزیه ۹۷/۲ درصد و ۹۶/۴ درصد از سورفاکتانت‌های آنیونی بودند (۱۳). در تحقیق Juteau و همکاران در سال ۲۰۰۳، نشان داده شد که اضافه کردن لجن فعال به خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌ها، تجزیه هیدروکربن‌ها را تحریک می‌کند و باعث تجزیه بالای آلکان‌ها و هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs) می‌شود. در این بررسی مشخص شد، دلیل اصلی، تجزیه بالای آلکان‌ها

Downloaded from ijhe.tums.ac.ir at 21:36 IRST on Wednesday October 17th 2018

می‌تواند وجود میکروارگانیسم‌های موجود در لجن از جمله باکتری‌ها باشد که جهت تجزیه هیدروکربن‌ها، قدرت سازگار شدن با محیط را دارند (۱۴). Rojas و همکاران در سال ۲۰۰۷ شش باکتری را از لجن فعال موجود در سیستم فاضلاب شهری جداسازی و شناسایی کردند و به کمک این باکتری‌ها اقدام به پاکسازی زیستی محیط‌های آلوده به آلاینده‌های نفتی نمودند. در پژوهش آنها مشخص شد که باکتری‌های جداسازی شده از مخلوط لجن فعال قادر به تجزیه ترکیبات مشتق از سیستم‌های فاضلاب در پروسه‌های نفتی و صنایع پتروشیمی از قبیل ۱، ۱،۲ تری کلرواتان و اتیل بنزن هستند (۱۵). با توجه به اینکه کشور ایران یکی از بزرگ‌ترین تولیدکننده‌های نفت و گاز در جهان است، بنابراین در مناطق نفت‌خیز و صنعتی آن از قبیل منطقه ویژه پارس جنوبی (عسلویه) آلودگی خاک و آب به مواد نفتی یکی از معضلات اساسی محسوب می‌گردد. هدف از تحقیق حاضر، ارزیابی میزان تاثیر باکتری‌های جدا شده از لجن فعال حاصل از تصفیه فاضلاب شهری منطقه ویژه عسلویه جهت زیست فزونی خاک‌های آلوده به کروزن است. برای این منظور میزان آمیزندگی (Emulsification)، کاهش کل هیدروکربن‌های نفتی (TPHs) و همچنین میزان رشد باکتری‌های جدا شده در حضور غلظت‌های متفاوت این فرآورده نفتی بررسی می‌گردد.

مواد و روش‌ها

- نمونه‌برداری:

در این پژوهش، جهت جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی موجود در لجن فعال حاصل از تصفیه فاضلاب شهری، از کانال خروجی دو تصفیه خانه کمپ ۱ و ۲ و کمپ ۵ منطقه ویژه پارس‌جنوبی واقع در عسلویه (استان بوشهر)، که یکی از مهمترین مناطق گازی و نفتی ایران و جهان است نمونه‌برداری انجام گرفت. در طی نمونه‌برداری دما و pH تصفیه‌خانه فاضلاب اندازه‌گیری شد. نمونه‌برداری با ۳ بار تکرار و به تفکیک دو کمپ صورت گرفت و سپس نمونه‌ها را در ظروف استریل دردار ریخته و طی مدت زمان کمتر از ۲۴ h در فلاسک‌های حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند.

- شمارش باکتری‌ها

برای تعیین پراکندگی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت، در نمونه‌های جمع‌آوری شده لجن فعال، اقدام به شمارش جمعیت باکتری در هر نمونه شد. شمارش باکتری‌ها به روش Viable Plate Count انجام شد. برای این منظور به ازای هر کدام از نمونه‌ها ۹ لوله حاوی ۹ mL محلول سرم فیزیولوژی تهیه شد و از نمونه‌های لجن فعال رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-9} تهیه گردید. پس از تهیه رقت، با استفاده از سمپلر استریل از هر یک از رقت‌ها حجم ۰/۱ mL برداشته و در دو محیط نوترینت حاوی ماده نفتی کروزن با غلظت ۱ درصد (v/v) و نوترینت بدون کروزن (بعنوان کنترل) به روش سطحی (Spread plate) کشت داده شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۴۸ h در دمای ۳۰ C^o گرمخانه‌گذاری گردیدند. پس از ظاهر شدن کلنی‌ها، پلیت‌های دارای کلنی‌های مشخص و قابل شمارش انتخاب و تعداد آنها شمارش گردید و در حجم برداشت شده (۰/۱mL) و عدد رقت (با توان مثبت) ضرب گردید تا تعداد باکتری‌ها در محیط کنترل و محیط حاوی کروزن بر حسب cfu/mL و cfu/g بدست آید.

- غنی‌سازی و جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده کروزن:

از محیط MBS (Mineral Basal Salt) جهت غنی‌سازی و انجام آزمایشات بیشتر استفاده شد. در ابتدا با هدف انجام غنی‌سازی ۹۵ mL از محیط کشت پایه باکتریایی درون فلاسک‌های ۲۵۰ mL ریخته و سپس حدود ۵ mL نمونه لجن فعال هر کمپ به هر فلاسک اضافه شد و فلاسک‌ها با ۱ درصد کروزن (v/v) بعنوان تنها منبع کربن و انرژی تکمیل گردیدند. محیط غنی شده در دمای ۳۰ ^0C با انجام هوادهی در گرمخانه شیکردار انکوبه شد. جهت غنی‌سازی بیشتر باکتریایی و مشاهده کدورت، این فرایند به مدت سه هفته با فواصل هفت روزه انجام

Downloaded from ijhe.tums.ac.ir at 21:36 IRST on Wednesday October 17th 2018

گردید (۱۶، ۱۷). سپس ۱ mL از محیط مایع حاصل از آخرین غنی‌سازی به روش پورپلیت (Pour Plate) بر سطح محیط MBS آگار کشت داده شد. پلیت‌ها در ۳۰ به مدت ۵-۳ روز انکوبه و کلنی‌های باکتریایی که از نظر ظاهر متفاوت بودند، به‌طور متوالی بر روی محیط جامد پایه معدنی حاوی کروزن و سپس بر روی محیط بلاد آگار خالص سازی شدند (۱۸).

- تست آمیزندگی (Emulsification):

پس از جداسازی سویه‌های تجزیه‌کننده کروزن، برای تشخیص قوی‌ترین و توانمندترین باکتری‌های تجزیه‌کننده از تست آمیزندگی استفاده شد. در این مرحله پس از تهیه سوسپانسیون باکتری‌های انتخاب شده در مرحله قبل، بر اساس ۰/۵ مک‌فارلند آنها را به محیط MSS (Mineral Salt Medium) حاوی ۰/۵ درصد کروزن (v/v) تلقیح کرده و پس از مخلوط کردن با دستگاه ورتکس (Vortex) در دمای ۳۰°C به مدت ۳ روز گرمخانه‌گذاری گردید. برای تمام کلنی‌های انتخاب شده این کار تکرار شد. پس از گرماخانه‌گذاری، لوله‌ها مجددا با ورتکس مخلوط و به مدت ۲ h دیگر در دمای ۳۰°C گرمخانه‌گذاری و میزان آمیزندگی از ۰ تا ۴ گزارش گردید. جهت افزایش دقت، تست امولسیفیکاسیون طی چندین بار تکرار شد. با بررسی متوسط میزان آمیزندگی در لوله‌های مربوط به هر باکتری، سویه‌هایی که میزان آمیزندگی بالاتری داشته، جز سویه‌های پرقدرت محسوب گردیدند (۱۹).

- شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده کروزن:

پس از انتخاب قوی‌ترین باکتری‌های تجزیه‌کننده کروزن، جهت شناسایی کلنی‌های باکتری‌های جدا شده از تست‌های استاندارد از قبیل رنگ‌آمیزی گرم، رنگ‌آمیزی اسید فاست، مرفولوژی و رنگ کلنی و همچنین مجموعه‌ای از واکنش‌های بیوشیمیایی، باکتریولوژیک و آزمون‌های رشد براساس کتاب راهنمای برگی از قبیل تست‌های اکسیداز، کاتالاز، TSI، اوره، سیمون سیترات، ایندول، متیل رد، VP، احیاء نیترات، رشد بر روی محیط مک کانکی، حرکت باکتری و همچنین تست‌های قندی از قبیل تخمیر لاکتوز، سوکروز و گلوکز استفاده گردید (۱۶).

- میزان رشد:

به‌منظور ارزیابی و تعیین منحنی رشد باکتری‌های مورد بررسی در حضور غلظت‌های متفاوت کروزن، روش سنجش دانسیته نوری (OD) در طول موج ۶۰۰ nm استفاده گردید. به تعداد هر باکتری ۳ فلاسک از محیط حاوی پایه معدنی با غلظت‌های ۱ درصد، ۳ درصد و ۵ درصد کروزن (v/v) به همراه سوسپانسیون باکتری در نظر گرفته شد. سوسپانسیون باکتری بر طبق استاندارد ۰/۵ مک فارلند تهیه گردید و از آن به میزان ۵ mL به هر کدام از محیط‌های کشت اضافه شد. در این بررسی، یک فلاسک بعنوان کنترل حاوی محیط پایه معدنی و سویه مورد بررسی و بدون کروزن در نظر گرفته شد. محیط‌ها، در دمای ۳۰ °C و با دور ۱۲۰ rpm در انکوباتور شیکردار به مدت ۷ روز گرمخانه‌گذاری شدند. در نهایت میزان دانسیته نوری هر کدام از باکتری‌ها در غلظت‌های متفاوت به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ nm با فواصل ۱۲ ساعته اندازه‌گیری گردید و سپس منحنی رشد باکتری‌های مورد بررسی ترسیم شد (۱۶, ۲۰).

- آلوده کردن مصنوعی خاک:

خاک اولیه از سایت دانشگاه آزاد واحد جهرم انتخاب شد. نمونه خاک جهت آنالیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی‌ها، نشان داد خاک این منطقه فاقد هر گونه آلاینده‌های هیدروکربنی است. نمونه خاک پس از خشک کردن در هوا، از الک دو میلی متری عبور داده شد. سپس جهت از بین بردن میکروارگانیسم‌های موجود در خاک و استریل نمودن آن، طی سه مرحله در دمای ۱۲۱ C^o اتوکلاو گردید. در ادامه، نمونه‌های خاک را در شرایط کاملا استریل در زیر هود به ۴۵۰ g تقسیم کرده و به ازای هر ۱۰۰ g خاک، ۴ mL کروزن برای آلودگی خاک استفاده شد که به وسیله فیلتر ۰/۲ µm بر روی خاک اسپری گردید تا به‌طور کاملا همگن و یکنواخت آلوده شوند (۷, ۲۱).

Downloaded from ijhe.tums.ac.ir at 21:36 IRST on Wednesday October 17th 2018

- طراحی ستون خاک و تیماردهی به‌منظور انجام زیست فزونی جهت حذف کروزن:

۴۵۰gاز نمونـه خاک‌هـای آلـوده به کروزن در سـتون‌های اسـتوانه‌ای شـکل از جنس شیشـه در حجم ۱ لیتری به ابعاد ۲۵cm طـول و ۱۶ cm قطـر داخلی ریخته شـد. سـر این سـتون‌ها با ورقـه آلومینیومی پوشـیده و در دمای اتاق (۲۷) نگهداری گردید. خاک‌های موجود در سـتون به‌منظور فراهم شدن هوا و اکسیژن کافی هر هفته مخلوط گردیدند. همچنین خاک‌هـا جهت فراهم شـدن رطوبـت مورد نیاز بـا افزودن ۲۰mL آب مقطر اسـتریل شـده در هر هفته تا پایان آزمایش نمدار شـدند. تمـام این عملیات در شـرایط کاملا اسـتریل انجام گرفت (۷). به‌منظور بررسـی نقش سویه‌های جدا شده از لجن فعال در تجزیه کروزن، سوسپانسـیونی از سـویه‌های منتخـب تهیه شـد. به این صورت، یک لوپ پـر از کلنی در داخل ۴۰mL نوترینت براث اسـتریل تلقیح گردید. ارلن‌ها در انکوباتـور شـیکردار بـا ۲۰۰ rpm بـرای ۱۲ h با درجه حرارت ۳۰ گرمخانه‌گذاری شـدند. ستون‌های خاک در دمای اتاق (۲۷) به مدت ۳۰ روز برای بررسی فرایند زیست فزونی نگهـداری گردیدنـد(۱۷،۷).

- اندازه‌گیری کل هیدروکربن‌های نفتی (TPHs) خاک‌های آلوده به وسیله طیف سنجی مادون قرمز (IR):

به منظور آنالیز تغییـرات کل هیدروکربن‌های نفتی موجود در نمونه‌های خاک آلوده به کروزن از روش EPA 1664 استفاده شد. ابتدا کروزن موجود در نمونه توسط حلال هگزان استخراج گردید و پس از آن به سل دستگاه IR تزریق شد (دستگاه IR مورد استفاده در این تحقیق مدل $HATR\text{-}T_2$ ساخت شرکت Wilks Enterprise بـود). درصد تجزیـه ترکیبات نفتی و کاهش TPH به‌وسیله فرمول زیر محاسبه شد (۷):

$$[(\text{TPH control} - \text{TPH trearment}) / \text{TPH control}] \times 100$$

- روش آنالیز آماری:

یافته‌هـا بـه کمـک نرم‌افـزار SPSS و آزمون آمـاری دانکن بررسـی شـدند و $P\leq ۰/۰۵$ به عنوان سـطح معنی‌داری تجزیه و تحلیل گردید.

یافته‌ها

- شمارش باکتری‌ها:

میانگین لگاریتمی تعداد باکتری‌ها در محیط حاوی کروزن و فاقد کـروزن (کنترل) برحسـب cfu/g در تصفیه خانه کمپ ۱ و ۲ به‌ترتیب، ۵/۲۵۱±۱۰۶/۰۰ و ۵/۸۹۲±۱۶۴/۲۵ و در تصفیه خانه کمپ ۵ به‌ترتیب، ۴/۶۷۵±۸۱/۵۰ و ۴/۸۸±۱۴۷/۷۵ بدست آمد و بین تمام میانگین‌ها اختلاف معنی‌دار بود ($P< ۰/۰۵$) (نمودار ۱). همچنیـن میانگین لگاریتمی تعداد باکتری‌ها در تصفیه خانه کمپ‌های ۱، ۲ و ۵ برحسـب cfu/g، در محیط حاوی کروزن ۴/۹۶۳±۹۳/۷۵و در محیـط فاقد کروزن ۵/۳۸۶±۱۵۶ بدسـت آمد و تفاوت آنها معنی‌دار بود ($P< ۰/۰۵$).

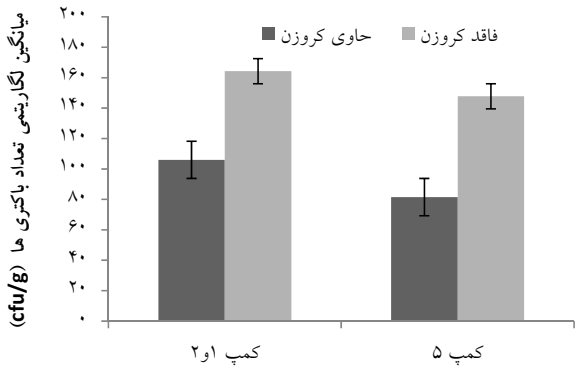
- جداسازی و شناسایی قوی‌ترین باکتری‌های تجزیه‌کننده کروزن در لجن فعال با استفاده از تست آمیزندگی:

ابتدا حدود ۴۰ کلنـی متفاوت از باکتری‌های موجود در لجن فعـال بعنـوان تجزیه‌کننده ترکیـب نفتی کروزن جداسـازی گردید. با بررسـی رشد جدایه‌های مورد نظر در محیط کشت پایـه معدنی براث و آگار واجد کروزن، ۲۵ جدایه که توانایی رشـد بیشـتر از لحاظ تولید کلنی و کدورت داشتند انتخاب شـدند. در ادامه با استفاده از تسـت آمیزندگی و آزمون‌های بیوشـمیایی و مرفولوژیـک (جدول ۱) در مجموع ۳ سـویه پرقدرت سودوموناس پوتیدا، سراشیا مارسسنس و پروتئوس میرابیلیس (هرسه راد شکل و گرم منفی) با میانگین آمیزندگی به‌ترتیـب ۳/۸، ۲/۶ و ۲/۱ جداسـازی و شناسـایی گردیدند. اختلاف میانگین آمیزندگی این ۳ سـویه بـا هم معنی‌دار بود ($P< ۰/۰۵$).

Downloaded from ijhe.tums.ac.ir at 21:36 IRST on Wednesday October 17th 2018

جدول ۱- نتایج برخی از تست‌های مرفولوژیک و بیوشیمیایی

H_2S	Citrate	Nitrate	LD	Urease	Indole	Catalase	Oxidase	VP	Motility	Shape	Gram	Bacteria
-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	Rod	-	P. putida
+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	Rod	-	S. marcescens
+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	Rod	-	P. mirabilis



نمودار ۱- میانگین لگاریتمی تعداد باکتری‌ها در کمپ ۱ و ۲ و کمپ ۵ در محیط حاوی کروزن و فاقد کروزن

- میزان رشد:

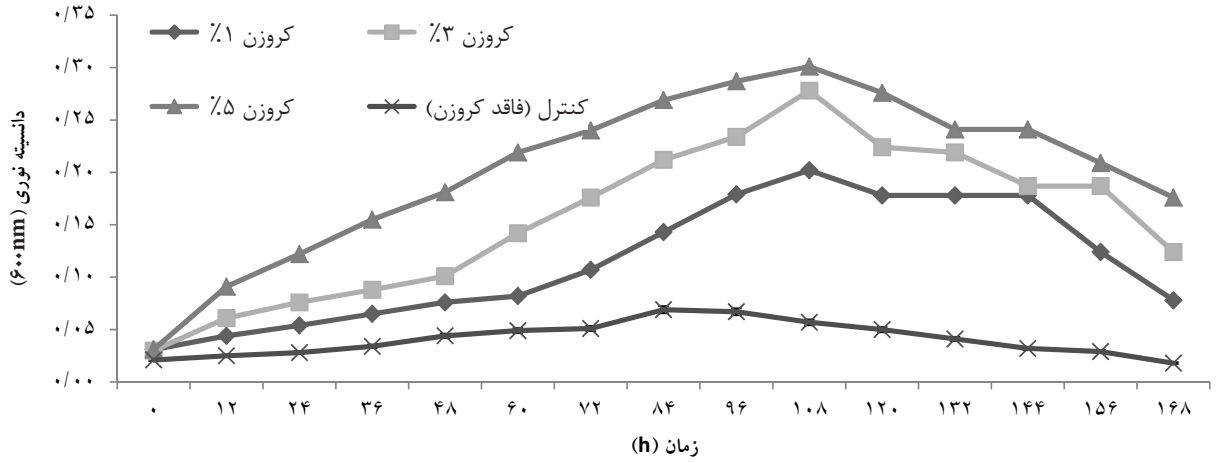
نتایج بررسی نمودار رشد (دانسیته نوری) ۳ باکتری مورد بررسی طی ۷ روز (۱۶۸ h) نشان داد که سودوموناس پوتیدا بهترین رشد را در بالاترین غلظت کروزن ۵ (v/v درصد) داشت، به طوری‌که این باکتری بالاترین دانسیته نوری را در طول موج ۶۰۰ nm با ارزش ۰/۳۰۱ بعد از ۱۰۸ h در غلظت ۵ درصد نشان داد. رشد این باکتری با کاهش غلظت فرآورده نفتی کاهش یافت (نمودار ۲). سراشیا مارسسنس، در غلظت ۱ v/v درصد بالاترین رشد و دانسیته نوری را داشت. دانسیته نوری این باکتری در طول موج ۶۰۰ nm در این غلظت ۰/۲۱۲ در ساعت ۹۶ بود. در حالی‌که رشد این باکتری در حضور غلظت‌های بالاتر کروزن کاهش پیدا کرد (نمودار ۳). از میان باکتری‌های مورد بررسی کمترین رشد مربوط به پروتوس میرابیلیس بود. این باکتری نیز در غلظت ۱ v/v درصد بالاترین دانسیته نوری در طول موج ۶۰۰ nm (۰/۱۹۵ در ساعت ۹۶) را داشت و با افزایش غلظت کروزن دانسیته نوری و در نتیجه رشد آن کاهش یافت (نمودار ۴).

- اندازه‌گیری کاهش TPH خاک‌های آلوده به کروزن:

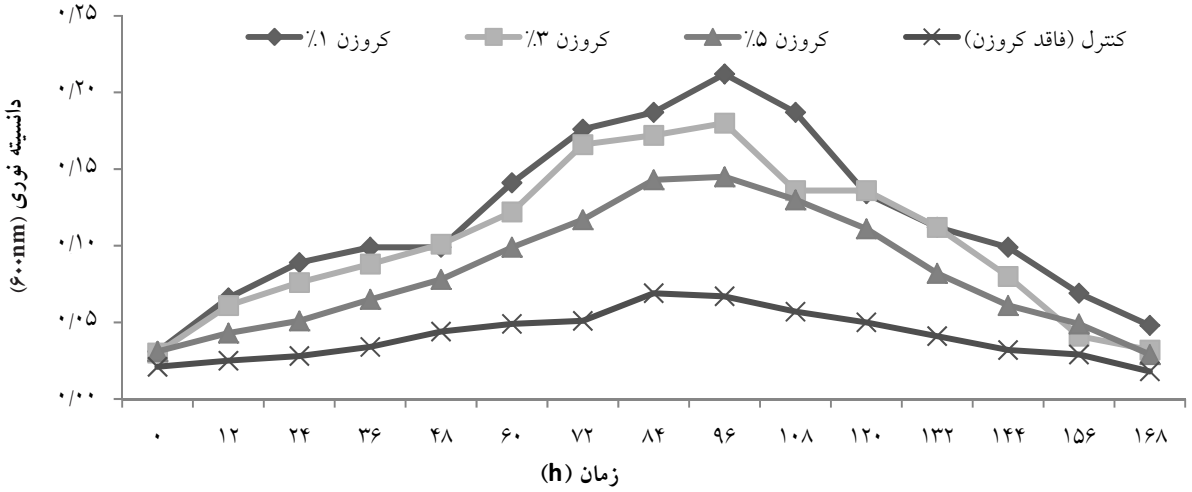
میزان اولیه TPH اندازه‌گیری شده در ستون خاک توسط دستگاه IR برابر با ۱۴۵۰ ppm بود که این میزان بعد از ۳۰ روز در ستون خاک تلقیح شده با سودوموناس پوتیدا به ۴۲۰ ppm، در ستون خاک تلقیح‌شده با سراشیا مارسسنس به ۶۰۵ ppm و در ستون خاک تلقیح‌شده با پروتئوس میرابیلیس به ۸۰۰ ppm کاهش یافت ($P< ۰/۰۵$). با ارزیابی میزان TPH در ستون‌های خاک در زمان اولیه و ۳۰ روز بعد از تیمار مشخص شد سودوموناس پوتیدا ۷۱/۰۳ درصد، سراشیا مارسسنس ۵۸/۲۷ درصد و پروتئوس میرابیلیس ۴۴/۸۲ درصد از پاکسازی زیستی خاک‌های آلوده به کروزن را انجام داده است.

با استفاده از نتایج بدست آمده از بررسی تست امولسیفیکاسیون، میزان رشد و میزان کاهش TPH ستون‌های خاک آلوده به کروزن سودوموناس پوتیدا در مقایسه با دو باکتری دیگر قوی‌ترین سویه در تجزیه کروزن شناخته شد.

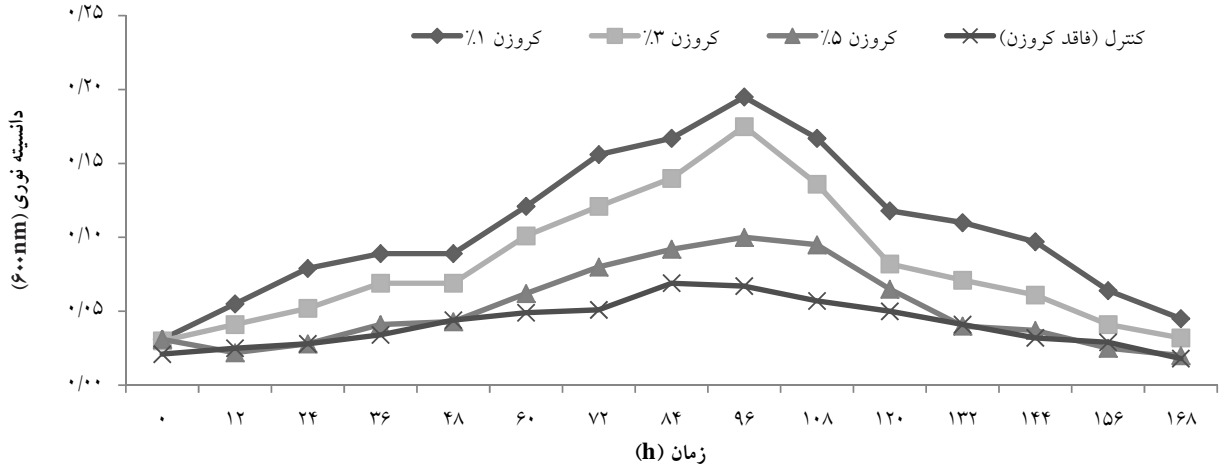
Downloaded from ijhe.tums.ac.ir at 21:36 IRST on Wednesday October 17th 2018



نمودار ۲- دانسیته نوری سودوموناس پوتیدا در غلظت‌های مختلف کروزن



نمودار ۳- دانسیته نوری سراشیا مارسسنس در غلظت‌های مختلف کروزن



نمودار ۴- دانسیته نوری پروتئوس میرابیلیس در غلظت‌های مختلف کروزن

Downloaded from ijhe.tums.ac.ir at 21:36 IRST on Wednesday October 17th 2018

بحث

زیســت فزونی یکی از انواع روش‌های اصلاح زیســتی است کــه به‌صــورت تلقیح خــاک، رســوب و لجن‌های آلــوده با ســویه‌های میکروبی یا به صورت تلقیح میکروارگانیســم‌های جدا شــده به مکان‌های آلــوده انجام می‌شــود (۸). در تحقیق حاضــر میانگین لگاریتمــی تعداد باکتری‌هــا در محیط حاوی کــروزن (۹۳/۷۵±۴/۹۶۳cfu/g) کمتــر از محیط فاقد کروزن (۱۵۶±۵/۳۸۶ cfu/g) بدســت آمد. بنابراین وجود کروزن در محیط کشــت حتی در غلظت‌های کم برای بسیاری باکتری‌ها سمی بوده و سبب توقف رشد و مرگ آنها می‌شود. باکتری‌های مختلفی از لجن فعال فاضلاب شهری منطقه عسلویه جداسازی شــدند که نشــان می‌دهد این لجن به‌عنوان کود آلی منبع غنی از باکتری‌ها اســت. گونه‌های ســودوموناس پوتیدا، سراشــیا مارســسنس و پروتئــوس میرابیلیس به‌عنوان ســویه‌های قوی تجزیه‌کننده کــروزن از میان باکتری‌هــای تجزیه‌کننده موجود در لجن فعال شناسایی شــدند. Sharifi-Yazdi و همکاران (۲۰۰۱) نیــز موفــق بــه جداســازی و شناســایی باکتری‌های فلاووباکتریوم، ســودوموناس و میکروکوکوس از لجن فعال با توانایی تصفیه پســاب صنعتی شــدند (۱۲). در بررسی جاری، استفاده از روش غنی‌ســازی و استفاده از محیط MBS براث حاوی کروزن برای جداسازی این باکتری‌ها در ابتدای آزمایش کمــک زیادی بــه شناســایی باکتری‌های تجزیه‌کننــده قوی و ســازگار نسبت به دیگر باکتری‌های موجود در لجن فعال کرد. در واقع، کروزن اضافه شــده به محیط کشت، باعث غنی شدن محیط برای گونه‌های تجزیه‌کننده شد. درحالی‌که گونه‌هایی که ســازگاری کمتری در میان جمعیت تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی داشــتند بتدریج حذف شــدند. از این باکتری‌ها جهت کاهش کل هیدروکربن‌های نفتی اســتفاده گردید. نتایج بدســت آمده از بررسی ســتون‌های خاک تلقیح شده با سودوموناس پوتیدا، سراشــیا مارســسنس و پروتئوس میرابیلیس حاکی از توانایی بالای باکتری‌های جدا شــده از لجن فعــال بعنوان باکتری‌های غیربومی در کاهش TPH و تجزیه کروزن بود. ســودوموناس پوتیدا، سراشیا مارسسنس و پروتئوس میرابیلیس بعد از ۳۰ روز فرایند زیســت فزونی و تلقیح به ستون خاک به ترتیب ۷۱/۰۳ درصــد، ۵۸/۲۷ درصد و ۴۴/۸۲ درصد از کل هیدروکربن‌های نفتــی موجــود در خــاک را کاهــش دادند کــه ایــن نتایج، با پژوهش‌های بســیاری از محققین که در زمینه پاکسازی زیستی و زیســت فزونی خاک‌های آلوده بــه آلاینده‌های نفتی تحقیق کرده‌انــد مطابقت دارد. Das و همکار (۲۰۰۶) از ســویه‌های باسیلوس سابتیلیس (B. subtilis DM-04) و سودوموناس آئروژینوزا (P.aeruginosa MNM) جهت تجزیه زیســتی ترکیبات نفتی اســتفاده نمودند. در بررسی آنها سطح TPH در خــاک کنترلی و نمونه آزمایش اندازه‌گیری گردید و مشــخص شد سطح TPH در پایان آزمایش کاهش معنی‌داری پیدا کرده اســت (۲۲). Wongsa و همکاران (۲۰۰۴) دو ســویه جدید از ســودوموناس آئروژینوزا و سراشــیا مارسسنس به ترتیب به نام‌هــای WatG و HokM از چندین منطقــه هوکایدو ژاپن جداســازی کردند کــه دارای توانایی بالایــی در تجزیه طیف وســیعی از هیدروکربن‌های موجود در بنزین، کروزن، گازوئیل و گریس بودند. در بررسی آنها مشخص شد که سویه WatG، سویه پرقدرت‌تری نسبت به سویه HokM در تجزیه ترکیبات نفتی اســت. ســویه WatG حدود ۹۵-۹۰ درصد از ترکیبات گازوئیــل و کروزن و ســویه HokM حــدود ۶۰-۵۰ درصد از ایــن ترکیبــات را تجزیــه کــرد (۶). Tahhan و همکاران (۲۰۱۱)، با اســتفاده از دو باکتری جدا شــده از خاک و تلقیح آنها به لجن‌های نفتی میزان تجزیه کل هیدروکربن‌های نفتی را افزایش دادند. در بررسی آنها تلقیح طی دو مرحله در دوره‌های زمانی ۶۲ روزه و ۱۹۸ روزه انجام گرفت که در نهایت بیش از ۳۰ درصــد از TPH کاهش یافت (۲۳). در پژوهش Juteau و همکاران (۲۰۰۳) مشــخص شــد اضافه کردن لجن فعال به خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌هــا، فرایند تجزیه را تحریک و باعث تجزیه بالای آلکان‌ها می‌شــود. در این بررسی مشخص شــد عامل اصلی تجزیه آلکان‌ها، مــواد مغذی موجود در لجن

Downloaded from ijhe.tums.ac.ir at 21:36 IRST on Wednesday October 17th 2018

نیست بلکه دلیل آن می‌تواند وجود میکروارگانیسم‌های موجود در لجن از جمله باکتری‌ها باشد که قدرت سازگار شدن جهت تجزیه هیدروکربن‌ها را دارند (۱۴).

در تحقیق جاری میزان رشد باکتری‌های تجزیه‌کننده در حضور غلظت‌های مختلف کروزن به مدت ۷ روز و در طول موج ۶۰۰ nm مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد رشد باکتری‌های سراشیا مارسسنس و پروتئوس میرابیلیس با افزایش غلظت کروزن کاهش می‌یابد. Kafilzadeh و همکاران (۲۰۱۱) نیز توانستند باکتری‌های تجزیه‌کننده پیرن را جداسازی و شناسایی کنند. در تحقیق آنها با بررسی میزان رشد باکتری‌های جداسازی شده در طول موج ۶۰۰ nm، رشد پایین باکتریایی در غلظت‌های بالای ترکیبات آروماتیکی مشاهده گردید. کاهش رشد باکتری‌ها با افزایش غلظت ماده مورد نظر می‌تواند بدلیل سمی بودن آن باشد. هیدروکربن‌های لیپوفیلیک موجود در ترکیبات نفتی، با تجمع در غشاء دو لایه‌ای باکتری بر خواص ساختمانی و عمل این غشا اثر گذاشته و منجر به از بین رفتن غشا، افزایش نفوذپذیری پروتون و تخریب ثبات pH درون سلولی خواهند شد (۲۴). اما در سودوموناس پوتیدا با افزایش غلظت کروزن میزان رشد باکتری افزایش یافت به‌طوری‌که این باکتری در غلظت ۵ درصد بیشترین رشد را داشت. این نتیجه با نتایج پژوهش Nnamchi و همکاران (۲۰۰۶) مطابقت دارد. در بررسی آن‌ها، ارتباط مستقیم بین میزان رشد باکتری‌ها و غلظت هیدروکربن مورد بررسی، اثبات شد (۲۵). سودوموناس در محیط‌های مختلف مقاومت بالایی دارد. قدرت تجزیه‌کنندگی سودوموناس پوتیدا به دلیل تولید بیوسورفاکتانت‌هایی است که باعث افزایش امولسینه شدن هیدروکربن‌های نفتی و تغییر کشش سطحی و اتصال هیدروکربن به سطح سلول باکتری‌ها می‌شود (۲۶). سودوموناس دارای آنزیم‌های مختلف تجزیه‌کننده است که قادر به تجزیه ترکیبات هیدروکربنی مختلف هستند. این امکان وجود دارد در شرایطی که این باکتری در معرض غلظت بالای فرآورده‌های نفتی قرار می‌گیرد آنزیم‌ها و سورفاکتانت‌هایی تولید کند که شرایط آمیزندگی بیشتر و تجزیه بهتر آن فرآورده‌ها و تکثیر بیشتر نسبت به غلظت‌های پایین‌تر آن فراهم شود (۱۶). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که قدرت تجزیه‌کنندگی و رشد باکتری‌های جدا شده با میزان آمیزندگی رابطه مستقیم دارد. به‌طوری‌که قدرت تجزیه و رشد سودوموناس پوتیدا، سراشیا مارسسنس و پروتئوس میرابیلیس در حضور کروزن به‌ترتیب با کاهش میزان آمیزندگی کاهش یافت. باید توجه داشت در این تحقیق از مخلوط هر سه باکتری در آزمایش تجزیه کروزن استفاده نگردید. به طور کلی تجزیه آلاینده‌های مختلف در حالت مخلوط باکتری‌ها می‌تواند نسبت به تجزیه آنها در حضور هریک از باکتری‌ها به تنهایی، بیشتر و یا کمتر شود، که این موضوع نیاز به بررسی دارد. همچنین به منظور بدست آمدن حداکثر اصلاح زیستی، بهینه‌سازی شرایط رشد باکتری‌های مذکور از نظر فاکتورهایی مانند دما، pH و منبع دوم کربن یا نیتروژن باید مورد مطالعه قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد لجن فعال تصفیه خانه منطقه عسلویه دارای سه باکتری سودوموناس پوتیدا، سراشیا مارسسنس و پروتئوس میرابیلیس است که قدرت سازگاری متفاوتی با غلظت‌های مختلف کروزن داشته و آن را تجزیه کرده و رشد می‌کنند. همچنین قدرت تجزیه‌کنندگی و رشد باکتری‌های یاد شده در حضور کروزن با کاهش میزان آمیزندگی کاهش یافت. با استفاده از سه باکتری مذکور به‌عنوان باکتری‌های غیربومی، می‌توان جهت زیست فزونی و اصلاح زیستی محیط‌های آلوده به‌ویژه خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان‌نامه با عنوان "پاکسازی زیستی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی با استفاده از باکتری‌های جدا شده از لجن فعال حاصل از تیمار فاضلاب‌های شهری منطقه عسلویه" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۹۳ است که

Downloaded from ijhe.tums.ac.ir at 21:36 IRST on Wednesday October 17th 2018

با حمایت دانشگاه آزاد اســلامی واحد جهرم اجرا شده است. نویسندگان لازم می‌دانند از کلیه کسانی‌که در انجام این تحقیق همکاری کرده‌اند بخصوص کارشناسان آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم تشکر نمایند.

منابع

1. Benyahia F, Abdulkarim M, Embaby A, Rao M. Refinery wastewater treatment: a true technological challenge. The 7th Annual UAE University Research Conference; 2006 Apr 22-25; Al Ain, United Arab Emirates; 2006.
2. Gouda MK, Omar SH, Eldin HMN, Chekroud ZA. Bioremediation of kerosene II: a case study in contaminated clay (Laboratory and field: scale microcosms). World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2008;24(8):1451-60.
3. Adesanwo T, Rahman M, Gupta R, de Klerk A. Characterization and refining pathways of straight-Run heavy naphtha and distillate from the solvent extraction of lignite. Energy and Fuels. 2014;28(7):4486-95.
4. Agarry SE, Owabor CN, Yusuf RO. Enhanced bioremediation of soil artificially contaminated with kerosene: optimization of biostimulation agents through statistical experimental design. Journal of Petroleum and Environmental Biotechnology. 2012;3(3):1-8.
5. Ejiro KH, Eseoghene A. Effect of acute kerosene toxicity on the histology of the small intestine, intestinal enzyme amylase and malondialdehyde (MDA) on adults male Wistar rats. Journal of Natural Sciences Research. 2015;5(4):53-57.
6. Wongsa P, Tanaka M, Ueno A, Hasanuzzaman M, Yumoto I, Okuyama H. Isolation and characterization of novel strains of Pseudomonas aeruginosa and Serratia marcescens possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil, and lubricating oil. Current Microbiology. 2004;49(6):415-22.
7. Bento FM, Camargo FA, Okeke BC, Frankenberger WT. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. Bioresource Technology. 2005;96(9):1049-55.
8. Mariano AP, Kataoka APdAG, Angelis DdFd, Bonotto DM. Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. Brazilian Journal of Microbiology. 2007;38(2):346-53.
9. Mrozik A, Piotrowska-Seget Z. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. Microbiological Research. 2010;165(5):363-75.
10. Alisi C, Musella R, Tasso F, Ubaldi C, Manzo S, Cremisini C, et al. Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance. Science of the Total Environment. 2009;407(8):3024-32.
11. Aislabie J, Saul DJ, Foght JM. Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. Extremophiles. 2006;10(3):171-79.
12. Sharifi-Yazdi M, Azimi C, Khalili M. Isolation and identification of bacteria present in the activated sludge unit, in the treatment of industrial waste water. Iranian Journal of Public Health. 2001;30(3-4):91-94.
13. Hosseini F, Malekzadeh F, Amirmozafari N, Ghaemi N. Biodegradation of anionic surfactants by isolated bacteria from activated sludge. International Journal of Environmental Science and Technology. 2007;4(1):127-32.
14. Juteau P, Bisaillon J-G, Lépine F, Ratheau V, Beaudet R, Villemur R. Improving the biotreatment of hydrocarbons-contaminated soils by addition of activated sludge taken from the wastewater treatment facilities of an oil refinery. Biodegradation. 2003;14(1):31-40.
15. Ali A, Naseem F. Frequency distribution of bacteria isolated from different industrial effluent. Daffodil International University Journal of Science and Technology. 2012;7(1):28-33.
16. Kafilzadeh F, Hoshyaripour F, Afrough R, Jamali H, Allahverdi G. Isolation and identification of pyrene-degrading bacteria from soils around landfills in Shiraz and their growth kinetic assay. Journal of

Downloaded from ijhe.tums.ac.ir at 21:36 IRST on Wednesday October 17th 2018

Fasa University of Medical Sciences. 2011;1(3):154-59 (in Persian).
17. Rahman P, Rahman T, Lakshmanaperumalsamy P, Banat IM. Occurrence of crude oil degrading bacteria in gasoline and diesel station soils. Journal of Basic Microbiology. 2002;42(4):284-91.
18. Shafiee P, Shojaosadati SA, Charkhabi AH. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by aerobic mixed bacterial culture isolated from hydrocarbon polluted soils. Journal of Chemistry and Chemical Engineering. 2006;25(3):73-78.
19. Francy D, Thomas J, Raymond R, Ward C. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. Journal of Industrial Microbiology. 1991;8(4):237-45.
20. Kafilzadeh F, Javid H, Mohammadi H. Isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons degrading bacteria of Tashk lake and salt concentration effect on them. Iranian Scientific Fisheries Journal. 2007;17(3):103-12 (in Persian).
21. Sharifi HS, Shahbazi A, Yazdipour A, Kamranfar I. The effect of agricultural fertilizers on bioremediation of a crude-oil polluted soil. Journal of Water and Soil. 2009;23(3):145-55 (in Persian).
22. Das K, Mukherjee AK. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from north-east India. Bioresource Technology. 2007;98(7):1339-45.
23. Tahhan RA, Ammari TG, Goussous SJ, Al-Shdaifat HI. Enhancing the biodegradation of total petroleum hydrocarbons in oily sludge by a modified bioaugmentation strategy. International Biodeterioration and Biodegradation. 2011;65(1):130-34.
24. Nwanna IM, George GO, Olusoji IM. Growth study on chrysene degraders isolated from polycyclic aromatic hydrocarbon polluted soils in Nigeria. African Journal of Biotechnology. 2006;5(10):823-28.
25 Nnamchi C, Obeta J, Ezeogu L. Isolation and characterization of some polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from Nsukka soils in Nigeria. International Journal of Environmental Science and Technology. 2006;3(2):181-90.
26. Kumar M, Leon V, Materano ADS, Ilzins OA, Galindo-Castro I, Fuenmayor SL. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by biosurfactant-producing Pseudomonas sp. IR1. Zeitschrift für Naturforschung C. 2006;61(3-4):203-12.

Downloaded from ijhe.tums.ac.ir at 21:36 IRST on Wednesday October 17th 2018

Available online: http://ijhe.tums.ac.ir

Original Article

Evaluation of the Isolated Bacteria from Activated Sludge of Asalouyeh Special Zone Municipal Wastewater Treatment for Bioaugmentation of Kerosene-Contaminated Soils

F Kafilzadeh*, Z Khaledi

Department of Biology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran

ARTICLE INFORMATIONS:

Received: 16 March 2016
Revised: 7 June 2016
Accepted: 15 June 2016
Published: 18 September 2016

Key words: Bioremediation, Bioaugmentation, Activated sludge, Kerosene, *Pseudomonas putida*

***Corresponding Author:**
Kafilzadeh@jia.ac.ir
Tel: 09171140799

ABSTRACT

Background and Objectives: Bioaugmentation is a superior technique in bioremediation of contaminated soils with petroleum hydrocarbons. The aim of this study was to evaluate the effect of isolated bacteria from activated sludge of Asalouyeh special zone municipal wastewater treatment for bioaugmentation of kerosene-contaminated soils and to study the growth of isolated bacteria in the presence of different concentrations of this product.

Materials and Methods: Sampling of activated sludge was carried out from two treatment plants in Asalouyeh zone. Isolation of degrading bacteria was performed by culturing the samples on basal mineral medium. Emulsification test and evaluating the kinetic growth of bacteria were carried out in different concentrations of kerosene. Isolated bacteria were inoculated to polluted soils with kerosene oil compound for bioaugmentation and measuring their bioremediation potentials and the rate of biodegradation were measured by InfraRed (IR) spectroscopy.

Results: In this study, three bacterias: *Pseudomonas putida*, *Serratia marcescens*, and *Proteus mirabilis* were isolated and identified as kerosene degrading bacterias from activated sludge. *P. putida* was recognized as the most powerful degrading bacterium of this oil product according to the emulsification tests, measuring the growth of bacteria in various concentrations of kerosene, the results of bioaugmentation of contaminated column of soil with kerosene, and reducing the level of Total Petroleum Hydrocarbons (TPHs). This bacterium with emulsification rate of 3.8 could reduce 71.03% of TPHs within 30 days.

Conclusion: According to the adaption of *Pseudomonas putida*, *Serratia marcescens,* and *Proteus mirabilis* in activated sludge with variety of pollutants in sewage, they can be used as non-indigenous bacteria for bioaugmentation and cleaning up the soil contaminated petroleum hydrocarbons.

Please cite this article as: Kafilzadeh F, Khaledi Z. Evaluation of the isolated bacteria from activated sludge of Asalouyeh Special Zone municipal wastewater treatment for bioaugmentation of kerosene-contaminated soils. Iranian Journal of Health and Environment. 2016;9(2):211-22.