شناسایی باکتری تولید کننده بیوسورفکتانت جدا شده از خاکهای آلوده نفتی شهرستان بروجرد

محسن میرزایی[1*]، رضا یاری[2]، مرتضی چلویی[3]

۱. استادیار، دانشکده پیراپزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، بروجرد، ایران
۲. استادیار، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، بروجرد، ایران
۳. کارشناس ارشد، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، بروجرد، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۱۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۲/۱۰)

چکیده

سابقه و هدف: بیوسورفکتانت ماده با ارزشی است که در صنایعی نظیر نفت، پزشکی، داروسازی، آرایشی بهداشتی، غذایی و کشاورزی کاربردهای گسترده‌ای دارد. هدف از تحقیق حاضر شناسایی باکتری‌های بومی تولید کننده بیوسورفکتانت موجود در خاک آلوده به ضایعات نفتی می‌باشد.

مواد و روش کار: نمونه برداری از خاکهای آلوده نفتی اطراف شهرستان بروجرد انجام شد. پس از رقت سازی و کشت، باکتری‌های متفاوتی جداسازی شدند. با استفاده از آزمون‌های تولید بیوسورفکتانت مانند آزمون همولیز خون در محیط بلاد آگار، امولسیونه کنندگی، انهدام قطره، گسترش نفت خام و مقدار تجزیه شده هیدروکربن‌های نفتی، باکتری‌های تولید کننده بیوسورفکتانت جدا شدند. قوی‌ترین گونه باکتریایی تولید کننده بیوسورفکتانت، انتخاب و در محیط کشت بوشنل هاس براث همراه با گازوئیل در انکوباتور شیکردار کشت داده شد. پس از تولید و تخلیص بیوسورفکتانت از کلنی مورد نظر برای شناسایی جنس و گونه باکتری، آزمون‌های بیوشیمیایی همراه با PCR ناحیه*16 sRNA* و تعیین توالی انجام شد.

نتایج: با انجام آزمایشات متعدد مشخص شد باکتری، تولید کننده مقادیر فراوانی بیوسورفکتانت می‌باشد. در بررسی نرم افزاری پس از تعیین توالی ثابت گردید باکتری بیش از ۹۷ درصد با جنس و گونه باسیلوس سوبتیلیس شباهت ژنتیکی دارد.

نتیجه گیری: با توجه به فراوانی این باکتری در خاک و توانایی بالای آن در تولید بیوسورفکتانت و هم‌چنین گستردگی آلودگی‌های مواد نفتی در کشور می‌توان از این باکتری جهت رفع آلودگی‌های زیست محیطی استفاده نمود.

کلیدواژگان

آلودگی محیطی، باسیلوس سوبتیلیس، بیوسورفکتانت، نفت.

* نویسنده مسئول، رایانامه: mirzaei.iaub@gmail.com

مقدمه

بیوسورفکتانت‌ها، سورفکتانت‌های طبیعی‌اند که منجر به امولسیون شدگی، جابه‌جا کنندگی، افزایش حلالیت و تحرک ترکیبات آلی آبگریز می‌شوند (۱ و ۲). سورفکتانت‌ها قادر به تشکیل خوشه‌هایی با اندازه کلوییدی به نام میسل (Micelle) می باشند. میسل‌ها به واسطه قابلیت بالا در افزایش حلالیت مواد کم محلول در آب، اهمیت ویژه ای در داروسازی دارند. بر اساس ساختار شیمیایی و منشأ میکروبی، بیوسورفکتانت‌ها به ۵ گروه اصلی تقسیم می‌شوند (۳). سورفکتانت‌های سبک شامل گلیکولیپید، لیپوپپتید و فسفولیپیدها هستند در حالی که سورفکتانت‌های سنگین دو دسته پلیمری و ذره‌ای می‌باشند. گلیکولیپیدها عمده‌ترین بیوسورفکتانت‌ها هستند و باسیلوس‌ها طیف گسترده‌ای از لیپوپپتیدها را ترشح می‌کنند (۴، ۵ و ۶).

عوامل ژنتیکی، تغذیه‌ای، فیزیکی و شیمیایی شامل اسیدیته، شوری، درجه حرارت و فشار اکسیژن تولید بیوسورفکتانت را تحت تاثیر قرار می‌دهند (۷ و ۸). بیوسورفکتانت‌ها در صنایع مختلف کشاورزی، نساجی، دارویی، بهداشتی و آرایشی، نفتی و حفاری به عنوان عوامل کاهش دهنده کشش سطحی کاربرد دارند (۲ و ۳) از جمله کاربردهای آن در زمینه‌های دارویی می توان بعنوان عامل ضد باکتری، ضد قارچ، ضد ویروس، ضد سرطان، ضد چسب، آنتی‌اکسیدان، محرک فیبروبلاست‌های پوستی، واکسن و ژن درمانی اشاره کرد (۹).

در مطالعه حاضر سعی شد با نمونه برداری و جداسازی از خاکهای آلوده باکتری بومی مولد بیوسورفکتانت شناسایی گردد. سپس میزان تولید آن ارزیابی و بهترین ایزوله جهت تولید صنعتی بیوسورفکتانت بهینه سازی گردد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری از عمق یک تا ۱۰ سانتی‌متری خاکهای اطراف کارخانه آسفالت شهرستان بروجرد واقع در شمال جاده کمربندی جنب اداره هوا شناسی که ده‌ها سال توسط انواع هیدروکربن‌ها آلوده شده بودند؛ انجام شد. هر کدام از کلنی‌ها بر روی بلاد آگار کشت داده شدند چرا که جداسازی باکتری‌های با توانایی ایجاد همولیز ملاک ادامه کار بود (۱۰ و ۱۱). آزمونهای متعدد میکربی، بیوشیمیایی و ملکولی زیر انجام پذیرفت:

الف) آزمون امولسیون کنندگی: باکتریهای جدا شده از محل نمونه برداری در محیط های کشت مایع جداگانه حاوی مواد معدنی حداقل به مدت ۲۴ ساعت در ۱۸۰ دور بر دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند. پس از اتمام دوره، محیط های کشت در ۱۰ هزار دور به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شده و از سوپرناتانت آنها برای سنجش آزمونهای تولید بیوسورفکتانت استفاده گردید. از آزمون E24 (Emulsification index) استفاده شد. ابتدا ۲ ml از سوپرناتانت درون لوله های مجزای آزمایش ریخته سپس ۲ ml گازوئیل اضافه شد. لوله ها ۲ دقیقه ورتکس شدند و ۲۴ ساعت در محیط ساکن قرار گرفتند. در ادامه با توجه به فرمول زیر شاخص امولسیفیکاسیون برای هر نمونه محاسبه شد. از تواین ۸۰ بعنوان شاهد مثبت و از محیط کشت معدنی حداقل با منبع کربن بعنوان شاهد منفی استفاده شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت میزان آمولسیون کنندگی E[1] را با کمک فرمول محاسبه نمودیم. فرمول۱: ۱۰۰× طول کل محلول ÷ طول ستون امولسیون شده = E (۱۲).

ب) آزمون مقدار تجزیه شده هیدروکربن‌های نفتی: در ادامه آزمون امولسیون کنندگی لوله‌ها را در

1. Emulsification

انکوباتور معمولی به مدت یک ماه در دمای ۳۷ درجه قرار دادیم و تفاوت مقدار گازوئیل اولیه و باقی مانده را اندازه‌گیری نمودیم(۳).

ج) آزمون گسترش (پراکنش) نفت: ۱/۳ از حجم پلیت را از آب مقطر پر کرده سپس ۲ میلی‌لیتر نفت خام به مرکز پلیت اضافه می‌کنیم پس از به تعادل رسیدن نفت در سطح ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری مورد نظر را روی آن گذاشته تا ناحیه شفاف در لایه نفت بررسی شود. اگر قطر لایه شفاف شده توسط سوسپانسیون ۱۰ میلی‌متر باشد با علامت (+) ، اگر بین ۱۰ تا ۲۰ میلی‌متر (++) و اگر بیش از ۲۰ میلی‌متر باشد با (+++) نشان داده می‌شود(۳).

د) آزمون انهدام قطره: ابتدا جدایه ها در محیط کشت مایع تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند. پس از رشد جدایه ها ، ۱۰ میکرولیتر نفت خام بر روی صفحه شیشه ای قرار داده شد و سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکربی به آرامی به آن اضافه شد. پس از گذشت یک دقیقه شکل قطره ایجاد شده در سطح شیشه بررسی گردید. از آب مقطر بعنوان شاهد استفاده گردید. در صورت تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری، قطره به حالت مسطح و در غیر این صورت قطره کاملاً کروی دیده خواهد شد. نتیجه این آزمون با چشم غیر مسلح بررسی می‌شود. به صورت یک مثبت (قطره کمی متمایل)، دو مثبت (قطره خیلی متمایل) و سه مثبت (قطره کاملاً پهن) گزارش می‌گردد. در روش فروپاشی نفت، قطره‌ای که حاوی بیوسورفکتانت می‌باشد در سطح نفت منهدم و پخش می‌گردد (۳ و ۱۳).

هـ) کشت باکتری‌ها در محیط کشت Bushnell-Haas: این محیط کشت از پیش ساخته نبوده و با استفاده از دستورالعمل بوشنل هاس براث آن را می‌سازیم. گازوئیل را توسط فیلتر استریل و به محیط کشت اضافه نموده بعد در انکوباتور شیکردار روی ۱۸۰rpm[1] به مدت ۷۲ ساعت قرار داده این زمان را مجدداً تمدید می‌کنیم (۳).

ن) تخلیص بیوسورفکتانت: بعد از ۳۰ روز کشت باکتری در محیط بوشنل‌هاس براث حاوی ۶ میلی‌لیتر گازوئیل محیط کشت را در لوله‌های سانتریفیوژ ریخته و طبق روش Mostafapour Rami و همکاران ۲۰۱۵، سایر مراحل را انجام می دهیم. در انتها ماده به جای مانده از تبخیر، بیوسورفکتانت می‌باشد (۱۴).

و) روش‌های تعیین هویت باکتری تولید کننده بیوسورفکتانت: آزمون‌های شناسایی همچون رنگ آمیزی گرم، رنگ آمیزی اسپور، اکسیداز، کاتالاز، تحمل محیط کشت ۶/۵ درصد نمک، MR[2]، ذوب ژلاتین، محیط کشت سه قندی آهن دار TSI[3]، SIM[4]، سیترات و... برای تعیین هویت باکتری انتخاب گردید و انجام شد.

ز) آزمون ملکولی 16s rRNA: استخراج DNA **طبق** پروتکل **کیت** سینا ژن با اندک تغییر انجام شد. PCR جهت تایید حضور امپلیکون ۲۸۵ bp در حجم ۲۵ µl با پرایمر رفت F: 5´-CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG-3´ و پرایمر برگشت R: 5´- TAC CAG GGT ATC TAA TCC -3´ انجام شد (۱۵).

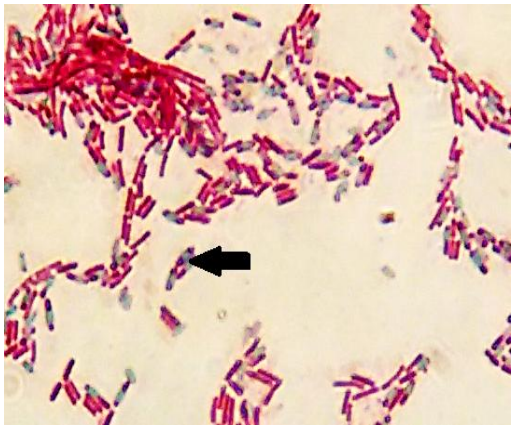
یافته ها و بحث

بعد از ۴۸ ساعت کشت باکتری‌های حاصل از رقت سازی بر روی نوترینت آگار با توجه به رنگ، قوام، حاشیه و شکل کلنی ۲۷ نوع کلنی مشاهده گردید. در این میان ۴ کلنی توانستند در محیط بلاد آگار ایجاد همولیز نمایند. باکتری شماره ۳ بیش‌ترین قدرت

1. Revolutions Per Minute
2. Methyl Red
3. Triple Sugar Iron Agar
4. Sulfid Indol Motility medium

امولسیون کنندگی (معادل ۵۵٪) را براساس فرمول یک داشت. با توجه به حذف ۰/۲ میلی‌لیتر گازوئیل بعد از گذشت یک ماه تنها در آزمون باکتری شماره ۳، این باکتری به عنوان باکتری مورد نظر جهت تولید بیوسورفکتانت انتخاب گردید.

بعد از گذشت ۱۰ دقیقه سوسپانسیون حاوی باکتری شماره ۳ با استفاده از بیوسورفکتانت لایه نفت خام را حدود ۱۲ میلی‌متر شفاف کرد که نتیجه آن به صورت (++) نشان داده شد. در آزمون انهدام قطره سوسپانسیون، باکتری شماره ۳ توانست قطره نفت خام را پخش کند. نتیجه آن برای باکتری مذکور به صورت (++) ثبت گردید. از باکتری شماره ۳ جهت تولید و جداسازی بیوسورفکتانت استفاده گردید. کلنی باکتری بر روی نوترینت آگار ضخیم، حاشیه لبه دار، مات، کرم تا قهوه‌ای رنگ بود.



شکل ۱- اسپور باکتری شماره ۳ سبز رنگ دیده می شود

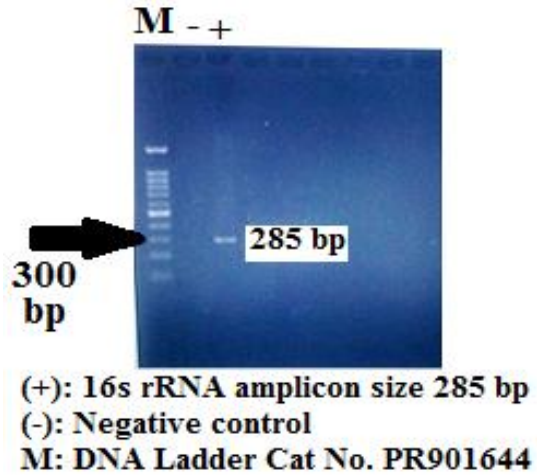
تخلیص بیوسورفکتانت و تعیین هویت باکتری

ماده جداسازی شده حاصل از تخلیص بیوسورفکتانت قهوه‌ای رنگ با قوام چرب بوده و باکتری مولد آن در رنگ آمیزی گرم به صورت باسیل‌های درشت گرم مثبت دیده شد. در رنگ آمیزی اسپور، اسپور بزرگ در مرکز باکتری بدون برجستگی مشاهده گردید (شکل ۱ و ۲).

شکل ۲- بیوسورفکتانت استخراج شده

نتیجه الکتروفورز و تعیین توالی محصول

PCR: در شکل ۵ نتیجه ژل الکتروفورز محصول PCRبرای شناسایی باکتری باسیلوس سوبتلیس با استفاده از ژن *16 srRNA*مشاهده می‌شود. برای اطمینان بیشتر از شناسایی باکتری مورد نظر، نمونه تعیین توالی مشخص گردید باکتری مورد نظر ۹۷ درصد با جنس و گونه باسیلوس سوبتیلیس از نظر توالی ژن *16 srRNA* شباهت ژنتیکی دارد.



شکل ۳- امپلیکون *16 srRNA* باسیلوس سوبتلیس به اندازه ۲۸۵ bp بر روی ژل آگارز

اگر چه امکان وجود باکتری با توان تجزیه کنندگی بالا در آب‌ها و خاک‌های بدون سابقه آلودگی قبلی با ترکیبات نفتی وجود دارد ولی در اکثر پژوهش‌های مشابه به آب، خاک و مناطق آلوده به نفت توجه می‌شود زیرا امکان یافتن میکروارگانیسمی با توان تجزیه کنندگی بالا در این مناطق بیشتر از مناطق غیر آلوده به ترکیبات نفتی می‌باشد (۱۴). لذا در تحقیق حاضر نمونه برداری از خاک آلوده به انواع هیدروکربن‌های نفتی صورت گرفت چرا که شرایط رشد و فاکتورهای مورد نیاز این گونه باکتری‌ها در چنین محیط‌هایی فراهم می‌باشد. Aitken و همکاران ۱۹۹۸، از مکان‌های آلوده به نفت و گازوئیل، ۱۱ جنس از باکتری‌های تجزیه کننده برخی از ترکیبات هیدروکربنی را جداسازی نمودند. مهم‌ترین باکتری‌های جدا شده در پژوهش یاد شده سودوموناس، آگروباکتریوم، باسیلوس و اسفنگوموناس بودند (۱۶). در تحقیق حاضر ۲۷ نوع باکتری متفاوت از خاک جدا گردید که در این بین فقط باکتری شماره ۳ توانایی بالایی در تولید بیوسورفکتانت داشت. Onifade و Abubakar ۲۰۰۷، مطالعاتی در زمینه ویژگی‌های میکروارگانیسم‌های جدا شده از خاک‌های آلوده به نفت خام با قابلیت تجزیه کنندگی هیدروکربن انجام دادند و توانستند پنج گونه باکتری جداسازی و شناسایی نمایند. آن‌ها برای جداسازی از محیط حداقل استفاده نموده و از نفت خام به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده نمودند (۱۷). در تحقیق حاضر نیز از گازوئیل به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده شد.

Youssef و همکاران ۲۰۰۴، فعالیت همولیتیکی ۲۰۵ ایزوله باکتریایی را به همراه بررسی فعالیت سطحی این ایزوله‌ها با روش‌های فروپاشی قطره و پراکنده کردن نفت، مطالعه کردند. آن‌ها نتایج هر یک از این روش‌ها را با اندازه‌گیری مقدار کاهش کشش سطحی سورفکتانت تولیدی توسط هر یک از این ایزوله‌ها مقایسه کرده و نشان دادند که روش‌های فروپاشی قطره و پراکندگی نفت با توانایی ایزوله‌ها برای کاهش کشش سطحی ارتباط دارد (۱۱). Sabnis و Juvale ۲۰۱۶، فعالیت همولیتیک باکتری را به عنوان اولین شاهد کیفی برای تولید بیوسورفکتانت در نظر گرفتند (۱۳). آزمون ساده‌ای که در تحقیق حاضر از میان باکتری‌های جداسازی شده تنها ۴ کلنی مختلف توانایی ایجاد همولیز خون در محیط بلاد آگار را داشتند و در میان آنها نیز با کمک سایر آزمون‌های تعیین کننده سنتز بیوسورفکتانت مشخص گردید که فقط باکتری شماره ۳ توانایی تولید بیوسورفکتانت را دارا می‌باشد. Goli و همکاران 2015، در تحقیقی به بررسی تجزیه زیستی نفت خام پرداختند و مشاهده کردند که نفت تلقیح شده به محیط به تدریج شروع به تجزیه می نماید. ۲۸ ساعت بعد از کشت، ذرات نفت کاملاً امولسیونه شده و حالت دو فازی نفت خام در محیط از بین رفت. کریستوز و همکاران اعتقاد داشتند که تجزیه ترکیبات نفتی در باکتری‌ها به واسطه وجود یک ژن با نام *alkj*امکان پذیر می‌گردد (۱۸).

Onifade و Abubakar۲۰۰۷، موفق به جداسازی دو گونه باکتری به نام‌های *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas aeruginosa* و قارچ *Penicillium funiculosum* از آب آلوده به روغن دیزل شدند. نتایج مطالعات آن‌ها نشان داد که قارچ جداسازی شده بیشتر از سایرین در عمل زیست پالایی روغن دیزل موثراست (۱۷). گازوئیل به فراوانی یافت می‌شود و درپی آن آلودگی‌های ناشی از نشت آن نیز در محیط زیاد است. با توجه به تحقیق فوق که ثابت نمود ایزوله شماره ۳ توانایی تجزیه گازوئیل را دارد، در مواقع نشت این سوخت در مکان هایی هم چون دریا و خشکی می‌توان از این باکتری در جهت حذف آلودگی بهره برد. با استفاده از روشهای مختلف مشخص شد باکتری مورد نظر مربوط به جنس و گونه باسیلوس سوبتیلیس می‌باشد. تحقیقات صورت گرفته توسط محققان نشان دهنده تولید انواع مختلف بیوسورفکتانت از جمله

سورفکتین، لیپوپروتئین و ... توسط این باکتری می‌باشد. تحقیق حاضر حجم بالایی از تولید بیوسورفکتانت توسط باسیلوس سوبتیلیس را نشان داد. با توجه به اینکه باسیلوس سوبتیلیس اسپوردار است و زندگی در شرایط سخت محیطی را به خوبی تحمل می‌کند، برای تولید بیوسورفکتانت در چاه‌های نفت نسبت به دیگر باکتری‌های تولید کننده بیوسورفکتانت کار آمدتر می‌باشد. همچنین یکی از انواع بیوسورفکتانت به نام سورفکتین که توسط این باکتری تولید می‌شود کاربرد گسترده‌ای در بخش پزشکی دارد که می‌توان در صورت بهره گیری از آن نیازهای کشور در این بخش را نیز بر طرف ساخت.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از پرسنل محترم آزمایشگاه تحقیقاتی بیولوژی سلولی ملکولی و میکروبیولوژی دانشگاه آزاد واحد بروجرد به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال تشکر و قدردانی را دارند. این مطالعه حاصل بخشی از نتایج داده های پایان نامه آقای مرتضی چلویی دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد واحد بروجرد می باشد.

منابع و مآخذ

1. Mohd-Setapara SH, Mohamad-Aziza SN, Haruna NH. and Mohd-Azizia CY. Review on the Extraction of Biomolecules by Biosurfactant Reverse Micelles. APCBEE Procedia. 2012; 3: 78– 83.
2. Sarafin Y, Donio MBS, Velmurugan S, Michaelbabu M. and Citarasu T. Kocuria marina BS-15 a biosurfactant producing halophilic bacteria isolated from solar salt works in India. Saudi J Biol Sci. 2014; 21(6): 511–519.
3. Adeli M, Hassanshahian M. and Kariminik A. Isolation, identification and characterization of biosurfactant producing Shewanella species from the Persian Gulf. J Microb World. 2013; 6(1): 53-61. [In Persian]
4. Kapadia Sanket G. and Yagnik B. Current trend and potential for microbial biosurfactants. Asian J Exp Boil. 2013; 4(1): 1-8.
5. Maneerat S. Production of biosurfactants using substrates from renewable resources. J Sci Technol. 2005; 27(3): 675-683.
6. Gudina EJ, Fernandes EC, Rodrigues AI, Teixeira JA. and Rodrigues LR. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. Front Microbiol. 2015; 6(59): 1-7.
7. Bhardwaj G, Cameotra SS. and Chopra HK. Utilization of oleo-chemical industry by-products for biosurfactant production. AMB Express. 2013; 3(1): 1-5.
8. Pattanathu Rahman KSM. and Gakpe E. Production, characterization and applications of biosurfactants-review. Biotech. 2008;7(2):1-17.
9. Donio MBS, Ronica SFA, Thanga VV, Velmurugan S, Adlin JJ, Michaelbabu M. and Citarasu T. Isolation and characterization of halophilic Bacillus sp. BS3 able to produce pharmacologically important biosurfactants. Asian Pac J Trop Med. 2013; 6(11): 876-883.
10. Erum S, Ahmed N, Akhter J, Badar U, Siddiqui K, Ansari F. et al. Screening and characterization of biosurfactant-producing bacteria isolated from the Arabian Sea coast of Karachi. Turk J Biol. 2015; 39: 210-216.
11. Youssef NH, Duncan KED, Nagle DP, Savage KN, Knapp RM. and Mcinerney MJ. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. J Microbiol meth. 2015; 160(3): 249-255.
12. Varnaseri Ghandali M, Moezi A. and Enayatizamir N. The survey of biosurfactant production by *Bacillus laterosporus* in various carbon sources. J Microbiol World. 2015; 7(4): 308-320.
13. Sabnis S. and Juvale V. Enrichment and isolation of biosurfactant producers from marine environment. Int J Curr Microbiol App Sci. 2016; 5(4): 730-740.
14. Mostafapour Rami MJ, Ahmady-Abchin S. and Safari M. Isolation and identification of biosurfactant-producing strains from the genus Acinetobacter spp and antibacterial effects of biosurfactant produced on some of the negative and gram-positive bacteria *In vitro*. New Cell Mol Biotech J. 2015; 4(14): 79-91. [In Persian]
15. Mansouri AD. 2015. Study of iron uptake encoding genes and drug resistant patterns among uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection in Ilam province, Iran. MSc. Faculty of Sciences. Islamic Azad University of borujerd.
16. Aitken MD, Stringfellow WT, Nagel RD, Kazunga C. and Chen SH. Characteristics of Phenanthrene-degrading bacteria isolated from soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. Can J Microbiol. 1998; 44(8): 743-752.
17. Onifade AK. Abubakar FA. Characterization of hydrocarbon-degrading microorganisms isolation from

crude oil contaminated soil and remediation of the soil by enhanced natural attenuation. Res J Biolog Sci. 2007; 2(1): 36-40.

18. Goli A, Zareei M. and tallaie AR. Producing biosurfactants using purified microorganisms isolated from soils contaminated with diesel fuel. J Toloo-e-behdasht. 2015;13(6): 35-45. [In Persian]