

## Study of the dynamic of *Bacillus* species during of oil contaminated soil by PCR-DGGE

Mahmoud Shavandi \*

Assistant Professor of Molecular Genetics, Environment and Biotechnology Research Division, Research Institute of Petroleum Industry, Tehran, Iran, shavandim@ripi.ir

Nima Zamanian

M.Sc. of Microbiology, Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran, zamanian.nima@gmail.com

Azam Haddadi

Assistant Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran, haddadi@kiau.ac.ir

### Abstract

**Introduction:** Bioremediation is an effective, inexpensive and environmental friendly manner for removing oil pollutions. Studying the biodiversity of indigenous microorganisms and their function is very important for bioremediation strategy selection and performance. This study was aimed to investigate the role of *Bacillus* species in bioremediation of diesel contaminated soil.

**Materials and Methods:** Soil microcosms were prepared by adding 2 and 4% (W/W) of diesel to the soil. A control microcosm without diesel contamination was also set up. Microcosms were amended with nitrogen and phosphate sources and water (20%) and in a six month study period and parameters including diesel degradation, heterotrophic bacterial count and *Bacillus* spp. diversity by 16S rRNA PCR-DGGE were studied.

**Results:** The results showed that in 2% microcosm up to 50% and in 4% microcosm up to 44.44% of diesel were degraded after six months. The increase of bacterial count was completely coincided with the highest diesel removal rate. The count of heterotrophic bacteria in 2 and 4% microcosms was elevated from  $2 \times 10^8$  to  $2 \times 10^{11}$  and  $2 \times 10^{12}$  at the highest point, respectively. Accordingly, introduction of the diesel stimulated the native soil bacteria and the amount of pollution was determinative in bioremediation efficiency.

**Discussion and conclusion:** Comparison of the pattern of DGGE bands variation between the microcosms showed that by entry of the contaminant into the soil, the diversity of *Bacillus* species was increased, indicating that *Bacillus* species has a particular role in diesel degradation. Simultaneous with decline of the pollution and microbial count of the soil, diversity of DGGE bands was decreased. Out of these findings we may conclude that addition of diesel as a carbon source to the soil increases the *Bacillus* spp. diversity at the beginning of bioremediation and afterwards by elimination of the pollutant, the diversity decreases gradually and shifts back to its original structure.

**Key words:** Soil bioremediation, Oil pollution, Microbial diversity, *Bacillus* spp., 16S rRNA gene, PCR-DGGE.

---

\* Corresponding author

**Received:** March 15, 2017 / **Accepted:** September 20, 2017

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها  
شماره ۲۶، تابستان ۱۳۹۷، ۶۳-۵۱  
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۲۵- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۲۹

## مطالعه دینامیک گونه‌های باسیلوس طی حذف آلودگی‌های نفتی با روش PCR-DGGE

**محمود شوندی\***: استادیار ژنتیک مولکولی، پژوهشکده محیط‌زیست و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران، shavandim@ripi.ir  
**نیما زمانیان**: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران، zamanian.nima@gmail.com  
**اعظم حدادی**: استادیار میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران، haddadi@kia.ac.ir

### چکیده

**مقدمه:** پاکسازی زیستی راهی مؤثر، ارزان و سازگار با محیط زیست برای حذف آلودگی خاک و آب است و بررسی تنوع ریز موجودات بومی و تعیین نقش آنها اهمیت بسیاری در موفقیت این روش دارد. هدف پژوهش حاضر، بررسی نقش گونه‌های باسیلوس در پاکسازی زیستی نمونه خاک آلوده به گازوئیل است.

**مواد و روش‌ها:** دو میکروکازم با افزودن میزان ۲ و ۴ درصد گازوئیل به خاک تهیه شدند و یک میکروکازم، شاهد و بدون آلودگی در نظر گرفته شد. میزان تجزیه گازوئیل، تغییرات جمعیت باکتری‌های هتروتروف و تغییرات تنوع باسیلوس‌ها پس از افزودن منابع کربن، نیتروژن و فسفات با نسبت ۱:۱۰:۱۰۰ و آب به میزان ۲۰ درصد با روش 16S rRNA PCR-DGGE طی دوره شش ماهه بررسی شد.

**نتایج:** در میکروکازم‌های ۲ و ۴ درصد به ترتیب ۵۰ و ۴۴/۴۴ درصد گازوئیل اولیه طی دوره شش ماهه تجزیه شد. روند افزایش تعداد باکتری‌های هتروتروف و بیشترین تعداد باکتری‌ها با سرعت تجزیه گازوئیل منطبق بود و تعداد باکتری‌ها در میکروکازم‌های ۲ و ۴ درصد از  $2 \times 10^8$  باکتری در هر گرم خاک به ترتیب به  $2 \times 10^{11}$  و  $2 \times 10^{12}$  باکتری در هر گرم خاک در بیشترین میزان رسید. بنابراین، ورود آلودگی سبب تحریک جمعیت میکروبی خاک می‌شود و میزان آلودگی در کارآبی پاکسازی زیستی مؤثر است.

**بحث و نتیجه‌گیری:** مقایسه تنوع باندهای DGGE نشان داد که با وارد شدن آلاینده به خاک، تنوع گونه‌های باسیلوس افزایش می‌یابد و نقش مؤثر گونه‌های باسیلوس در پاکسازی زیستی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی را نشان می‌دهد. هم‌زمان با کاهش میزان گازوئیل و تعداد باکتری‌ها، تنوع باندها در ژل DGGE نیز کمتر می‌شود. بنابراین، با ورود آلاینده به عنوان منبع کربن، تنوع گونه‌های باسیلوس در ابتدای فرآیند تجزیه افزایش و به تدریج با حذف ترکیب هیدروکربنی دوباره کاهش می‌یابد و ترکیب جمعیت به شرایط پیش از حضور آلاینده نزدیک می‌شود.

**واژه‌های کلیدی:** پاکسازی زیستی، آلودگی نفتی، تنوع میکروبی، گونه‌های باسیلوس، PCR-DGGE

ژن 16S rRNA

\* نویسنده مسئول مکاتبات

## مقدمه

امروزه به علت استفاده گسترده از ترکیبات نفتی، خطر آلودگی با ترکیبات هیدروکربنی رو به افزایش است و این آلودگی‌ها، سلامت اکوسیستم‌های طبیعی، انسان و سایر موجودات را تهدید می‌کنند. راهکار مناسب برای رویارویی با آلودگی، حذف کامل آلاینده‌ها در صورت امکان و یا تبدیل این مواد به ترکیبات بی‌خطر است (۱ و ۲).

پاکسازی زیستی<sup>۱</sup>، استفاده از موجودات زنده یا اجزای آنها برای حذف آلاینده‌ها و ترکیبات آلاینده از محیط‌های آب، خاک و هواست. اصول تمام روش‌های پاکسازی زیستی یکسان و فراهم کردن شرایط لازم برای فعال شدن موجودات زنده به‌ویژه باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌هاست. این باکتری‌ها، ترکیبات نفتی را طی متابولیسم سلولی به دی‌اکسیدکربن، زیست‌توده و یا محصولات دیگر تبدیل می‌کنند. مهم‌ترین عامل در بهینه‌سازی و تسریع روند پاکسازی زیستی، تأمین نیازهای باکتری‌های مؤثر در حذف آلودگی است و شناسایی باکتری‌های کلیدی در حذف آلودگی‌ها به بهبود شرایط برای فعالیت آنها کمک شایانی می‌کند (۲). پاکسازی زیستی آلاینده‌ها به دو روش انجام می‌شود:

۱- تلقیح زیستی<sup>۲</sup>: استفاده از این فرآیندها برای پاکسازی خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی به شکل وارد کردن ریزموجودات کشت‌شده با توانایی تجزیه زنجیره‌های مختلف هیدروکربنی به اکوسیستم خاک است. این کشت ممکن است به ریزموجوداتی متعلق باشد که از همان خاک آلوده حاصل شده‌اند یا به گونه‌های میکروبی تعلق داشته باشد که از منابع دیگر جدا شده‌اند و توانایی آنها در تجزیه هیدروکربن‌ها

اثبات شده است. هنگامی که این ریزموجودات وارد خاک شوند، ترکیبات هیدروکربنی را به شکل انتخابی استفاده می‌کنند (۳).

۲- تحریک زیستی<sup>۳</sup>: در این فرآیندها، مواد مغذی لازم برای باکتری‌های تجزیه‌کننده به شکل مواد آلی یا معدنی به خاک افزوده می‌شوند تا جمعیت بومی خاک با استفاده از این کودها افزایش یابد. این ریزموجودات بومی، آلاینده‌های هیدروکربنی را به‌عنوان منبع غذایی استفاده می‌کنند و فرض بر این است که افزایش تعداد ریزموجودات سبب افزایش سرعت تجزیه هیدروکربن در مقایسه با پاکسازی طبیعی شود و علت آن نیز افزایش میزان مواد مغذی است (۳).

پژوهشگران همواره به تنوع میکروبی خاک به‌عنوان یکی از عوامل اصلی و مؤثر بر تجزیه و پاکسازی زیستی آلاینده‌های نفتی توجه کرده‌اند (۴). گروه‌های گسترده‌ای از باکتری‌ها همانند گونه‌های *Bacillus*، *Pseudomonas*، *Acinetobacter*، *Alcaligenes*، *Nocardia* و *Rhodococcus* توان تجزیه زیستی هوازی ترکیبات نفتی را دارند (۵ و ۶). تاکنون مطالعه‌های گسترده‌ای درباره تغییرات تنوع میکروبی طی پاکسازی ترکیبات نفتی انجام شده و اثر متغیرهای مختلف مانند نوع آلاینده، افزودنی‌ها و مواد حجم‌دهنده مختلف و همچنین نوع خاک بر تنوع زیستی باکتری‌ها طی پاکسازی آلاینده‌های نفتی بررسی شده است. در مطالعه همورا<sup>۴</sup> و همکاران، اثر ترکیبات آلاینده مختلف شامل نفت خام، نفت سفید و گازوئیل بر تنوع میکروبی سه نوع خاک مختلف بررسی و مشخص شد که پس از ۵۰ روز، حدود ۳۰ تا ۷۰ درصد هیدروکربن‌های آلاینده تجزیه شده‌اند. مقایسه تنوع زیستی نشان داد که آلوده‌شدن خاک‌ها با آلاینده‌های

می‌کنند (۱۰). تنوع ژنتیکی و توانایی‌های فراوان آنزیمی سبب شده‌اند که به باسیلوس‌ها در فرآیندهای پاکسازی زیستی توجه شود و جزو ثابت بسیاری از فرمولاسیون‌های میکروبی تجاری باشند که برای پاکسازی آلاینده‌های نفتی عرضه می‌شوند (۱۱). نوآگو<sup>۷</sup> و همکاران از *Bacillus subtilis* و *Bacillus cereus* برای تجزیه گازوئیل استفاده کردند و توانایی تجزیه بسیار زیاد این دو گونه را نشان دادند (۱۲). در مطالعه خان<sup>۸</sup> و همکاران، نشان داده شد که اعضای جنس باسیلوس حتی در شرایط تنش محیطی نیز توانایی زیادی در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی دارند (۱۳).

با وجود مطالعه‌های گسترده درباره اثر تنوع زیستی بر پاکسازی آلاینده‌های نفتی و تغییرات تنوع میکروبی طی پاکسازی، تاکنون مطالعه‌ای درباره تغییرات تنوع گونه‌های باسیلوس طی پاکسازی زیستی انجام نشده است. هدف پژوهش حاضر، بررسی تنوع گونه‌های باسیلوس طی پاکسازی زیستی نمونه خاک آلوده به گازوئیل با روش‌های مستقل از کشت است. علاوه بر گونه‌های باسیلوس کشت‌پذیر در آزمایشگاه، بخش عمده‌ای از باکتری‌های نزدیک به این جنس با روش‌های متداول امروزی جداسازی نمی‌شوند؛ با وجود کشت‌پذیر نبودن، این باکتری‌ها در محیط حضور دارند و با شناسایی آنها، از توانایی متابولیک آنها برای حذف سریع‌تر آلاینده‌ها استفاده می‌شود. هدف پژوهش حاضر، مطالعه تغییرات تنوع گونه‌های باسیلوس طی فرآیند پاکسازی زیستی خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی و بررسی نقش آنها در حذف گازوئیل است. به این منظور، از روش‌های مولکولی بر مبنای PCR-DGGE برای مطالعه تنوع باسیلوس‌ها در میکروکازم‌های حاوی خاک آلوده به گازوئیل استفاده شد.

مختلف سبب انتخاب جمعیت‌های میکروبی مشترک و در عین حال منحصربه‌فرد در هر یک از خاک‌ها می‌شود. در مقابل، چنانچه خاک‌های مختلف با یک نوع آلاینده مواجه شوند، جمعیت‌های میکروبی مختلفی در آنها مشاهده می‌شوند (۷). در مطالعه دیگری، آبد<sup>۵</sup> و همکاران اثر غلظت‌های مختلف آلودگی نفتی را بر تنوع میکروبی پنج خاک مختلف بررسی کردند و نتایج نشان دادند که کمتر از ۲۰ درصد شباهت بین جمعیت میکروبی پنج خاک مختلف وجود دارد و جمعیت غالب به شاخه‌های *Gammaproteobacteria*، *Bacilli*، *Betaproteobacteria* و *Actinobacteria* تعلق دارد (۸). مصداقی‌نیا<sup>۶</sup> و همکاران در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۵ انجام دادند، باکتری‌های تجزیه‌کننده PAH را از خاک‌های آلوده به نفت ایران جداسازی کردند و باکتری‌های جداشده با توجه به آزمون‌های انجام‌شده عبارت بودند از: *Pseudomonas fluorescens*، *Serratia liquefaciens* و *Micrococcus*. آنها به این نتیجه رسیدند که با توجه به جمعیت بومی این نمونه خاک‌ها، زیست‌پالایی خاک‌های آلوده در ایران روشی کاملاً اجرایی و کاربردی است (۹).

گزارش‌های متعدد دیگری نیز وجود دارند که نقش مهم گونه‌های جنس باسیلوس در فرآیندهای تجزیه آلاینده‌های محیطی و پاکسازی زیستی را تأیید می‌کنند. جنس باسیلوس از مجموعه متنوعی از باکتری‌ها تشکیل شده که ویژگی آنها، تولید اندوسپور است. این باکتری‌ها تنوع بسیار زیادی از نظر فیزیولوژی، اکولوژی و ژنتیک دارند و توانایی آنها در تجزیه طیف گسترده‌ای از مواد با منشأ گیاهی و جانوری شگفت‌آور است. اعضای این جنس ترکیباتی مانند سلولز، نشاسته، پروتئین‌ها، آگار، هیدروکربن‌ها و ... را به راحتی تجزیه

## مواد و روش‌ها

**نمونه برداری:** نمونه‌برداری از خاک‌های غیرآلوده و با میزان بار آلی اندک از ناحیه‌ای در شمال شرقی شهر کرج (۳۵/۸۵۴۱۶۵ و ۵۰/۹۸۴۵۵۲) انجام شد. پیش از نمونه‌گیری، خاک‌های سطحی حاوی بقایای گیاهی کنار زده شدند و نمونه از عمق حدود ۳ تا ۱۰ سانتی‌متری تهیه شد. پس از برداشت، نمونه‌ها برای یکنواخت شدن ذره‌های درشت خرد و الک شدند و تمام مواد اضافی شامل سنگ‌ها و بقایای گیاهی از آنها جدا شد.

**تهیه میکروکازم:** میکروکازم، قطعه‌ای کوچک از اکوسیستم است که برای بررسی و مطالعه ویژگی‌های مختلف آن، در شرایط کنترل‌شده از محیط به آزمایشگاه منتقل می‌شود. برای تهیه میکروکازم در پژوهش حاضر، میزان ۷۰۰ گرم از خاک آماده شده در ظرف‌های دردار ریخته و میزان ۲ درصد وزنی (W/W) گازوئیل به یک ظرف و ۴ درصد وزنی (W/W) گازوئیل به ظرف دیگر اضافه شد. برای یکنواخت شدن پراکنش گازوئیل در خاک، گازوئیل در هگزان نرمال حل و یکنواخت روی خاک اسپری شد. برای حذف حلال و بخش‌های فرار گازوئیل، خاک آلوده دو هفته زیر هود شیمیایی نگهداری<sup>۹</sup> شد. پس از این مدت، برای تنظیم نسبت کربن، نیتروژن و فسفات (با نسبت ۱۰۰:۱۰:۱) به میزان ۰/۱ وزن گازوئیل، نترات آمونیوم و به میزان ۰/۱ وزن گازوئیل، دی‌پتاسیم فسفات در ۱۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل و به میکروکازم‌ها اضافه شد. سپس محتویات میکروکازم‌ها با چنگال‌های استریل مجزا، کامل مخلوط شدند. ظرف دیگری که حاوی خاک بدون آلودگی بود، شاهد در نظر گرفته شد و تنها ۱۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به آن اضافه شد. وزن

ظرف‌ها در ابتدا یادداشت و با وزن کردن هفته‌ای ظرف‌ها، رطوبت کم شده با اضافه کردن آب مقطر استریل جبران شد. میکروکازم‌ها به مدت شش ماه بررسی و مطالعه شدند.

### اندازه‌گیری میزان هیدروکربن‌های نفتی کل

**(TPH<sup>۱۰</sup>):** برای اندازه‌گیری میزان هیدروکربن‌های نفتی باقیمانده در خاک، هر دو هفته ۵ گرم از نمونه خاک میکروکازم برداشته و ۲۴ ساعت در هوای آزاد قرار داده شد تا رطوبت آن خشک شود. نمونه خاک همراه با ۵ گرم سولفات سدیم بدون آب که به مدت یک شب در آون ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک شده بود، داخل فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته و مخلوط شد. سپس، میزان ۱۰ میلی‌لیتر هگزان نرمال به هر فالکون اضافه و ورتکس شد. فالکون‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۴۵۰۰×g و دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. مایع رویی جمع شده داخل پتری‌دیش شیشه‌ای ریخته شد که از پیش وزن آن اندازه‌گیری شده بود. این روش، سه بار تکرار شد. پس از اینکه هگزان به طور کامل تبخیر و پتری‌دیش خشک شد، وزن پتری‌دیش اندازه‌گیری و با مقایسه وزن پیشین و وزن پتری‌دیش حاوی هیدروکربن‌های استخراج‌شده، میزان گازوئیل استخراج‌شده توسط هگزان محاسبه شد (۱۴).

### تحلیل هیدروکربن‌های باقیمانده با کروماتوگرافی

**گازی (GC<sup>۱۱</sup>):** برای استخراج هیدروکربن‌های نفتی از خاک، ۱ گرم نمونه خاک میکروکازم برداشته و هم‌وزن خاک، سولفات سدیم بدون آب به آن اضافه و مداوم به مدت ۱۵ دقیقه هم زده شد. پس از آبگیری، حلال دی‌کلرومتان به میزانی اضافه شد که روی خاک را کامل پوشاند و سپس ارلن‌مایر به مدت ۲۰ دقیقه در حمام سونیکاتور قرار داده شد. برای اطمینان از استخراج

خاک برداشته شد. مراحل استخراج طبق دستورعمل شرکت سازنده کیت انجام شد. برای بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از روش الکتروفورز روی ژل آگارز استفاده شد (۱۵).

#### تکثیر ژن *16S rRNA* برای بررسی تنوع با

الکتروفورز با شیب ماده واسرشت کننده: در پژوهش حاضر، برای تکثیر ژن‌های *16S rRNA* مربوط به گونه‌های باسیلوس موجود در نمونه‌های خاک از پرایمر اختصاصی گونه‌های باسیلوس (Bac-F) که Garbeva و همکاران (۲۰۰۲) طراحی کرده‌اند و برای مطالعه تنوع گونه‌های باسیلوس در خاک‌های کشاورزی استفاده شده بود و پرایمر عمومی باکتریایی 518R طراحی شده توسط Moreno و همکاران استفاده شد (۱۶ و ۱۷). توالی پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ دیده می‌شود. پرایمرها از شرکت Bioneer کره جنوبی تهیه شدند.

برای تکثیر ژن‌های *16S rRNA* از کیت PCR شرکت سیناژن استفاده شد. مواد لازم طبق دستورعمل شرکت سازنده به ویال‌های PCR افزوده شدند. دستورعمل انجام PCR شامل این مراحل است: چرخه اول در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، چرخه دوم (۳۵ تکرار) به شکل دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۶۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و چرخه سوم در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه.

کامل هیدروکربن‌های باقیمانده، مرحله استخراج حلالی سه مرتبه تکرار شد. پس از تبخیر فاز حلال، ماده استخراج شده در سیکلوهگزان حل و ۱ میکرولیتر از آن به دستگاه کروماتوگرافی Chrompack مدل 438A مجهز به آشکارساز<sup>۱۲</sup> FID و با ستون موئینه CP-sil5- (به طول ۵۰m، قطر ۰/۲۵mm و ضخامت پوشش ۰/۱۵ ml) تزریق شد. برنامه دمایی از ۴۰ درجه سانتی‌گراد آغاز و ۴ دقیقه ثابت نگه داشته شد، سپس با شیب ۵ درجه سانتی‌گراد در دقیقه به ۲۸۵ درجه سانتی‌گراد رسید.

#### شمارش باکتری‌های هتروتروف: هر دو هفته یک

بار، میزان ۱ گرم خاک از هر میکروکازم برداشته و با محلول رینگر استریل تا رقت  $10^{-9}$  سریال رقت تهیه شد. با سر سمپلر استریل، ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت روی محیط جامد R2A آگار منتقل و با پیت پاستور استریل به طور کامل روی محیط پخش شد. محیط‌ها ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. تعداد کلنی‌های موجود روی رقت مناسب، شمارش و تعداد کل باکتری‌های هتروتروف موجود در هر نمونه با توجه به ضریب رقت و حجم نمونه کشت شده محاسبه شد.

#### استخراج DNA از خاک: به این منظور، از کیت

استخراج DNA از خاک (Soil DNA Extraction Kit) محصول شرکت MN آلمان استفاده شد. نمونه برداری هر دو ماه یک بار انجام شد؛ به این شکل که محتویات هر میکروکازم یکنواخت و سپس ۰/۵ گرم

جدول ۱- توالی پرایمرهای استفاده شده در پژوهش حاضر

نام پرایمر	توالی	اختصاصیت	منبع
Bac-F	5'-(GC clamp)GGGAAACCGGGCTAATACCGGAT-3'	<i>Bacillus spp.</i>	Garbeva et al. (۱۶)
518R	5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGG-3'	عمومی باکتریایی	Moreno et al. (۱۷)

اکریل آمید و ۱/۰۷ گرم بیس‌اکریل آمید ساخته شد و سپس محلول‌های صفر و ۱۰۰ درصد طبق مقادیر ارائه شده در جدول ۲ آماده شدند.

جدول ۲- محلول‌های واسرشت کننده صفر و ۱۰۰ درصد

نام معرف	محلول صفر درصد	محلول ۱۰۰ درصد
Acrylamide/Bis درصد ۴۰	۱۸/۸ml	۱۸/۸ml
۵۰ X TAE buffer	۲ml	۲ml
Formamide	۴۰ml	-----
Urea	۴۲g	-----
dH2O	to ۱۰۰ml	to ۱۰۰ml

برای جداسازی قطعه‌های تکثیر شده ژن *16S rRNA* در پژوهش حاضر، از شیب غلظت‌های بهینه شده ۶۵ و ۲۵ درصد استفاده شد. الکتروفورز با ولتاژ ۸۰ ولت و دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت انجام و پس از پایان یافتن الکتروفورز، ژل به مدت ۳۰ دقیقه در رنگ اتیدیوم بروماید قرار داده شد و به مدت ۲۰ دقیقه در آب دیونیزه رنگبری شد. ژل با دستگاه Gel Documentation مشاهده و تصویر آن برای مطالعه‌های بعدی ذخیره شد.

### نتایج

#### اندازه‌گیری میزان تجزیه هیدروکربن‌های نفتی:

تحلیل میزان کل هیدروکربن‌های نفتی (TPH) به‌عنوان شاخص حذف هیدروکربن‌های نفتی در میکروکازم‌ها استفاده شد. مطابق شکل ۱، روند حذف آلاینده گازوئیل در میکروکازم ۲ درصد سریع‌تر و طی شش ماه، ۵۰ درصد گازوئیل از خاک حذف شده است؛ این در حالی است که روند تجزیه در میکروکازم ۴ درصد کندتر و طی این مدت، حدود ۴۴/۴۴٪ گازوئیل از این میکروکازم حذف شده است.

#### تعیین تنوع با استفاده از روش ژل الکتروفورز با

شیب ماده واسرشت کننده ( $^{13}DGGE$ ): محصول PCR حاصل از DNA محیطی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *16S rRNA*، قطعه‌هایی هم‌اندازه و با طول یکسان هستند. بنابراین ژن‌های *16S rRNA* موجود محصول PCR یادشده با الکتروفورز ژل آگارز از یکدیگر تفکیک نمی‌شوند و تنوع موجود در نمونه را نشان نمی‌دهند. تغییرات توالی (محتوای GC) بین rRNAهای مختلف میکروبی، ویژگی‌های مختلفی طی حرکت مولکول‌های DNA در ژل دناتوره کننده ایجاد می‌کنند که اساس چندشکلی بین گروه‌های میکروبی در DGGE است (۱۸). در این روش، رشته‌های DNA دو رشته‌ای در شیبی از مواد واسرشت کننده (اوره و فرمامید) در طول ژل حرکت می‌کنند و با گذشت زمان و زیاد شدن غلظت ترکیبات واسرشت کننده، پیوندهای بین بازهای موجود در دو رشته از هم باز می‌شوند و مولکول DNA کم‌کم شکل Y به خود می‌گیرد و در نهایت، در نقطه‌ای از ژل متوقف می‌شود. نکته مهم این است که اگر دو رشته DNA کامل از یکدیگر جدا شوند، میزان تحرک الکتروفورزی دوباره با طول قطعه ارتباط خواهد داشت و بنابراین باید از جداسدن کامل دو رشته DNA جلوگیری شود؛ به این منظور، یک توالی GC<sup>۱۴</sup> به طول ۳۰ تا ۴۰ نوکلئوتید به ابتدای ۵' یکی از دو پرایمر استفاده شده برای تکثیر قطعه‌های مدنظر اضافه شد.

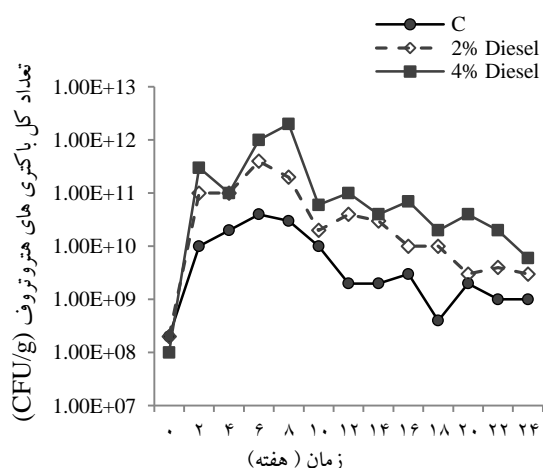
#### الکتروفورز با شیب ماده واسرشت کننده: برای انجام

DGGE از DCoDE™ (BioRad, Hercules, CA) استفاده شد. پیش از انجام DGGE، محلول‌های ژل آکریل آمید و محلول‌های واسرشت کننده بر اساس دستورعمل شرکت BioRad تهیه شدند. ابتدا محلول ۴۰ درصد آکریل آمید/بیس‌اکریل آمید حاوی ۳۸/۹۳ گرم

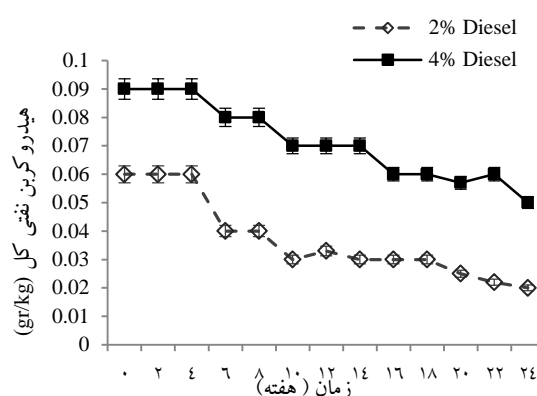
### شمارش باکتری‌های هتروتروف: تعداد کل

باکتری‌های کشت پذیر به‌عنوان شاخصی از فعالیت ریز موجودات خاک در دوره پاکسازی ارزیابی شد. تغییرات تعداد کل باکتری‌ها طی تجزیه زیستی گازوئیل در میکروکازم‌های حاوی ۲ و ۴ درصد گازوئیل در شکل ۳ دیده می‌شود.

با توجه به شکل ۳، در هر سه میکروکازم با افزایش میزان رطوبت خاک در هفته دوم، تعداد باکتری‌ها افزایش یافته است. اگرچه پس از افزایش اولیه در میکروکازم شاهد، سیر تغییر تعداد کل باکتری‌ها تقریباً ثابت و بدون تغییر درخور توجهی طی شش ماه است، تعداد باکتری‌ها در میکروکازم‌های ۲ و ۴ درصد پس از هفته دهم کاهش پیوسته و آرامی را نشان می‌دهد. بیشترین میزان باکتری‌های هتروتروف شمارش شده در میکروکازم شاهد (بدون گازوئیل) حدود  $10^8$  باکتری در هر گرم خاک بود، در حالی که بیشترین تعداد باکتری (در حدود  $10^{12}$  باکتری در هر گرم خاک) در میکروکازم ۴ درصد در هفته هشتم مشاهده شد.

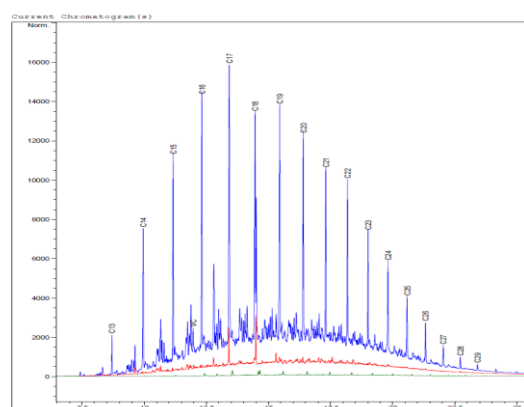


شکل ۳- تعداد کل باکتری‌های کشت پذیر در هر میکروکازم طی تجزیه گازوئیل در شش ماه (C: شاهد)



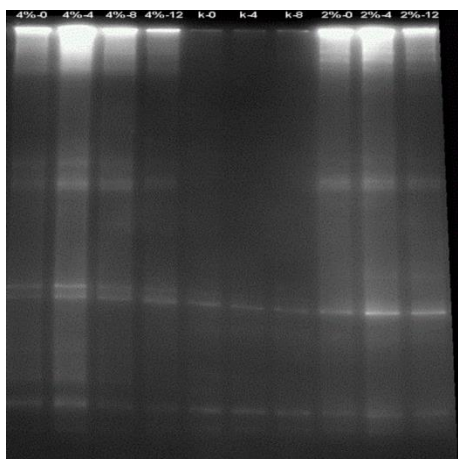
شکل ۱- بررسی میزان حذف ترکیبات نفتی در میکروکازم‌های حاوی ۲ و ۴ درصد گازوئیل طی دوره شش ماهه

برای اطلاع دقیق‌تر از چگونگی حذف گازوئیل و روند حذف هیدروکربن‌های مختلف در خاک آلوده، نمونه‌ای از هر یک از میکروکازم‌ها در شروع و پایان آزمایش تهیه و پس از استخراج باقیمانده هیدروکربن‌ها در خاک، با کروماتوگرافی گازی بررسی شد. شکل ۲ نتایج مربوط به تحلیل نمونه گازوئیل اولیه (آبی) و هیدروکربن باقیمانده استخراج شده از میکروکازم ۴ درصد (قرمز) و میکروکازم ۲ درصد (سبز) با روش کروماتوگرافی گازی را نشان می‌دهد.



شکل ۲- تحلیل کیفیت هیدروکربن‌های نمونه گازوئیل اولیه (آبی) و هیدروکربن‌های استخراج شده از میکروکازم ۴ درصد (قرمز) و میکروکازم ۲ درصد (سبز) با کروماتوگرافی گازی





شکل ۵- مقایسه تغییرات تنوع گونه‌های جنس باسیلوس در ژل DGGE در میکروکازم‌های شاهد (K)، ۲ درصد گازوییل (2%) و ۴ درصد گازوییل (4%) در زمان‌های مختلف

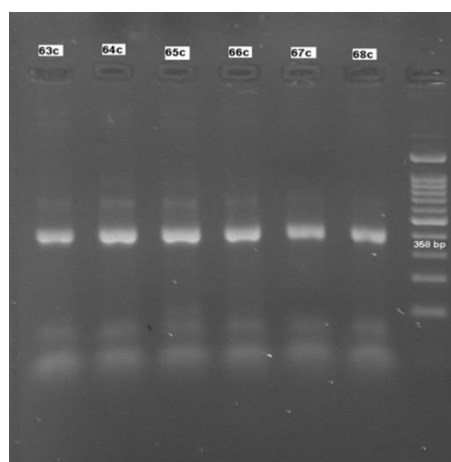
### بحث و نتیجه‌گیری

پاکسازی زیستی، روشی کارآمد و اقتصادی و جایگزین مناسب روش‌های فیزیکی و شیمیایی است (۱۹). تجزیه زیستی مواد نفتی و دیگر هیدروکربن‌ها در محیط، فرآیند پیچیده‌ای است که از جنبه‌های مختلف به عوامل فیزیکی، شیمیایی محیط، مقدار نفت یا نوع هیدروکربن‌های موجود در محیط و تعداد و ساختار جمعیت بومی میکروبی وابسته است (۲۰). در حال حاضر، بیشتر میکروب‌های موجود در نمونه‌های محیطی، در آزمایشگاه کشت پذیر نیستند و از این رو، به روش‌های مولکولی و مستقل از کشت برای مطالعه تنوع میکروبی توجه روزافزون شده است. روش DGGE، یکی از روش‌های مستقل از کشت است که امکان مطالعه حضور و فراوانی نسبی جمعیت‌های مختلف میکروبی را در محیط از طریق نشانگرهای ژنتیکی مانند ژن *16S rRNA* میسر می‌کند (۲۱).

اعضای جنس باسیلوس، باکتری‌های میله‌ای گرم مثبت، اغلب متحرک و از نظر توان متابولیکی بسیار متنوع هستند و در فرآیندهای صنعتی مختلف و متنوعی

### تکنیر ژن *16S rRNA* با استفاده از پرایمرهای DGGE:

DNA محیطی که از طریق کیت DNA Extraction kit شرکت MN استخراج شده بود به عنوان الگوی PCR با استفاده از پرایمرهای ویژه DGGE (Bac-F و 518R) استفاده شد. درستی انجام واکنش زنجیره پلیمرز با مشاهده قطعه مدنظر به طول ۳۵۸ جفت باز با الکتروفورز افقی تأیید شد (شکل ۴).



شکل ۴- تعیین دمای مناسب برای اتصال پرایمرها و تکنیر ژن *16S rRNA* در واکنش PCR

### الکتروفورز با شیب ماده واسرشت کننده: محصولات

واکنش PCR حاصل از DNA سه میکروکازم که هر دو ماه یک بار نمونه برداری شده بودند، برای انجام DGGE استفاده شدند. از غلظت‌های مختلف ۳۰ تا ۷۰، ۴۰ تا ۶۰، ۳۰ تا ۶۰ و ۲۵ تا ۶۵ شیب مواد دنا توره کننده برای بهینه‌سازی تفکیک باندها در روش DGGE استفاده و در نهایت شیب غلظت ۲۵ تا ۶۵ درصد که بهترین تفکیک باندها در آن مشاهده شد به عنوان غلظت‌های بهینه انتخاب شد. مقایسه شدت و محل قرارگیری باندها در ژل DGGE نشان داد که بین دو میکروکازم حاوی گازوییل اختلاف در خور توجهی از نظر تنوع گونه‌های باسیلوس طی ماه‌های مختلف وجود ندارد.

ترکیبات نفتی برای باکتری‌ها یا کاهش دسترسی آنها به مواد مغذی، سبب کاهش سرعت تجزیه آلاینده شده است. در پژوهش محسن‌زاده و احمدی<sup>۱۶</sup> در زمینه پتانسیل پاکسازی میکروبی خاک‌های آلوده به گازوئیل در شهر همدان نیز نتایج مشابهی یافت و بیشترین میزان حذف گازوئیل در غلظت ۰/۵ درصد مشاهده شد (۲۴).

مطابق شکل ۱، در ابتدای فرآیند تجزیه زیستی، سرعت حذف گازوئیل در هر دو میکروکازم سریع‌تر است و به تدریج با کاهش غلظت آلاینده پس از هفته دهم در هر دو میکروکازم کندتر می‌شود، هرچند کاهش سرعت تجزیه در میکروکازم حاوی ۲ درصد گازوئیل مشهودتر است. بررسی میزان هیدروکربن‌های باقیمانده در میکروکازم‌های ۲ و ۴ درصد با نمونه گازوئیل اولیه با روش کروماتوگرافی گازی (شکل ۲) نیز نتایج روش اندازه‌گیری وزنی TPH را تأیید می‌کند. همچنین این شکل نشان می‌دهد که با وجود تفاوت چشمگیر میزان تجزیه هیدروکربن‌ها بین دو میکروکازم بررسی شده، بخش‌های مختلف برش گازوئیل در هر دو میکروکازم به شکل یکسان تجزیه شده‌اند و تمایل ویژه‌ای برای مصرف هیدروکربن‌های کوتاه یا بلندزنجیره در هیچ‌یک از میکروکازم‌ها مشاهده نمی‌شود.

روند تجزیه زیستی مشاهده شده در پژوهش حاضر با نتایج بررسی تاکواری<sup>۱۷</sup> و همکاران مشابه است. در مطالعه‌ای که تاکواری و همکاران در سال ۲۰۱۲ انجام دادند، تجزیه زیستی گازوئیل در میکروکازم از راه تحریک زیستی و تلقیح زیستی بررسی شد و نتایج نشان دادند که میزان TPH تمام نمونه‌ها طی مدت پژوهش تا حدی کاهش یافته است. در میکروکازمی که از کمپوست برای تحریک زیستی استفاده شد، کاهش

استفاده می‌شوند. به علت تنوع مسیرهای متابولیکی گونه‌های باسیلوس، به‌طور گسترده‌ای در پاکسازی آلاینده‌های زیست‌محیطی استفاده می‌شوند. در مطالعه داس و موکرچی، از *Bacillus subtilis* برای پاکسازی خاک آلوده به ترکیبات نفتی استفاده و نشان داده شد که این باکتری با تولید بیوسورفکتانت سبب افزایش سرعت پاکسازی آلاینده نفتی می‌شود (۲۲).

راجو<sup>۱۵</sup> و همکاران، از دو گونه باسیلوس *B. cereus* و *B. thuringiensis* B3 برای تجزیه زیستی گازوئیل، نفت خام و روغن مصرف شده اتومبیل استفاده کردند؛ آنها نشان دادند که مخلوط این دو سویه به ترتیب ۸۴ و ۲۴ درصد TPH را از خاک آلوده به نفت خام و روغن مصرف شده طی ۳۰ روز حذف می‌کند (۲۳).

با وجود اهمیت گونه‌های جنس باسیلوس در حذف آلاینده‌های زیست‌محیطی و پاکسازی زیستی که به برخی از آنها اشاره شد، تاکنون مطالعه جامعی درباره تغییرات جمعیت آنها طی پاکسازی زیستی خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی انجام نشده است. برای نخستین بار در پژوهش حاضر، تغییرات تنوع گونه‌های جنس باسیلوس طی حذف زیستی گازوئیل از خاک آلوده مطالعه شد. این مطالعه، اهمیت گونه‌های کشت‌پذیر و کشت‌ناپذیر جنس باسیلوس در حذف آلاینده‌های خاک و کمک به پایداری اکوسیستم‌های طبیعی را نشان می‌دهد.

مطابق شکل ۱، سرعت تجزیه ترکیبات هیدروکربنی در میکروکازم ۲ درصد نسبت به میکروکازم ۴ درصد بیشتر است و این نشان می‌دهد که غلظت بهینه آلاینده گازوئیل در خاک مطالعه شده حدود ۲ درصد است و افزایش غلظت آلاینده به علت عواملی مانند سمیت

شاهد) یکسان بوده، احتمالاً افزایش تعداد باکتری‌های کشت‌پذیر ناشی از تحریک زیستی و هوادهی خاک بوده است (۲۷).

در مطالعه شبیر<sup>۱۹</sup> و همکاران، بیشترین تعداد باکتری‌ها در میکروکازم خاک آلوده به نفت سفید، دو تا سه هفته پس از گرمخانه‌گذاری شمارش و با بیشترین سرعت حذف آلاینده هم‌زمان بود (۲۸).

الگوی باندها در ژل DGGE، تخمین خوبی از تنوع گونه‌های باکتریایی موجود در محیط است و اگرچه این فرض محدودیت‌هایی دارد، در پژوهش‌های متعددی برای بررسی تنوع باکتریایی استفاده شده است؛ از جمله این محدودیت‌ها عبارتند از: خطای ناشی از استخراج DNA، تکثیرنشده نشانگرهای ژنی مربوط به گونه‌های ناشناس و تشکیل کایمرای PCR کشت‌های مخلوط. با وجود این، محل قرارگیری باندها و فراوانی و دانسیته باندها به‌عنوان شاخصی از تنوع میکروبی استفاده می‌شود (۲۹).

در پژوهش حاضر، از پرایمرهای اختصاصی جنس *باسیلوس* و روش DGGE برای بررسی تنوع گونه‌های *باسیلوس* در خاک استفاده شد. مطابق شکل ۵، با گذشت زمان و هم‌زمان با اضافه‌شدن گازوئیل و منابع غذایی در میکروکازم‌های حاوی گازوئیل، تنوع باندها کاهش یافت و میکروکازم ۴ درصد در نقطه ۴ (هفته هشتم) بیشترین تنوع باند را داشت که با میزان گازوئیل و میزان شمارش باکتری‌ها در این میکروکازم متناسب بود. از هفته هشتم به بعد و هم‌زمان با کاهش میزان گازوئیل و کاهش تعداد باکتری‌ها، تنوع باندهای حاصل از تکثیر ژن *16S rRNA* گونه‌های *باسیلوس* نیز کاهش یافت. در میکروکازم شاهد، رشد باکتری‌ها پس از اضافه‌کردن آب افزایش و تعداد باکتری‌ها پس از کاهش منابع

سریع TPH در ۱۰ روز اول مشاهده شد و پس از آن، سرعت تجزیه زیستی تا روز ۶۰ به تدریج کاهش یافت. با تکمیل شدن فرآیند پاکسازی طی ۱۲۰ روز، حدود ۸۷/۶ درصد ترکیبات نفتی تجزیه شدند (۲۵). در پژوهش حاضر، میزان حذف ترکیبات نفتی در بهترین حالت ۵۰ درصد بود که در میکروکازم حاوی ۲ درصد گازوئیل مشاهده شد و در مقایسه با نتایج Taccari و همکاران، کمتر است. به نظر می‌رسد که میزان زیاد ترکیبات هوموس موجود در کمپوست عالی سبب جداشدن بهتر ترکیبات آب‌گریز از ذره‌های خاک و افزایش سرعت حذف TPH می‌شوند (۲۶).

مطابق شکل ۳، رشد باکتری‌ها طی دو هفته اول و پس از افزودن آب، نترات، فسفات و هیدروکربن‌ها در تمام میکروکازم‌ها افزایش یافته و جمعیت باکتری‌های هتروتروف به هزار برابر مقدار اولیه خود رسیده است. پس از هفته دهم و هم‌زمان با مصرف بخش عمده‌ای از ترکیبات در دسترس موجود در گازوئیل، تعداد باکتری‌ها در هر دو میکروکازم ۲ و ۴ درصد افت کرد و پس از آن، در مقدار به نسبت ثابت حدود  $10^9$  باکتری در هر گرم از خاک باقی ماند. مقایسه شکل‌های ۱ و ۳ نشان می‌دهد که روند افزایش تعداد کل باکتری‌های هتروتروف و بیشترین تعداد باکتری‌ها با سرعت تجزیه گازوئیل کاملاً منطبق است و با کاهش تعداد باکتری‌ها در هفته دهم، سرعت تجزیه زیستی نیز کاهش می‌یابد. این نتایج با داده‌های پژوهش واکوئز<sup>۱۸</sup> و همکاران هم‌خوانی دارد؛ در پژوهش یادشده نیز پس از افزودن آب و منابع نیتروژن و فسفات به میکروکازم حاوی خاک و گازوئیل، جمعیت میکروبی بی‌درنگ به میزان ده تا صد برابر افزایش یافت و نتیجه‌گیری شد که چون روند افزایش در تمام میکروکازم‌ها (از جمله میکروکازم

درصد گازوئیل به ترتیب در میکروکازمی با ۲ و ۴ درصد گازوئیل طی دوره شش ماهه تجزیه شد. بنابراین، میزان آلودگی هیدروکربنی در کارآبی پاکسازی زیستی مؤثر است. بیشترین تعداد باکتری‌ها در میکروکازم‌های حاوی گازوئیل هم‌زمان با افزایش سرعت تجزیه زیستی شمارش شدند و در هر دو میکروکازم، حضور بیشترین تعداد باکتری‌ها با بیشترین سرعت حذف آلاینده هم‌زمان بود. بنابراین، نتیجه‌گیری می‌شود که شمارش جمعیت میکروبی شاخص مناسبی برای پایش فعالیت تجزیه زیستی آلاینده نفتی در خاک است و با توجه به تغییرات تنوع باندهای DGGE، نتایج پژوهش حاضر نشان دادند که گونه‌های باسیلوس نقش مؤثری در پاکسازی آلودگی خاک در خاک‌های آلوده به گازوئیل دارند.

#### تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر با حمایت مادی و معنوی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج انجام شده است. نویسندگان از حمایت‌های ارزنده کارشناسان محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد کرج به ویژه سرکار خانم اسدی سپاسگزاری می‌کنند.

#### References

- (1) Abd-Elsalam HE., Hafez EE., Hussain AA., Ali AG., El-Hanafy AA. Isolation and identification of three rings poly aromatic hydrocarbons (anthracene and phenantherene) degrading bacteria. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* 2009; 5(1): 31-38.
- (2) Haritash AK., Kaushik CP. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of Hazardous Materials* 2009; 169: 1-15.

غذایی در محیط کاهش یافت و این کاهش با کاهش تنوع باندها در ژل DGGE متناسب بود. بیشترین تعداد باکتری (CFU/g)  $10^{11} \times 2$  در میکروکازم ۲ درصد و در هفته هشتم شمارش شد و به مرور با کاهش گازوئیل، تعداد باکتری‌ها نیز کمتر شد و این کاهش با کاهش تنوع باندها روی ژل DGGE هم‌زمان بود.

مقایسه تنوع باندهای DGGE بین سه میکروکازم بررسی شده نشان می‌دهد که با وارد شدن آلاینده به خاک، تنوع باسیلوس‌ها افزایش می‌یابد که نقش باسیلوس‌ها در تجزیه گازوئیل را نشان می‌دهد، به طوری که تنوع باندها در میکروکازم ۲ درصد بیشتر از میکروکازم شاهد و در میکروکازم ۴ درصد بیش از میکروکازم ۲ درصد است. به احتمال بسیار، این الگوی باندها نشان می‌دهد که با ورود آلاینده به عنوان منبع کربن، تنوع گونه‌های باسیلوس در ابتدای فرآیند تجزیه افزایش و در ادامه با حذف ترکیب هیدروکربنی به تدریج کاهش می‌یابد که شاید نشان‌دهنده بازگشت ترکیب جمعیت به شرایط پیش از حضور آلاینده است.

مطالعه تنوع میکروبی هم‌زمان با تجزیه زیستی در گزارش‌های متعددی استفاده و نتایج جالب توجهی از آن حاصل شده است. سی<sup>۲۰</sup> و همکاران، تنوع میکروبی را در میکروکازم‌هایی که با هیدروکربن‌های آروماتیک آغشته شده بودند، مطالعه و مشاهده کردند که تنوع جمعیت میکروبی هم‌زمان با ورود هیدروکربن‌ها کاهش می‌یابد (۳۰). ویناس<sup>۲۱</sup> و همکاران به نتایج کاملاً متضادی در مطالعه دیگری رسیدند؛ در بررسی آنها مشخص شد که در خاک آلوده به creosote طی فازهای مختلف تجزیه هیدروکربن‌ها، گروه‌های مختلفی از باکتری‌ها در خاک فعال می‌شوند (۳۱).

نتایج مطالعه حاضر نشان دادند که ۵۰ و ۴۴/۴۴

- (3) Abdulsalam S., Bugaje IM., Adefila SS., Ibrahim S. Comparison of biostimulation and bioaugmentation for remediation of soil contaminated with spent motor oil. *International Journal Environment Science Technology* 2011; 8(1): 187-194.
- (4) Paul D., Pandey G., Pandey J., Jain RK. Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration. *Trends in Biotechnology* 2005; 23(3): 135-142.
- (5) Onifadeh AK., Abubakr FA. Characterization of hydrocarbon-degrading microorganisms isolated from crude oil contaminated soil and remediation of the soil by enhanced natural attenuation. *Research Journal of Microbiology* 2007; 2(2): 149-155.
- (6) Caldini G., Cenci G., Manenti R., Morozzi G. The ability of an environmental isolate of *Pseudomonas fluorescens* to utilize chrysene and other four- ring polynuclear aromatic hydrocarbons. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1995; 44(1-2): 225-229.
- (7) Hamamura N., Ward DM., Inskeep WP. Effects of petroleum mixture types on soil bacterial population dynamics associated with the biodegradation of hydrocarbons in soil environments. *FEMS Microbiology Ecology* 2013; 85(1): 168-178.
- (8) Abed RM., Al-Kindi S., Al-Kharusi S. Diversity of bacterial communities along a petroleum contamination gradient in desert soils. *Microbial Ecology* 2015; 69(1): 95-105.
- (9) Mesdaghinia AR., Nasseri S., Arbabi M., Rezaie S. Isolation of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the petroleum contaminated soils in Iran Proceedings of the 9th international conference on Environmental Science and Technology, Rhodes Island, Greece 2005; 984-991.
- (10) Slepecky RA., Hemphill HE. The genus *Bacillus*-nonmedical In: *The prokaryotes*. Rosenberg, E: Springer Verlag; 2006: 530-562.
- (11) Speight JG., Arjoon KK. *Bioremediation of petroleum and petroleum products*. New York: John Wiley & Sons; 2012.
- (12) Nwaogu LA., Onyeze GOC., Nwabueze RN. Degradation of diesel oil in a polluted soil using *Bacillus subtilis*. *African Journal of Biotechnology* 2008; 7(12): 1939-1943.
- (13) Khan K., Naeem M., Arshed MJ., Asif M. Extraction and characterization of oil degrading bacteria. *Journal of Applied Sciences* 2006; 6: 2302-2306.
- (14) Schwab AP., Su J., Wetzel PS., Banks MK. Extraction of petroleum hydrocarbons from soil by mechanical shaking. *Environmental Science & Technology* 1999; 33(11): 1940-1945.
- (15) Sambrook J. Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring laboratory Press; 2001.
- (16) Garbeva P., Van Veen JA., Van Elsas JD. Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes via PCR-DGGE. *Microbial Ecology* 2003; 45(3): 302-316.
- (17) Moreno C., Romero J., Espejo RT. Polymorphism in repeated *16S rRNA* genes is a common property of type strains and environmental isolates of the genus *Vibrio*. *Microbiology* 2002; 148(4):1233-1239.
- (18) Fischer MM., Lerman LS. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two dimensional gel electrophoresis. *Cell* 1979; 16(1): 191-200.
- (19) Zhang Z., Hou Z., Yang C., Ma C., Tao F., Xu P. Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. *Bioresource Technology* 2011; 102(5): 4111-4116.
- (20) Leahy JG., Colwell RR. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews* 1990; 54(3): 305-315.

- (21) Vinas M., Sabate J., Espuny MJ., Solanas AM. Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavy creosotecont animated soil. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; 71(11): 7008-7018.
- (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* 2006; 98(7): 1339-1345.
- (23) Raju MN., Leo R., Herminia SS., Morán REB., Venkateswarlu K., Laura S. Biodegradation of Diesel, Crude Oil and Spent Lubricating Oil by Soil Isolates of *Bacillus* spp. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 2017; 1-8.
- (24) Mohsenzadeh F., Ahmadi NA. Study on potential microbial removal of diesel oil from contaminated soil in Hamedan city. *Biological Journal of Microorganisms* 2012; 1(2) 77-86.
- (25) Taccari M., Milanovic V., Comitini F., Casucci C., Ciani M. Effects of biostimulation and bioaugmentation on diesel removal and bacterial community. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2012; 66(1): 39-46.
- (26) Namkoong W., Hwang EY., Park JS., Choi JY. Bioremediation of dieselcontaminated soil with composting. *Environmental Pollution* 2002; 119(1): 23-31.
- (27) Vázquez S., Balbina Nogales L., Ruberto E., Hernández J., Christie-Oleza A., Lo Balbo Rafael B., et al. Bacterial community dynamics during bioremediation of diesel oil-contaminated Antarctic soil. *Microbial Ecology* 2009; 57(4): 598-610.
- (28) Shabir G., Afzal M., Anwar F., Tahseen R., Khalid ZM. Biodegradation of kerosene in soil by a mixed bacterial culture under different nutrient conditions. *International Biodeterioraion & Biodegradation* 2008; 61(2): 161-166.
- (29) Stamper DM., Walch M., Jacobs RN. Bacterial population changes in a membrane bioreactor for graywater treatment monitored by denaturing gradient gel electrophoretic analysis of *16S rRNA* gene fragments. *Applied and Environmental Microbiology* 2003; 69(2): 852-860.
- (30) Sei K., Inoue D., Wada K., Mori K., Ike M., Kohno T., Fujita M. Monitoring behaviour of catabolic genes and change of microbial community structures in seawater microcosms during aromatic compound degradation. *Water Research* 2004; 38(20): 4405-4414.
- (31) Vinas M., Sabaté J., Espuny MJ., Solanas AM. Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; 71(11): 7008-7018.

- 
- <sup>1</sup>- Bioremediation  
<sup>2</sup>- Bioaugmentation  
<sup>3</sup>- Biostimulation  
<sup>4</sup>- Hamamura  
<sup>5</sup>- Abed  
<sup>6</sup>- Mesdaghinia AR.  
<sup>7</sup>- Nwaogu  
<sup>8</sup>- Khan  
<sup>9</sup>- Weathering  
<sup>10</sup>- Total petroleum hydrocarbon  
<sup>11</sup>- Gas chromatography  
<sup>12</sup>- Flame Ionization Detector  
<sup>13</sup>- Denaturing Gradiaent Gel Electrophoresis  
<sup>14</sup>- CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCC  
CGCCGCCC CCGCCCGG GAAACCGGGG  
<sup>15</sup>- Raju  
<sup>16</sup>- Mohsenzadeh F., Ahmadi NA.  
<sup>17</sup>- Taccari  
<sup>18</sup>- Vázquez  
<sup>19</sup>- Shabir  
<sup>20</sup>- Sei  
<sup>21</sup>- Vinas