

استفاده از بیوسورفکتانت در پاکسازی کود آلی از فلزات سنگین

حنیف خداوردی^۲
سید حمید زرکش^۶

ایرج نحوی^۲
حسین قنوازی^۵

غزاله جهانشاه^۱
مرتضی بارانی^۴

(دریافت ۸۹/۴/۴ آخرین اصلاحات دریافتی ۹۰/۵/۳۰ پذیرش ۹۰/۶/۴)

چکیده

بیوسورفکتانت‌ها قادر به تشکیل کمپلکس با فلزات سنگین مانند سرب، نیکل، کادمیم و نهایتاً پاکسازی آنها از خاک هستند. در این پژوهش، یک سویه باکتری تولید کننده بیوسورفکتانت جدا شده از نمونه کود آلی کارخانه کمپوست اصفهان (جنس باسیلوس) و *Sudomonas auruginosa* ATCC3027 به منظور تولید بیوسورفکتانت جداگانه در آب پنیر کشت داده شدند. مایع رویی سوسپانسیون‌های میکربی برای شستشوی فلزات سنگین نمونه کود آلی کارخانه کمپوست استفاده شد. میزان کل فلزات سنگین سرب، نیکل، کروم، کادمیم، روی، مس و منگنز قبل و بعد از تیمار توسط دستگاه اسپکتروفتومتر جذب اتمی اندازه‌گیری شد. در نهایت مشاهده گردید متوسط میزان فلزات سنگین موجود در نمونه بعد از تیمار با مایع رویی *Sudomonas auruginosa* ATCC3027 برای سرب، نیکل، کروم، کادمیم، مس، روی و منگنز به ترتیب ۵۲، ۴۹، ۶۰، ۳۳، ۳۲، ۲۵ و ۲۲ درصد کاهش داشت. این کاهش در مورد نمونه تیمار شده با مایع رویی سویه باسیلوس برای عناصر مذکور به ترتیب ۴۵، ۳۹، ۴۲، ۳۳، ۴۰، ۴۱ و ۲۹ درصد است که نشان دهنده توانایی بیوسورفکتانت در جذب فلزات از ماتریکس کود است.

واژه‌های کلیدی: بیوسورفکتانت، کمپوست، فلزات سنگین، آب پنیر

Feasibility of Heavy Metals Removal from Compost by Biosurfactant

Ghazaleh Jahanshah¹
Morteza Barani⁴

Iraj Nahvi²
Hossein Ghanavati⁵

Hanif Khodaverdee³
Seyed Hamid Zarkesh⁶

(Received June 24, 2010 Revised Aug. 21, 2011 Accepted Aug. 26, 2011)

Abstract

Biosurfactants have the ability to form heavy metal complexes and clean up heavy metal contaminated soils. In this work, a biosurfactant producing bacterium (*Bacillus* spp.) isolated from compost and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC3027 were cultured in whey in order to produce biosurfactant. Compost samples were leached by supernatant of mentioned strains. Total amount of Pb, Ni, Cr, Cd, Zn, Cu and Mn in samples were measured before and after treatment was measured. It was revealed that supernatant of *P. aeruginosa* ATCC 3027 removed 52, 49, 60, 33, 25, 32 and 22% of Pb, Ni, Cr, Cd, Zn, Cu and Mn respectively. Heavy metal removal by supernatant of strain B was 45, 39, 42, 33, 40, 41 and 29% for above mentioned metals; respectively. These results indicate the potential of the biosurfactants as leaching agents for heavy metal removal from compost.

Keywords: Biosurfactant, Compost, Heavy Metal, Whey Supernatant.

1. Ph.D. Student of Pharmaceutical Biology, University of Tuebingen, Germany (Corresponding Author) qazaljahan@gmail.com

2. Prof. of Biotechnology, Faculty of Biology, Isfahan University, Isfahan

3. M.Sc. of Microbiology, Isfahan University, Isfahan

4. B.S. of Chemistry, Composting Plant in Isfahan

5. Ph.D. Student of Microbiology, Isfahan University, Isfahan

6. Assoc. Prof. of Biology, Isfahan University, Isfahan

۱- دانشجوی دکتری زیست‌شناسی دارویی، دانشگاه توینگن آلمان (نویسنده مسئول) qazaljahan@gmail.com

۲- استاد بیوتکنولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اصفهان

۳- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان

۴- کارشناس شیمی، کارخانه کمپوست اصفهان

۵- دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان

۶- دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اصفهان

بیوسورفکتانت‌ها عوامل فعال در سطح هستند که توسط میکروارگانیسم‌ها، گیاهان، حیوانات و انسان تولید می‌شوند. این مولکول‌ها دوگانه‌دوست^۱ بوده و از دو بخش آبدوست^۲ و آبگریز^۳ (که غالباً هیدروکربنی است) تشکیل شده‌اند [۱].

میکروارگانیسم‌های مختلفی قادر به تولید بیوسورفکتانت هستند. شاخص‌ترین باکتری‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت عبارت‌اند از سودوموناس آئروجینوزا^۴، کورینه باکتریوم^۵، نوکاردیا^۶، رودوکوکوس^۷، باسیلوس ساتیلیس^۸، باسیلوس لیکنی فرمیس^۹ و آرتروباکتر^{۱۰} و از قارچ‌ها می‌توان به تورولوپسیس^{۱۱} و کاندیدا^{۱۲} اشاره کرد [۲].

علی‌رغم برتری‌های بیوسورفکتانت‌ها بر سورفکتانت‌ها از لحاظ تجزیه پذیری بیشتر، پایداری در مقابل تغییرات شدید دما، شوری، pH و سمیت کمتر، در حال حاضر تولید آنها در مقیاس با انواع شیمیایی از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نیست [۳]. با توجه به کاربرد روز افزون بیوسورفکتانت‌ها در صنایع مختلف و با در نظر گرفتن هزینه‌های بالای تولید این ترکیبات، به تدابیری برای کاهش هزینه‌های تولید و افزایش کارایی و عملکرد آنها نیاز است. به‌منظور کاستن هزینه‌های تولید، راهکارهایی مانند افزایش راندمان تولید محصول، توسعه فرایندهای اقتصادی و استفاده از منابع ارزان قیمت برای رشد میکروارگانیسم‌ها و تولید بیوسورفکتانت، پیشنهاد می‌شود [۴].

خاک‌ها به‌دلیل بار منفی ناشی از حضور مواد آلی و رس، تمایل زیادی برای اتصال به یون‌های مثبت از جمله فلزات از خود نشان می‌دهند [۵]. تشکیل کمپلکس‌های فلزی با لیگاندها و مواد آلی و معدنی موجود در خاک، دسترسی میکروارگانیسم‌ها به فلزات را تحت تأثیر قرار می‌دهد. سورفکتانت‌ها به چند روش، قادر به تشکیل کمپلکس با فلزات سنگین مانند سرب، نیکل، کادمیم و نهایتاً پاکسازی آنها از خاک هستند: بیوسورفکتانت‌های آنیونی با دارا بودن بار منفی با یون‌های فلزی با بار مثبت کمپلکس می‌دهند، با حذف کمپلکس سورفکتانت-فلز از ماتریکس خاک، می‌توان خاک را پاکسازی نمود. بیوسورفکتانت‌های کاتیونی به سطوح با بار

منفی (عمدتاً مواد آلی و رس) در خاک متصل شده و به طریق رقابتی از چسبیدن یون‌های فلزی به ذرات خاک ممانعت می‌نمایند. فلزات در حالت آزاد عنصری (غیر یونی) نیز با سورفکتانت کمپلکس داده و منجر به کاهش سمیت آنها می‌شوند.

علاوه بر این، سورفکتانت‌ها تجزیه مواد و آلاینده‌های آلی را نیز از طریق افزایش قابلیت انحلال آنها سرعت می‌بخشند [۴ و ۶]. جذب و جداسازی فلزات و هیدروکربن‌های نامحلول توسط بیوسورفکتانت‌ها از طریق تجمع بیوسورفکتانت به‌صورت لایه یا لایه‌هایی در سطح خاک، پاکسازی فلز از طریق کاهش کشش بین سطحی و جذب الکترواستاتیکی و در نهایت قرارگیری فلز در ساختمان میسل صورت می‌گیرد. به هر حال هیدروکسیدها، اکسیدها و مواد آلی موجود در خاک بر میزان جذب فلزات توسط بیوسورفکتانت‌ها مؤثراند و سبب بروز مشکلاتی در این فرایند می‌شوند [۲].

تن و همکاران^{۱۳} در سال ۱۹۹۴ در پژوهشی نشان دادند منورامنولپید سودوموناس آئروجینوزا ATCC 9027 با فلزات سنگین کمپلکس‌های پایداری تشکیل می‌دهد. این کمپلکس‌ها وارد فاز آبی شده و پس از فرایندهای شستشو از خاک حذف می‌شوند [۷]. تحقیقات مشابهی توسط مولیگان^{۱۴} و یانگ^{۱۵} در سال ۱۹۹۷ بر روی جذب فلزات سرب، روی و مس توسط سورفکتین^{۱۶} و رامنولپید صورت گرفته است. به‌دلیل خصوصیت کف‌زایی رامنولپید، کمپلکس‌های فلز-بیوسورفکتانت با هوادهی‌های شدید و ایجاد کف در محیط قابل تفکیک‌اند و با کاهش pH تا ۲ می‌توان بیوسورفکتانت را بازیافت نمود.

کنترل غلظت فلزات سنگین به‌دلیل داشتن خواص سمی برای میکروارگانیسم‌ها و در نتیجه اثر بر سرعت انجام فرایند تولید کمپوست از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. از طرفی فلزات به‌دلیل قابلیت تجمع‌پذیری^{۱۷} در زنجیره‌های غذایی، برای انسان و موجودات دیگر مضر هستند. لذا با توجه به توانایی بیوسورفکتانت در جذب فلزات سنگین از ماتریکس کود، در این پژوهش از بیوسورفکتانت به‌منظور پاکسازی کودآلی از فلزات سنگین استفاده شد.

۲- مواد و روشها

یک سویه باکتری تولیدکننده بیوسورفکتانت، (جنس باسیلوس) که از نمونه کمپوست کارخانه کود آلی اصفهان جداسازی و شناسایی شد و سودوموناس آئروجینوزا ATCC3027 به‌منظور بررسی امکان

¹³ Tan et al.

¹⁴ Mulligan

¹⁵ Yong

¹⁶ Surfactin

¹⁷ Accumulation

¹ Amphipathic

² Hydrophilic

³ Hydrophobic

⁴ Pseudomonas aeruginosa

⁵ Korine Bacterium

⁶ Nocardia

⁷ Rodococcus

⁸ Bacillus subtilis

⁹ Bacillus licheniformis

¹⁰ Arthrobacter

¹¹ Torulopsis spp.

¹² Candida spp.

پاکسازی کود آلی از فلزات سنگین انتخاب شد [۸ و ۹]. هر سوپه به میزان 1×10^6 CFU/ml جداگانه در یک لیتر محیط کشت آب پنیر تلقیح و در ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت و ۱۵۰ دور در دقیقه انکوبه شدند [۴]. محیط کشت حاوی ۷۰ گرم پودر آب پنیر خریداری شده از شرکت پگاه اصفهان در یک لیتر آب مقطر و پروتئین زدایی شده توسط حرارت در ۱۲۱ درجه سلسیوس و زمان ۱۵ دقیقه در اتوکلاو بود. تولید بیوسورفکتانت در مایع رویی محیط کشت به روش تنسیومتری توسط دستگاه تنسیومتر^۱ تأیید شد [۱۰]. سپس سوسپانسیون میکروبی در ۴ درجه سلسیوس و ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی محیط کشت که حاوی بیوسورفکتانت بود، جدا شد و pH آن در ۸ تنظیم شد [۱۱].

۲-۱- طرح آزمایش و اندازه‌گیری عناصر

۵ گرم نمونه کمپوست حاوی مقادیر بالای فلزات سنگین سرب، نیکل، کروم، کادمیم، مس، روی و منگنز (با سه تکرار)، در ارلن توزین شد و ۵۰ میلی‌لیتر مایع رویی محیط کشت باکتری تهیه شده به روش مذکور، به آن افزوده شد. ارلن‌ها به مدت ۱۶ ساعت در محیط آزمایشگاه روی شیکر با ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. پس از این مدت، سوسپانسیون مذکور توسط کیف بوختر صاف گردید. به نمونه کمپوست روی کیف مجدداً ۵۰ میلی‌لیتر مایع رویی محیط کشت برای شستشوی عناصر باقیمانده اضافه شد. مراحل مذکور توسط آب مقطر نیز به جای مایع رویی محیط کشت و به‌عنوان شاهد انجام شد [۱۲ و ۱۳]. سپس نمونه کمپوست روی کاغذ صافی در ۳۶ درجه سلسیوس خشک شده و برای سنجش میزان فلزات سنگین به روش TMECC، به وسیله اسید هضم شد. به این ترتیب که ابتدا ۵/۰ گرم نمونه کود آلی با سه تکرار در لوله‌های هضم ریخته شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر اسید نیتریک (۱:۱) به نمونه‌ها افزوده و به‌خوبی مخلوط شد. لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس روی بلوک هضم قرار داده شدند. ۵

^۱ Krüss, Easy Dyne K20

میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ به نمونه‌ها افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس حرارت داده شد. پس از این مدت، ۳ میلی‌لیتر اسید هیدروکلریک غلیظ به نمونه اضافه شده، به مدت یک ساعت یا بیشتر حرارت دهی شد، تا زمانی که حجم نمونه به ۱۰ میلی‌لیتر کاهش یافت. بعد از اینکه بلوک هضم تا دمای نزدیک به ۸۰ درجه سلسیوس سرد شد، ۳ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۳۰ درصد، به آرامی به نمونه‌ها افزوده و حرارت داده شد تا کف ایجاد شده فرو نشیند. سپس ۱۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه به نمونه‌ها اضافه شده و در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه حرارت داده شد [۱۳]. پس از سرد شدن، نمونه‌ها توسط کاغذ صافی S&S شماره ۵۸۹ صاف شده و حجم نهایی در بالن حجمی، توسط آب دیونیزه، به ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از هضم به وسیله اسید نیتریک، میزان فلزات سنگین سرب، نیکل، کروم، کادمیم، مس، روی و منگنز موجود در فاز مایع رویی و آب مقطر و نیز میزان فلزات سنگین کل نمونه بعد از شستشو با مایع رویی محیط کشت باکتری و آب مقطر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر جذب اتمی فیلپس مدل PU910 خوانده شد و با میزان فلزات سنگین کل نمونه قبل از تیمار مقایسه شد.

۳- نتایج و بحث

کشش سطحی محیط کشت آب پنیر پیش از تلقیح باکتری 57 mN/m و پس از رشد و تولید بیوسورفکتانت توسط سوپه باسیلوس و سودوموناس آئروجینوزا ATCC3027 به ترتیب $37/62 \text{ mN/m}$ و 35 mN/m اندازه‌گیری شد. متوسط میزان کل فلزات سنگین نمونه قبل و بعد از تیمار با مایع رویی محیط کشت حاوی بیوسورفکتانت در pH برابر ۸ و نیز آب مقطر در جدولهای ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است.

همان‌طور که در جدولهای ۱ و ۲ ملاحظه می‌شود، متوسط میزان کل فلزات سنگین در نمونه بعد از تیمار با مایع رویی نسبت به میزان کل فلزات سنگین نمونه قبل از تیمار کاهش محسوسی نشان می‌دهد. این کاهش در مورد آب مقطر همان‌طور که جدول ۳ نشان می‌دهد، بسیار ناچیز است.

جدول ۱- متوسط میزان فلزات سنگین موجود در کمپوست تیمار شده با مایع رویی محیط کشت سودوموناس آئروجینوزا ATCC3027

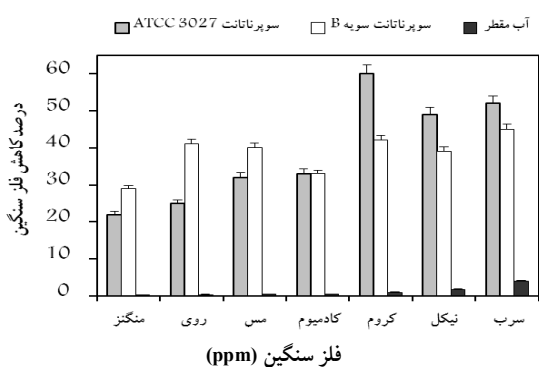
غلظت فلزات سنگین (ppm)	باقیمانده در کود	حذف شده (استخراج شده)	فلز سنگین
			قبل از تیمار
			سرب
	۴۱۷	۴۴۷	۸۶۹
	۲۱	۲۱	۴۳
	۵	۷	۱۳
	۲	۱	۳
	۴۶۶	۲۱۹	۶۸۶
	۲۷۰	۸۸	۳۶۰
	۱۴۰	۳۶	۱۸۰

جدول ۲- متوسط میزان فلزات سنگین موجود در کمپوست تیمار شده با مایع رویی محیط کشت سویه باسیلوس

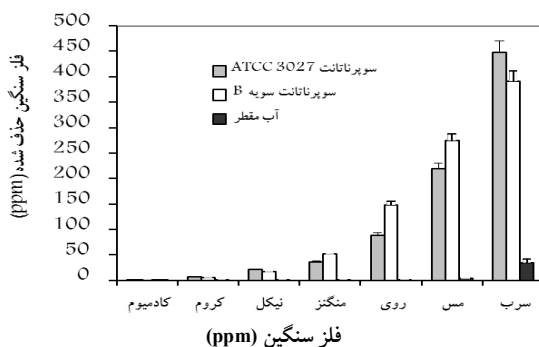
فلز سنگین	غلظت فلزات سنگین (ppm)		
	قبل از تیمار	باقیمانده در کود	حذف شده (استخراج شده)
سرب	۸۶۹	۴۷۷	۳۹۱
نیکل	۴۳	۲۶	۱۶
کروم	۱۳	۷	۵
کادمیم	۳	۲	۱
مس	۶۸۶	۴۱۱	۲۷۴
روی	۳۶۰	۲۱۲	۱۴۷
منگنز	۱۸۰	۱۲۷	۵۱

جدول ۳- متوسط میزان فلزات سنگین موجود در کمپوست تیمار شده با آب مقطر

فلز سنگین	غلظت فلزات سنگین (ppm)		
	قبل از تیمار	باقیمانده در کود	حذف شده (استخراج شده)
سرب	۸۶۹	۸۳۴	۳۵
نیکل	۴۳	۴۲	۱
کروم	۱۳	۱۲	۱
کادمیم	۳	۳	۰
مس	۶۸۶	۶۸۲	۳
روی	۳۶۰	۳۵۸	۱
منگنز	۱۸۰	۱۷۹	۱



شکل ۱- مقایسه درصد کاهش فلزات سنگین بعد از تیمارهای مختلف



شکل ۲- مقایسه میزان فلزات سنگین حذف شده بعد از تیمارهای مختلف

درصد کاهش فلزات سنگین بعد از تیمار با مایع رویی سویه باسیلوس، سودوموناس آئروجینوزا ATCC3027 و آب مقطر در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است.

از آنجا که مواد آلی و هوموس موجود در کود، بار منفی زیادی دارند، فلزات سنگین دارای بار مثبت با اتصالات قوی به ماتریکس کود متصل می‌شوند. مواد آلی، رس و اکسیدهای فلزی کارایی بیوسورفکتانت را در حذف فلزات سنگین تحت تأثیر قرار می‌دهند.

جدول ۱ نشان می‌دهد در نمونه تیمار شده با مایع رویی سودوموناس آئروجینوزا ATCC3027 متوسط میزان فلزات سنگین کاهش محسوسی یافته است که نشان‌دهنده توانایی بیوسورفکتانت موجود در مایع رویی این سویه در اتصال و جذب فلزات از ماتریکس کود آلی است. برای مثال مقدار فلز سرب از ۸۶۹ ppm به ۴۷۷ ppm کاهش یافته است. جدول ۲ نیز نشان می‌دهد مایع رویی سویه باسیلوس قادر به پاکسازی و استخراج فلزات سنگین از کود آلی بوده است. از مقایسه دو جدول ۱ و ۲ می‌توان دریافت که تمایل بیوسورفکتانت‌های دو سویه باکتری برای فلزات مختلف متفاوت است. برای مثال تمایل بیوسورفکتانت موجود در مایع رویی سودوموناس آئروجینوزا ATCC3027، برای اتصال و حذف فلز کروم ۱/۴۲ برابر تمایل بیوسورفکتانت موجود در مایع رویی سویه باسیلوس است. در حالی که تمایل بیوسورفکتانت موجود در مایع رویی سویه باسیلوس برای فلز روی

محلول نیم درصد رامنولیبید قادر است ۷۳/۲ درصد کادمیم و ۶۸/۱ درصد نیکل را از ماتریکس خاک پاک نماید [۳]. تحقیقات مشابهی نیز توسط جاوارکار و همکاران^۲ در سال ۲۰۰۸ و کیم^۳ و ویپولانادان^۴ در سال ۲۰۰۶ در این زمینه انجام شده است که با نتایج به دست آمده در این تحقیق همخوانی دارد [۱۴ و ۱۵].

۴- نتیجه گیری

کاهش میزان فلزات سنگین در نمونه های تیمار شده با مایع رویی سویه های باسیلوس و سودوموناس آئروجنینوزا ATCC3027 در مقایسه با آب مقطر، نشان دهنده امکان پاکسازی کود آلی از فلزات سنگین توسط مایع رویی حاوی بیوسورفکتانت سویه های مذکور است. به طور کلی تحقیقات نشان می دهند که بیوسورفکتانت تولید شده توسط میکروارگانسیم های بومی کمپوست، به دلیل سازگاری این میکروارگانسیم ها با محیط کمپوست نسبت به بیوسورفکتانتی که توسط سویه های غیر بومی تولید می شود، در بلوغ و بهبود کیفیت کمپوست نقش بیشتری دارد. اما در مورد حذف فلزات سنگین نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد که رابطه مستقیمی بین بیوسورفکتانت تولید شده توسط سویه بومی و حذف فلزات مشاهده نشده و حذف فلزات بیشتر بستگی به ماهیت بیوسورفکتانت تولید شده دارد. از آنجا که ماهیت بیوسورفکتانت های تولید شده توسط دو سویه باسیلوس و سودوموناس متفاوت است، فلزات با تمایل متفاوتی به آنها متصل شده و از ماتریکس کود جدا می شوند.

² Juwarkav et al.

³ Kim

⁴ Vipulanadan

بیشتر از بیوسورفکتانت موجود در مایع رویی سودوموناس آئروجنینوزا ATCC3027 است (۱/۶۴ برابر). بسته به نوع، بار یونی و غلظت بیوسورفکتانت، نوع و بار فلز، پایداری اتصال فلز به بیوسورفکتانت و نیز میزان حضور فلز در کود آلی، بیوسورفکتانت ها با میل ترکیبی متفاوتی به فلزات متصل می شوند. ماهیت متفاوت بیوسورفکتانت های تولید شده توسط دو سویه نامبرده سبب می شود فلزات با تمایل متفاوتی جذب آنها شده و از کود حذف شود. جدول ۳، نتایج تیمار کمپوست با آب مقطر، به عنوان شاهد را نشان می دهد. در این حالت کاهش فلزات سنگین به خوبی مشهود نیست.

همان طور که شکل ۱ نشان می دهد، کاهش میزان فلزات سنگین در نمونه تیمار شده با آب مقطر به ترتیب برای سرب، نیکل، کروم، کادمیم، مس، روی و منگنز ۰/۳۹ و ۰/۳۱ درصد است. متوسط میزان فلزات سنگین موجود در نمونه تیمار شده با مایع رویی سودوموناس آئروجنینوزا ATCC3027 به ترتیب برای سرب، نیکل، کروم، کادمیم، مس، روی و منگنز ۵۲، ۴۹، ۶۰، ۳۳، ۳۲، ۲۵ و ۲۲ درصد کاهش داشته است. این کاهش در مورد نمونه تیمار شده با مایع رویی باسیلوس برای عناصر مذکور به ترتیب ۴۵، ۳۹، ۴۲، ۳۳، ۴۰، ۴۱ و ۲۹ درصد است که نسبت به نتایج به دست آمده توسط آب مقطر قابل توجه است.

ونگ^۱ و مولیگان در سال ۲۰۰۴ در بررسی امکان استفاده از کف رامنولیبید در حذف کادمیم و نیکل از خاک آلوده، نشان دادند

¹ Wang

۵- مراجع

- 1- Banat, I.M., Makkar, R.S., and Cameotra, S.S. (2002). "Potential commercial applications of microbial surfactants." *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 495-508.
- 2- Mulligan, C. N. (2005). "Environmental applications for biosurfactants." *Environmental Pollution*, 133, 183-198.
- 3- Wang, S., and Mulligan, C. N. (2004). "Rhamnolipid foam enhanced remediation of cadmium and nickel contaminated soil." *Water Air Soil Pollution*, 157, 315-330.
- 4- Dubey, K., and Juwarka, A. (2001). "Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production." *World J. of Microbiology and Biotechnology*, 17, 61-69.
- 5- Kosaric, N. (2001). "Biosurfactants and their application for soil bioremediation." *Food Technol. Biotechnol.*, 39, 295-304.
- 6- Christofi, N., and Ivshina, I.B. (2002). "Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation." *J. of Applied Microbiology*, 93, 915-929.
- 7- Tan, H., Champion, J. T., Artiola, J. F., Brusseau, M. L., and Miller, R.M. (1994). "Complexation of cadmium by a rhamnolipid biosurfactant." *Environmental Science and Technology*, 28, 2402-2406.

- 8- Jahanshah, G., Nahvi, I., and Khodavedri, H. (2008). "Isolation and purification of biosurfactant producing bacteria and their application in composting." 3rd *National Congress of Recycling and Reuse of Renewable Organic Resources in Agriculture*, Islamic Azad University, Khorasgan Branch, Isfahan, 126-127. (In Persian)
- 9- Mokhtarian, N., Talaie, A.M., Jaafarzadeh, N., Talaie, M.R., and Beheshti, M. (2010). "Producing biosurfactants from Purified microorganisms obtained from oil-contaminated soil." *J. of Water and Wastewater*, 75, 20-27. (In Persian)
- 10- Youssef, N.H., Duncan, K.E., Nagle, D.P., Savage, K.N., Knapp, R.M., and Mc Inerney, M. J. (2004). "Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms." *J. of Microbiological Methods*, 56, 339-347.
- 11- Makkar, R.S., and Cameotra, S.S. (2002). "An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications." *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58, 428-434.
- 12- Mulligan, C. N., Yong, R. N., and Bernard Gibbs, B. F. (2001). "Heavy metal removal from sediments." *J. of Hazardous Materials*, 85, 111-125.
- 13- Thompson, W. H. (2001). *Test methods for the examination of composting and compost*, Prepared for the US Composting Council Research and Education. Foundation and the United States Department of Agriculture.
- 14- Juwarkar, A. A., Dubey, K. V., Anupa, N., and Singh, S. (2008). "Bioremediation of multi-metal contaminated soil using biosurfactant – a novel approach." *Indian J. of Microbiology*, 48, 142-146.
- 15- Kim, J., and Vipulanadan, C. (2006). "Removal of lead from contaminated water and clay soil using a biosurfactant." *J. of Environmental Engineering*, 132, 777-786.