ارزیابی نقش باسیلوسها در تولید بیو سورفاکتانت‌ها در مطالعه موردی و امکان سنجی استفاده از روش ازدیاد برداشت میکروبی در سازند آسماری در میدان نفتی بی بی حکیمه

عبا س اخوان سپهی *
گروه میکروبیولوژی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
راشل مصطفایی
گروه زمین شناسی نفت، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۰/۲۹ **تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۰/۱٦**

چکیده

مقدمه: باتوجه به قدمت تولید چاه های نفتی در سال های اخیر مخازن نفتی دچار افت شدید فشار شده اند به همین منظور در این پژوهش باتوجه به شرایط ساختمانی، پارامترهای مخزنی، موقعیت زمین شناسی، مشخصات بیولوژیکی مخزن و... مطالعه موردی بر روی میدان بی بی حکیمه صورت گرفت.

هدف: از انجام این پژوهش بررسی و معرفی بهترین سویه، شرایط بهینه رشد و تولید بیوسورفاکتانت در مخز ن آسماری به صورت Ex situ بود.

روش بررسی: برای این منظور یک نمونه باسیلوس با مقاومت گرمایی بالا جداسازی و انتخاب شد و توانایی تولید بیوسورفاکتانت در این سویه مورد بررسی قرار گرفت پس از مطالعات مورفولوژی، بیوشیمیایی و ژنتیکی بهترین شرایط جهت تولیدبیوسورفکتانت از نظر مقدار کربن،ازت، pH،دما ،دور shaker ، مقاومت گرمایی و... مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: در میدان مورد مطالعه ضخامت متوسط قرار گیری سازند آسماری در یال شمالی تاقدیس میدان بی بی حکیمه در حدود ۴۵۰ متر و متوسط درجه حرارت در مخزن آسماری نسبت به سایر میادین با توجه به موقعیت ساختمانی کاهش قابل توجهی را نشان می دهد و شرایط بهینه جهت اجرای عملیات ازدیاد برداشت میکروبی قلمداد می شود. با توجه به نتایج مورفولوژیکی، تست‌های بیوشیمیایی و ژنتیکی باکتری مورد نظر ***Bacillus***

* عهده دار مکاتبات: Bioabbas@Tco.ir

Archive of SID
www.SID.ir

Bacillus licheniformis است. حداقل مقادیر کشش سطحی به دست آمده برای محیط‌های کشت سویه ***Bacillus licheniformis*** جداسازی شده ۳۰mN/m در مقایسه با مقادیری که برای سایر باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت گزارش شده در حد کاملاً قابل قبولی قرار داد. نفت خام بهترین منبع کربن آلی برای سویه فوق است. سویه مورد مطالعه در pH ۶ الی ۸ قادر به تولید بیوسورفکتانت بوده ولی بهترین تولید pH بین ۶/۵ تا ۷/۵ می‌باشد. ضریب امولسیفیکاسیون *بهترین سویه* SBB_5 ۹۱٪ بدست آمد. سدیم نیترات بهترین منبع نیتروژن برای تولید بیوسورفکتانت بوده به طوری که در این منبع سویه قادر به کاهش کشش سطحی به اندازه ۳۰mN/m بوده است. از طرفی ساکارز و گلوگز به ویژه ساکارز قادر به کاهش کشش به میزان ۳۰mN/m می‌باشد.

نتیجه گیری: کاهش فشار مخزنی، موقعیت ساختمانی و شرایط پتروفیزیکی حاکم در میدان نفتی از نظر مشخصات PVT مخزن سیستم رانش Dual در مخزن مورد مطالعه حکمفرماست و در طی سال های گذشته به علت افت فشار در هر دو سیستم رانش افت فشار از نوع Water conning و Gas conning به وجود آمده است ولی پدیده Gas conning شدیدتر است به همین سبب تامین فشار مخزن و جلوگیری از کاهش فشار افزوده مخزن می تواند نقش به سزایی در افزایش عمر مخزن ایفا نماید. دما در مخزن آسماری در بازه گرمایی ۶۵ تا ۱۲۰ درجه قرار گرفته است به همین سبب در شرایط مذکور امکان رشد باسیلوس به لحاظ شرایط مخزنی برقرار است. سازند آسماری دارای شکستگی های متعددی است و از نظر تراوایی در وضعیت مناسبی قرار دارد میزان تخلخل و اشباع آب در چاه های مختلف در سازند مورد مطالعه به ترتیب بیش از ۷درصد و کمتر از ۵۰ درصد است.

واژه های کلیدی: میدان نفتی بی بی حکیمه، مخزن آسماری و ازدیاد برداشت.

مقدمه

کشور ما از لحاظ منابع گازی و نفتی به ترتیب مقام سوم وچهارم را در جهان دارا می باشد. به بیان دیگر ۱۰ درصد کل نفت کره زمین (۱۳۲/۵ بیلیون بشکه) و ۱۶ درصد کل گاز کشف شده جهان (۹۷۱ تریلیون فوت مکعب) در ایران قرار دارد.[۱] تاریخچه تولید اقتصادی نفت در خاورمیانه با اکتشاف مخزن نفتی (مسجد سلیمان) در سال ۱۹۰۸ در ایران آغاز شد. در سال های بعد اکتشافات با میادین نفتی در کویت (۱۹۳۷) و عربستان صعودی (۱۹۳۸) ادامه یافت.[۲] قسمت اعظم مخازن ایران در پهنه زمین شناسی زاگرس و حوضه خلیج همیشه فارس واقع شده است. در شمال شرق (کپه داغ) و شمال غرب (دشت مغان) کشور نیز اکتشافاتی صورت گرفته است و هم اکنون پی جویی ها برای یافتن مخازن جدیدتر در حال انجام است. در حدود ۴۳ درصد مخازن ایران جزء مخازن بزرگ و بسیار بزرگ رده بندی می شوند که شامل ۶۴ مخزن گازی و نفتی است. صرفاً از لحاظ تعداد مخازن و بدون توجه به حجم هیدروکربورها تقریباً ۹۰ درصد مخازن بزرگ ایران کربناته و ۱۰ درصد ماسه سنگی می باشند از این تعداد ۵۳/۱۲ درصد مخازن بزرگ نفتی و ۴۶/۸۷ درصد آن گازی می باشد[۳] به نظر می رسد از لحاظ حجم هیدروکربوری نیز نسبت مخازن کربناته به ماسه سنگی تقریباً ۹ به ۱ صادق باشد. استفاده از میکروب ها در ازدیاد

Archive of SID

www.SID.ir

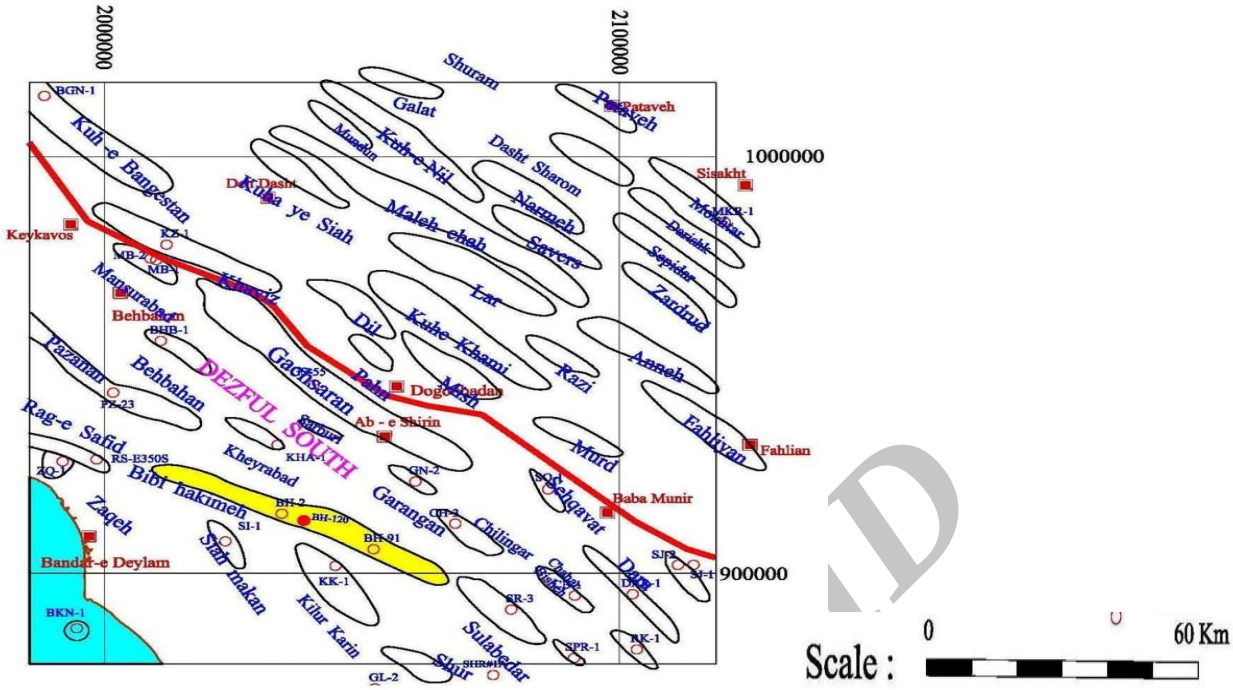
برداشت نفتMEOR اولین بار در سال ۱۹۱۳ Davis به صورت مکتوب ثبت شده است. در سال ۱۹۴۶ Zobellفرایندی جهت باز یافت ثانویه نفت با استفاده از میکروب های بی هوازی ومکانیزم انحلال مواد معدنی سولفاتی ثبت کرد. اولین آزمایش میدانی ازدیاد برداشتMEOR در سال ۱۹۵۴ در یکی از میادین آرکانزاس صورت گرفت. اما با وجود موفق بودن روش مذکور به دلیل در دسترس بودن منابع نفتی ارزان قیمت این روش کنار گذاشته شد. در دهه ۱۹۷۰ مجدداً به دلیل ناپایداری قیمت نفت و گرایش به بیو تکنولوژی این شیوه مورد توجه قرار گرفت. از سال ۱۹۸۰ به بعد به دلیل افزایش قیمت نفت در کشورهای مختلف این روش متداول شد در کشورهای حوضه خلیج فارس از ۱۳ سال قبل فعالیت های MEOR آغاز شده است و در کشور ما نیز تحقیقات متعددی در طی ده سال اخیر صورت گرفته است. اما به دلیل عمق زیاد مخازن و درجه حرارت بالا نفت در این مخازن تحقیقات به مرحله صنعتی نرسیده است.

مشخصات کلی میدان بی بی حکیمه

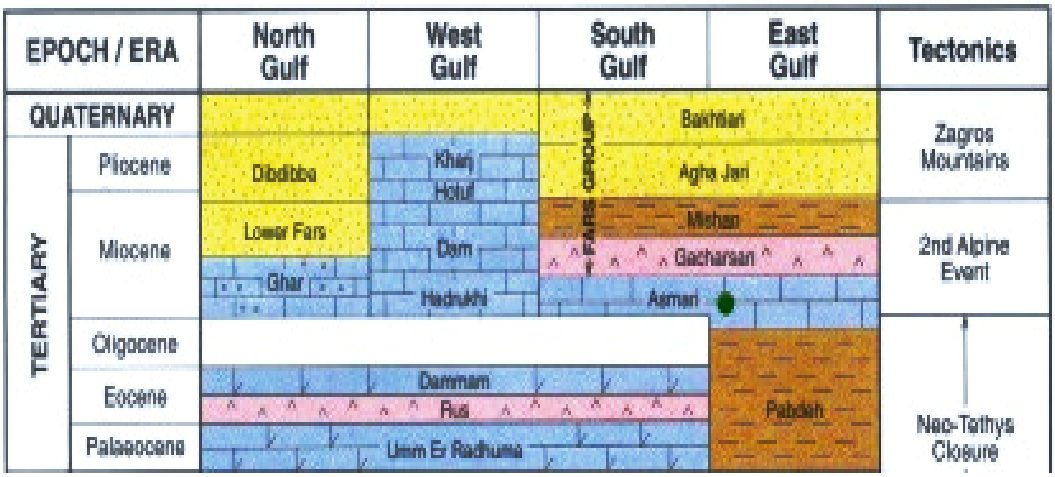
ساختمان ژئوفیزیکی بی بی حکیمه واقع در ناحیه دزفول جنوبی در شمال تاقدیس های کیلور کریم و سیاه مکان در جنوب تاقدیس خیر آباد گرنگان و چلینگر و با روند شمالی غربی – جنوب شرقی در امتداد ساختمان های سولابدر و رگ سفید واقع گردیده است (نقشه-۱).[۲] جوانترین رخنمون سطح این تاقدیس سازند بختیاری و قدیمی ترین آن سازند میشان می باشد. در ساختمان بی بی حکیمه سازند آسماری با ابعاد ۷۵ در ۸ کیلومتر مخزن اصلی و سروک دومین مخزن بهره ده این میدان می باشد. میدان مذکور در سال ۱۳۴۰ کشف گردید[۳] و دارای دو سازند مخزنی آسماری و گروه بنگستان است. دو مخزنیاد شده در ارتباط فشارشی یکدیگر قرار دارند (نقشه -۲). سازند آسماری یکی از افق های پراهمیت مخزنی است که از عراق به سمت ایران گسترش یافته است و در حاشیه شمالی خلیج فارس از ضخامت سازند آسماری به مقدار قابل ملاحظه ای کاسته شده است (شکل-۱) و در عراق سازند آسماری به نام سازند Jirob تغییر نام داده است ولی لیتولوژی آن به طور کلی شبیه ایران است و دارای فسیل شاخص به سن میوسن پسین*Neoalveolina melo curdica, Nummulites intermedius* و *Austrollina howchini* و ... است.

Archive of SID

www.SID.ir



نقشه ۱ –زمین شناسی ساختمانی بی بی حکیمه

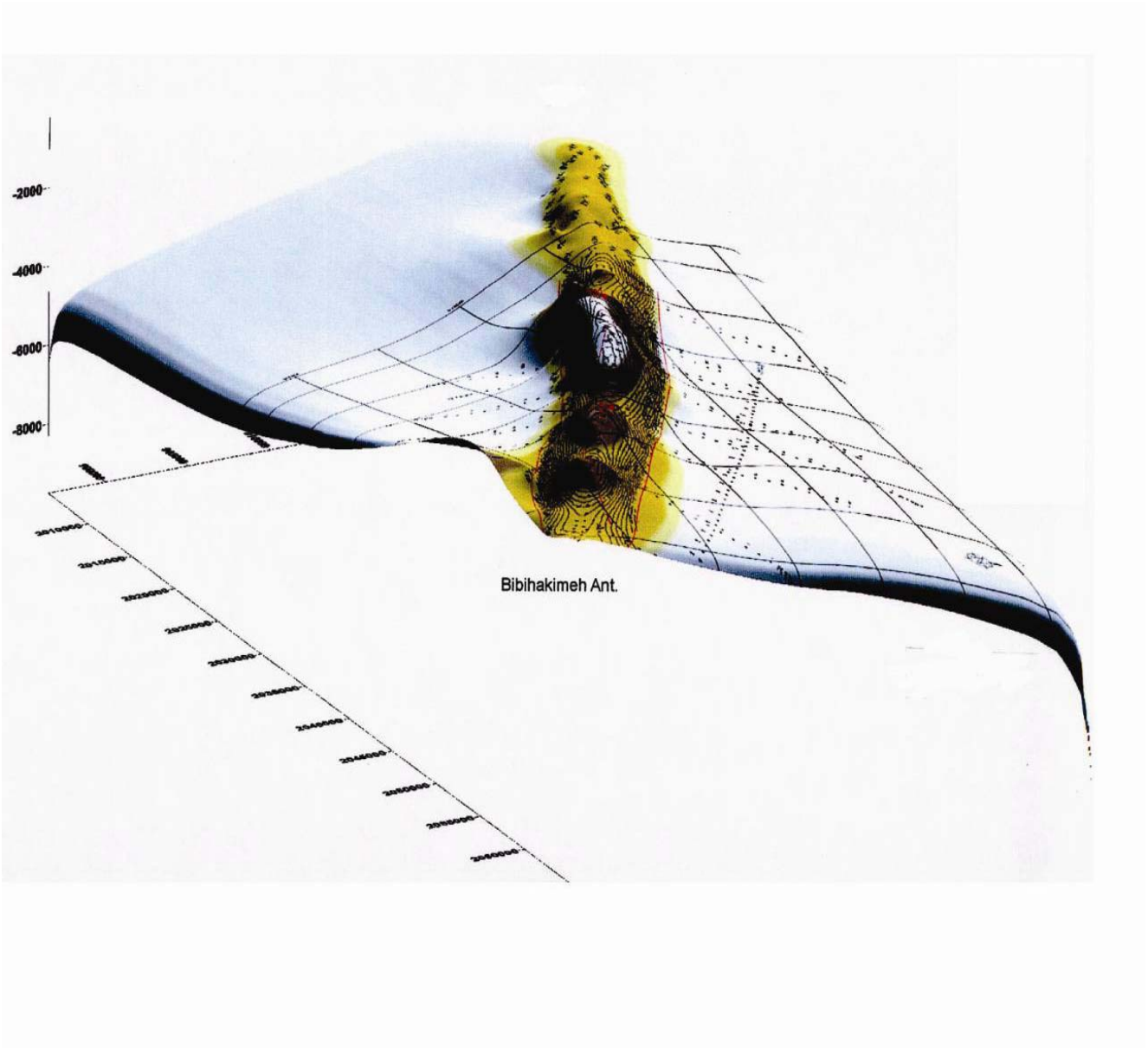


شکل۱ – ستون چینه نگاری [۳]

بر اساس جدید ترین نقشه UGC ساختمانی راس سازند فهلیان که توسط بخش ساختمانی شرکت ملی نفت ایران تهیه شده است. ساختمان بی بی حکیمه دارای ابعاد ۴ در ۶۱ کیلومتر با بستگی قائم بیش از ۱۴۰۰ متر است. نتایج حاصل از حفاری و آزمایشات صورت گرفته در چاه های مختلف میدان مورد مطالعه حاکی از پیچیدگی های زمین شناسی این میدان است که به سبب حرکت صفحه عربستان به سمت صفحه ایران ایجاد شده است و در نتیجه سبب شکل گیری گسل های عمقی به صورت Back Thrust &Fore Thrust در اکثر تاقدیس ها چین خوردگی ها

www.SID.ir

دیده می شود و گسل های یاد شده بر کیفیت پارامترهای مخزنی میدان مورد مطالعه تاثیر ات فروانی گذاشته است و سبب افزایش بهره دهی شده است.



نقشه۲- نقشه کانتوری سه بعدی تاقدیس بی بی حکیمه

www.SID.ir

مواد و روشها

روش کار ارزیابی سازند آسماری از نظر امکان سنجی رشد میکروبی در میدان بی بی حکیمه

در این مطالعه از نظر امکان سنجی تولید بیو سورفکتانت از چاه های مختلف میدان بی بی حکیمه نمونه برداری شده و نمونه های مورد ارزیابی قرار گرفته اند. برای این منظور یک نمونه باسیلوس با مقاومت گرمایی بالا انتخاب شد و توانایی تولید بیوسورفاکتانت در سویه مورد مورد مطالعه از نظر مورفولوژی، بیوشیمیایی و ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفت.

مشخصات زمین شناسی و مخزنی سازند آسماری در میدان بی بی حکیمه

بر اساس مطالعات تکتونیکی، زمین شناسی و مخزنی صورت گرفته در ناحیه دزفول جنوبی به طور کلی امکان استفاده از روش ازدیاد برداشت میکروبی در منطقه مذکور ضعیف قلمداد می شود از بین تمام میادین موجود در ناحیه دزفول جنوبی میدان بی بی حکیمه به لحاظ مشخصات کمی و کیفی در وضعیت مناسب تری قرار دارد. میدان بی بی حکیمه یکی از میادین مادرده بندی می گردد دلیلی اصلی این امر فروانی جاه ها و پیشینه تولیدمیدان موید این امر می باشد که چاه های نفتی موجود از قدمت زیادی برخوردار هستند. با توجه به مطالعات زمین شناسی و تکتونیکی در یال شمالی میدان مورد مطالعه به سبب عملکرد گسله معکوس از ضخامت سازند گچساران به شدت کاسته شده است به گونه ای که در برخی چاه ها بخش های ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ حذف شده اند به همین جهت به سبب کاهش عمق قرار گیری مخزن آسماری و کاهش درجه حرارت چاه های واقع در یال شمالی میدان یاد شده دارای پتانسیل مناسبی جهت ازدیاد برداشت به روش میکروبی هستند.

به لحاظ شرایط تولیدی می توان به مشخصات متعددی اشاره کرد نفت تولیدی دارای ۲۹,۹ درجه API، وزن مخصوص متوسط آن در حدود ۰,۸۷ و مقدار سولفور متوسط از مخزن آسماری در حدود ۱,۶ درصد است و از نظر مشخصات مخزنی مطالعات به طور عمده در سه چاه از میدان بی بی حکیمه که در یال شمالی واقع شده بودند صورت گرفت و نتایج حاصل از فشار و دما مورد بررسی قرار گرفت و سپس مطالعات تکمیلی بر روی نمونه های مغزه انجام شد و میزان تخلخل و تراوایی مخزن برداشت گردید و شرایط مخزن از نظر امکان سنجی رشد باسیلوس و تولید بیوسورفکتناکت مورد بررسی قرار گرفت.

نقاط نمونه‌برداری

نمونه‌برداری به طور انحصاری در این مطالعه از سازند اسماری میدان بی بی حکیمه صورت گرفت.

نمونه‌برداری و انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه

جهت نمونه برداری از ظروف شیشه‌ای درب دار استفاده گردید. کلیه ظروف قبل از استفاده اسید شویی گردیده و به دفعات متوالی با آب معمولی و سپس با آب مقطر آبکشی شدند وبا اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه، استریل گردیدند(جدول- ۱).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول-۱ نمونه های برداشت شده از میدان بی بی حکیمه

حوزه نفتی بی بی حکیمه	1- BiBi well B_1 2- BiBi well B_3 3- BiBi well B_5

نمونه‌ها پس از جمع‌آوری در کوتاهترین زمان ممکن به آزمایشگاه منتقل شده ودرمحیط کشت مناسب کشت داده شدند. دمای اغلب نمونه‌های نفت در هنگام نمونه‌برداری بین ۶۵ تا ۱۲۰ درجه سانتیگراد بود.

شمارش میکروبی Pour plate

به منظور جدا سازی و سپس خالص سازی باکتری های موجود در نمونه خاکی، از روش پور پلیت بر روی محیط plate count agar استفاده شد. پس از زمان ۷۲-۴۸ ساعت اتوگذاری در دمای ۳۰°C رشد باکتریها بررسی و تعداد کلنی‌ها شمارش شد، تمامی تک کلنی های به دست آمده برای بررسی بیشتر به محیط نوترینت آگار انتقال داده شدند.پس از رشد بر روی این محیط به طور مقدماتی خصوصیات آنها اعم از خصوصیات ریخت شناسی و بیو شیمیایی مورد شناسایی قرار گرفتند .هدف از مطالعه موجود بررسی باکتریهای گرم مثبت بی هوازی اختیاری (باسیلوس ها) موثر در ازدیاد برداشت است.

غنی‌سازی باسیلوس های مولد بیوسورفاکتانت

به منظور ازدیاد تعداد باسیلوس های مولد بیوسورفاکتانت و بالا بردن احتمال جداسازی آن ها، تمامی نمونه‌هایی که از منابع محیطی مختلف جمع‌آوری شده بودند در محیط کشت اختصاصی باکتری‌های تجزیه کننده نفت، محیط نمک های معدنی MSM حاوی ۱٪ نفت، کشت داده شدند.

۳۰ml محیط کشت تازه MSM به ارلن مایر ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شده وبه مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱°C استریل گردید و سپس ۰/۳ ml(میزان ۱٪) نفت استریل شده با فیلتر غشایی (Pore size = 0.45µ Gelman Sciences)به آن اضافه شد. میزان ۰/۵ گرم نمونه خاک یا ۰/۵ml نمونه آب به آن اضافه شده وبه مدت دو هفته دردمای ۳۰°C گرماگذاری شد.

ترکیبات اصلی محیط کشت برحسب گرم در لیتر(gr/lit):

$(NH_4)_2So_4$ 3.0 ,$Na_2HPO_4$2.2, NaCl 0.05, $KH_2PO_4$1.4,$MgSO_4.7H_2O$ 0.6, $CaCl_2$ 0.02

محلول عناصر کمیاب برحسب میلی‌گرم بر لیتر(gr/lit):

$MnSO_4.4\ H_2O$ 200, $CuSO_4.5H_2O$705 ,$ZnSO_4$.$7H_2O$525, $Na_2MoO_4.2H_2O$15, 200, $H_3BO_3$15, $NiSO_4.6H_2O$27 $CoCl_2.6H_2O$

کشت ۲۴ ساعته به منظور جداسازی باکتری درمراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

جداسازی و خالص‌سازی باکتری

برای خالص سازی باکتری، از محیط نمک های معدنی آگاردار استفاده شد. این محیط با افزون ۱/۵٪ آگار به محیط مایع MSM تهیه شد. [۴]

از کشت های غنی‌سازی شده به روش کشت خطی، یا تهیه رقت‌های متوالی و کشت به روش Spread Plate Method، بر روی محیط جامد تلقیح گردید. [۵] یک فیلتر استریل آغشته به نفت استریل شده با فیلتر غشائی به روی درب پلیت قرار داده شد و پلیت تلقیح شده بر روی آن واژگون گردید. بخارات حاصل از هیدروکربن که در فضای داخلی پلیت جمع می‌شوند. دائماً در دسترس باکتری قرار داشته و باکتری می‌تواند از آن به عنوان منبع کربن استفاده کند.

کشت نمونه بر روی محیط جامد به دفعات متوالی تکرار گردید، تا وقتی که براساس مشخصات ظاهری و مورفولوژیک، دیگر باکتری جدید جداسازی نشد و به این ترتیب از جداشدن حداکثر باکتری‌های ممکن از نمونه، اطمینان حاصل شد. [۶]

غربالگری و جداسازی اولیه باکتری‌های مولد بیوسورفاکتانت

از آنجایی که تولید بیو سورفکتانت به عنوان یک معیار مناسب در ازدیاد برداشت نفت خام محسوب می شود[۷] لذا از بین روش های مختلفی که برای غربالگری باکتری‌های مولد بیوسورفاکتانت ابداع شده‌اند، بررسی فعالیت همولیتیک که به وجود بیوسورفکتانت‌ها نسبت داده می‌شود[۸]، به علت سادگی، سرعت بالا و عدم نیاز به امکانات پیچیده آزمایشگاهی، به عنوان معیار انتخاب اولیه باکتری‌های مولد بیوسورفاکتانت مورد استفاده قرار گرفت. همولیز β یا وجود هاله شفاف در اطراف کلنی‌به عنوان فعالیت همولیتیک مثبت در نظر گرفته شد و نمونه‌های دارای فعالیت همولیتیک مثبت برای مطالعات بعدی انتخاب شدند

اندازه‌گیری کشش سطحی

کشش سطحی به روش Du Nouy Ring Method و با استفاده از دستگاه تنسیومتر اندازه‌گیری شد و به عنوان یکی دیگر از معیارهای اصلی تولید بیوسورفاکتانت درنظر گرفته شد از کشت سویه‌ها درمحیط نوترینت براث، باOD_{45} =۰/۸-۰/۹ به عنوان مایع تلقیح استفاده شد. به این منظور هریک از سویه‌های انتخاب شده در ارلن مایرهای ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشتYeast Extract 1gr/lit + MSM، استریل تلقیح شدند و سپس مقدار ۲ میلی‌لیتر(۲٪) نفت استریل شده با فیلتر غشایی، به عنوان منبع کربن به آن اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰°C بر روی شیکر با دور ۲۰۰rpm قرار داده شدند اندازه‌گیری کشش سطحی نشان داد که تعدادی از سویه‌های دارای فعالیت همولیتیک، در حد قابل قبولی بیوسورفاکتانت تولید می‌کنند. سویه‌هایی که قادر به کم‌کردن کشش سطحی تا مقادیر کمتر از۴۰mN/m هستند، دارای حد قابل قبولی از تولید بیوسورفاکتانت هستند

Archive of SID

www.SID.ir

اندازه گیری فعالیت امولسیفیه‌کنندگی

برای اندازه‌گیری فعالیت امولسیفیه کنندگی از روشی که توسط Cooper و Goldenberg شرح داده شده است، استفاده شد.[۹]

اندازه گیری رشد وتولید بیوسورفاکتانت در شرایط نمکی

نتایج حاصل از یازده ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری، حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت MSM به ترتیب مقادیر ۱۸، ۱۶، ۱۴، ۱۲، ۱۰، ۸، ۶، ۴، ۲، ۰ و ۲۰ گرم بر لیتر NaCl افزوده شد وبه مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو با دمای ۱۲۱°C استریل گردیدند.

کشت سویه‌ها درمحیط نوترینت براث، با OD_{450}=۰/۸-۰/۹ به عنوان مایع تلقیح استفاده شد. ۱ میلی‌لیتر از مایع تلقیح به هریک از محیط‌ها تلقیح شده و در دمای ۳۰°C بر روی شیکر با دور ۲۰۰rpm قرار داده شدند.کشش سطحی و فعالیت امولسیفیکاسیون کشت ۴۸ ساعته نیز درحضور مقادیر مختلف نمک مورد بررسی قرارگرفت.

اندازه گیری رشد وتولید بیوسورفاکتانت درpHهای مختلف

۶ فلاسک ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط MSM به ترتیب به pH ۴،۶،۷،۸،۲ و ۱۰ رسانده شد و پس از استریل کردن محیط‌ها به هر فلاسک ۵ درصد تلقیح از محیط پیش کشت صورت گرفت و بر شیکر با دور ۱۸۰rpm و دمای ۳۰°C قرار داده شد. پس از ۴۸ ساعت جذب نوری و کشش سطحی این محیط‌ها اندازه گیری شد.کشش سطحی و فعالیت امولسیفیکاسیون کشت ۷۲ ساعته باکتری در pHهای ۱۰، ۸،۶،۴،۲ و ۱۲ اندازه گیری شد. برای تنظیم pH از محلولهای ۱ نرمال اسیدکلریدریک و سود ۱ نرمال استفاده گردید.

اثر منابع مختلف کربن در رشد وتولید بیوسورفاکتانت

به محیط کشت MSM، ۱٪ منابع کربن (۷ منبع کربن در۷ فلاسک)شامل نفت خام، ، هگزادکان، گلیسرول، ملاس، مانوز، ساکارز،گلوکز، فروکتوز و اضافه گردید و پس از استریل کردن محیط، ۵ درصد تلقیح از محیط پیش کشت صورت گرفت و برشیکر با دور ۱۰۰rpm و دمای ۳۰°C قرار داده شد. کشش سطحی ۴۸ ساعته هر یک از محیط‌ها به عنوان معیار تولید بیوسورفاکتانت اندازه گیری شد.

اثر منابع مختلف ازت در رشد وتولید بیوسورفاکتانت

به محیط کشت MSM منابع مختلف نیتروژن شامل اوره، پپتون،عصاره مخمر، نیترات سدیم ونیتریت سدیم به جای سولفات آمونیوم به مقدار ۰/۳ درصد اضافه گردید[۱۰] و پس از استریل کردن محیط و تلقیح ۵ درصد باکتری به شیکر با دور ۲۰۰rpm و دمای ۳۰°C منتقل شد. کشش سطحی ۴۸ ساعته هر یک از محیط‌ها اندازه گیری شد.

عوامل موثر بر تولیدبیوسورفاکتانت‌ها و ارزیابی شرایط پتروفیزیکی و PVT مخزن آسماری میدان بی بی حکیمه

از جمله فاکتورهای محیطی و شرایط رشد مانند درجه حرارت، میزان هوادهی، قابلیت دسترسی اکسیژن و نوع سوبسترا با تأثیر گذاشتن روی رشد و فعالیت سلولی بر تولید بیوسورفاکتانت تأثیر می‌گذارند در بیشتر موارد رشد روی کربوهیدرات‌ها، خود القاء کننده سنتز بیوسورفاکتانت‌ها می‌باشد ولی این مسأله در مورد تمام میکروارگانیسم‌ها ضروری نمی‌باشد. منبع کربن پارامتر بسیار مهمی محسوب می‌شود. تغییر سوبسترا اغلب باعث تغییر در نوع محصول می‌شود. بنابراین با تغییر در موارد اولیه خصیصه بیوسورفاکانت‌ها قابل تغییر خواهد بود. از عوامل موثر دیگر در تولید بیوسورفاکتانت‌ها می توان به غلظت آهن، منیزیوم، کلسیم و پتاسیم اشاره کرد.

Archive of SID

www.SID.ir

هوادهی نیز در تولید بیوسورفاکتانت نقش به سزایی دارد. بیشترین میزان تولید بیوسورفاکتانت وقتی حاصل می‌شود که شرایط اندکی بی‌هوازی است. دما فاکتوربسیار مهمی‌است که در میزان تولید بیوسورفاکتانت موثر می‌باشد. ولی معمولاً بیوسورفاکتانت‌ها در برابر دما مقاومت نشان می‌دهند. شرایط رشد به عواملی همانند درجه حرارت، میزان هوادهی، قابلیت دسترسی اکسیژن و نوع سوبسترا با تأثیر گذاشتن روی رشد و فعالیت سلولی بر تولید بیوسورفاکتانت تأثیر می‌گذارند(جدول-1).

به منظور اندازه گیری میزان مقاومت گرمایی بیوسورفاکتانت‌های حاصله به درجه حرارتهای بالا، اثر تیمار حرارتی ۱۰۰ °C و ۱۲۰ °C به مدت ۱۵ دقیقه، بر روی کشش سطحی (ST)، فعالیت امولسیفیه کنندگی(EC)، سوسپانسیون سلولی ومایع کشت باکتری مورد بررسی قرار گرفت.

جهت تهیه سوسپانسیون سلولی و مایع کشت، ۵۰۰ میلی‌لیتر از کشت ۴۸ ساعته باکتری در محیط MSI حاوی کروزن به عنوان منبع کربن، به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰rpm سانتریفوژ گردید. مایع رویی جمع‌آوری گردیده و ته نشست(Pellet) حاصله مجددا در ۵۰۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی به صورت سوسپانسیون درآمد.

نتایج و بحث

نتایج شمارش سلولی مربوط به باسیلوسها

پس از تهیه رقت از نمونه‌های نفتی و کشت در محیط پلیت کانت آگار، کلنی های جدا شده از هر رقت شمارش شده، که نتایج مربوط در جدول ۱ آمده است.از نکات قابل توجه آن دربرخی نمونه‌های برداشت شده از چاه های نفتی تعداد نسبتا زیادی باکتری و به ویژه باسیلوس رشد نموند(جدول-۲).

جدول ۲ - نتایج کلنی کانت نمونه‌های نفت

تعدادباکتری درهر میلی‌لیتر از نمونه	نتیجه pour plate	نام چاه نفت		
$۲/۵\times۱۰^{۲}$	+	B_1	well	SB
$۳/۵\times۱۰^{۵}$	+	B_3	well	SB
$۴/۵\times۱۰^{۲}$	+	B_5	well	SB

جداسازی اولیه و غربالگری

از حدود بیش از ۲۴ نمونه آب و نفتی که از مناطق نفتی مختلف تهیه شده بودند، براساس مشخصات ظاهری و صفات کلنی‌ها، ۱۳۶ سویه باکتریایی مختلف جداسازی گردیدند که همگی قادر به رشد بر روی محیط کشت MSM حاوی نفت به عنوان تنها منبع کربن بودند. از آنجا که فعالیت همولیتیکی یکی از خصوصیات باکتری های مولد بیوسورفکتانت است، فعالیت همولیتیک سویه ها به وسیله کشت بر روی محیط بلادآگار مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعاتی مشابه که برای جداسازی باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت انجام شده نیز از فعالیت

Archive of SID

www.SID.ir

همولیتیک برای جدا سازی اولیه استفاده گشت.[۱۱] همولیز β یا وجود هاله شفاف در اطراف کلنی‌به عنوان فعالیت همولیتیک مثبت در نظر گرفته شد و نمونه‌های دارای فعالیت همولیتیک مثبت برای مطالعات بعدی انتخاب شدند ازبین این تعداد سویه جداسازی شده، ۳۶ سویه قادر به تجزیه اریتروسیتهای و تولیدهاله همولیزB بر روی محیط Blood Agar بودند و ۱۰۰ سویه باقی مانده فاقد فعالیت همولیتیک بودند.

براساس نتایج حاصل از مطالعات قبلی بر روی باکتری های مولد بیوسورفکتانت، هر سویه باکتریایی که قادر به کم‌کردن کشش سطحی تا مقادیر کمتر از ۴۰mN/m باشد می‌تواند به عنوان یک سویه مناسب برای تولید بیوسورفکتانت در نظر گرفته شود.از بین ۳۶ سویه‌ای که کشش سطحی ۸ سویه قادر به کم کردن کشش سطحی تا مقادیر کمتر از ۴۰ mN/m هستند و می‌توانند کاندیدهای مناسبی برای مطالعات بعدی درنظر گرفته شوند. قوی‌ترین بیوسورفکتانتی که تا به امروز گزارش شده، سورفاکتین است که یک آنتی بیوتیک پپتید و لیپیدی با فعالیت سطحی قابل توجه است و به وسیله*Bacillus subtilis* تولید می‌شود.[۴]

این بیوسورفکتانت قادر است کشش سطحی محیط رشد را از ۷۰mN/m تا مقادیر کمتر از ۲۶mN/m کاهش دهد. [۱۲] لیکینیسینA جدا شده از باسیلوس لیکینیفورمیس توسط Yakimov در آلمان نیز مشابه باسورفاکتین قادر است کشش سطحی محیط را از۷۲mN/m به ۲۸mN/m کاهش دهد .[۱۳]

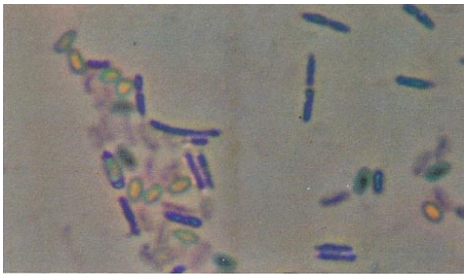
سویه های جدا شده به وسیله روش های مورفولوژیکی(شکل-2) و تست‌های بیوشیمیایی (جدول-۲) با استفاده از کتاب رده بندی سیستماتیک باکتری ها Bergeys شناسایی گشتند.

انتخاب مناسب ترین سویه

از بین ۸ سویه‌ای که برای مطالعات نهایی مناسب تشخیص داده شدند به علت نزدیک بودن کشش سطحی حاصل از کشت این سویه‌ها، کشش سطحی به تنهایی نمی‌تواند معیار مناسبی برای انتخاب بهترین سویه باشد. با توجه به این نکته و به منظور انتخاب مناسبترین سویه یا سویه‌ها، تست‌های تکمیلی نظیر فعالیت امولسیفیکاسیون انتخاب و مورد مطالعه قرار گرفتند. فعالیت امولسیفیه کنندگی که باضریب امولسیفیکاسیون(E_{24}) و به روش Cooper مشخص می‌شود، مقیاسی برای نشان دادن توانایی بیوسورفکتانت در امولسیفیه کردن هیدروکربن‌های مختلف است. ضریب امولسیفیکاسیون *بهترین سویه ما یعنی* SBB_5 ۹۱٪ بود. با توجه به نتایج بالا (روش های مورفولوژیکی و تست‌های بیوشیمیایی) و مقایسه آن با جدول شناسایی باسیلوس ها در کتاب Bergeys می‌توان گفت که باکتری‌های مورد نظر ما احتمالا باسیلوس لیکینفوریس است. حداقل مقادیر کشش سطحی به دست آمده برای محیط‌های کشت سویه باسیلوس لیکینیفورمیس جداسازی شده ۳۰mN/m در مقایسه با مقادیری که برای سایر باکتری‌های مولد بیوسورفکتانت گزارش شده در حد کاملاً قابل قبولی قرار داد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۲ – باسیلوس لیکنی فورمیس الف– اشکال میکروسکوپی ب– کلنی

جدول ۳– نتایج تست‌های بیوشیمایی سویه باسیلوس لیکنی فورمیس

تست‌های بیوشیمیایی	نتایج
Casein hydrolyze	+
Starch hydrolyze	+
Citrate utilize	+
Egg yolky lecithinase	–
Nitrate reduced to nitrite	+
Catalaz	+
Growth in Nacl (2-10%)	+
VP	+
Motility	+
Urease activity	–
Acid from	–
D- Glucose	+
L-Arabinose	+
D-Mannitol	+
D-Xulose	+
Gelatin hydrolyze	+

بررسی اثر نمک بر فعالیت بیوسورفاکتانت‌های حاصله

جهت بررسی فعالیت بیوسورفاکتانت‌های حاصل از سویه فوق، کشش سطحی ST و فعالیت امولسیفیه‌کنندگی کشت باکتری در حضور غلظت‌های ۱٪، ۲٪، ۴٪، ۶٪، ۸٪، ۱۰٪، ۱۲٪، ۱۴٪، ۱۶٪، ۱۸٪ و ۲۰٪ نمک

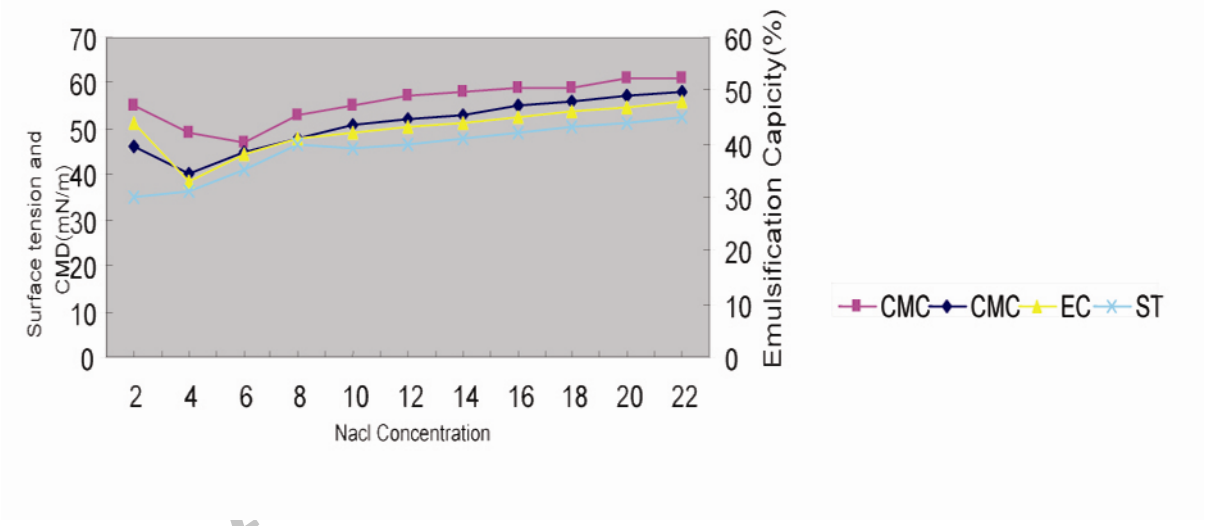
Archive of SID

www.SID.ir

کلریدسدیم اندازه گیری شد. اغلب سویه‌های جدا شده از مخازن نفتی در میزان نمک ۲ تا ۴ درصد بیشترین توانایی تولید بیوسورفکتانت را دارند. به تدریج با افزایش درصد نمک از ۶ ٪ تا ۲۰٪ تولید بیوسورفکتانت کاهش می‌یابد. بیشترین تولید بیوسورفاکتانت مربوط به سویه SB B_5 بود که درنمک ۴ درصد قادر به کاهش کشش سطحی به میزان ۳۰mN/m نسبت به نمونه شاهد می‌باشد. در آزمایش بررسی اثر غلظت‌های مختلف نمک بر فعالیت بیوسورفاکتانت ***Bacillus licheniformis*** حتی با افزایش غلظت نمک به میزان ۱۰٪ نیز تغییر اندکی در فعالیت این بیوسورفاکتانت ها مشاهده می‌شود(نمودار-۱).

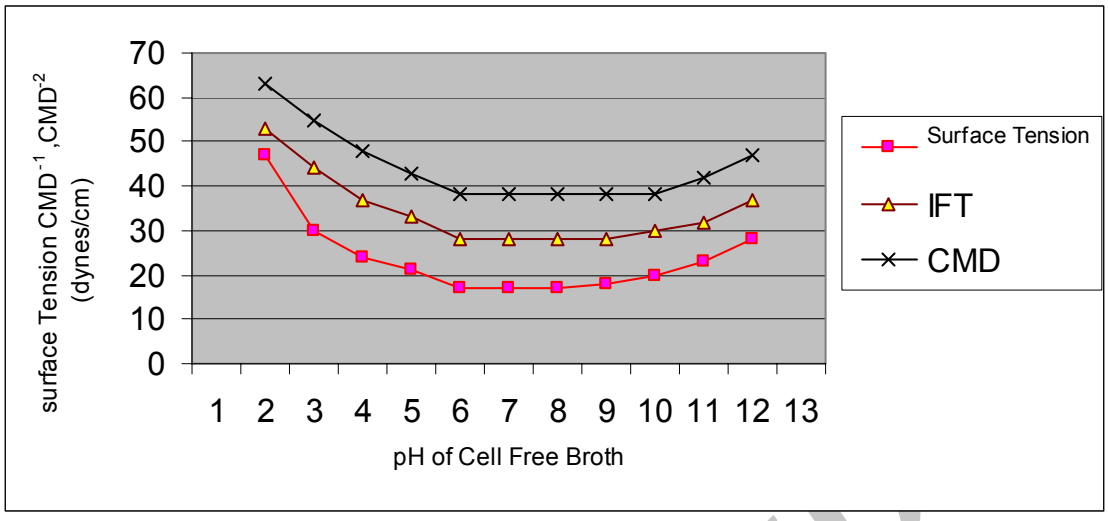
اندازه گیری رشد و تولید بیوسورفکتانت در pHهای مختلف

جهت بررسی اثر pHهای مختلف بر فعالیت سطحی بیوسورفاکتانت‌های سویه *Bacillus sp.*، کشش سطحی، کشش بین سطحی و CMD کشت ۴۸ ساعته باکتریهای در pHهای ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و۱۲ اندازه گیری شد . نمودار 2 نتایج بدست آمده را نشان می‌دهند. تأثیر pH برروی تولید بیوسورفکتانت این سویه نشان می‌دهد که در pH، ۶ الی ۸ قادر به تولید بیوسورفکتانت بوده ولی بهترین تولید pH بین ۶/۵ تا ۷/۵ می‌باشد.



نمودار- ۱ اثر غلظت‌های مختلف نمک بر فعالیت بیوسورفاکتانت حاصل از سویه ***Bacillus licheniformis***

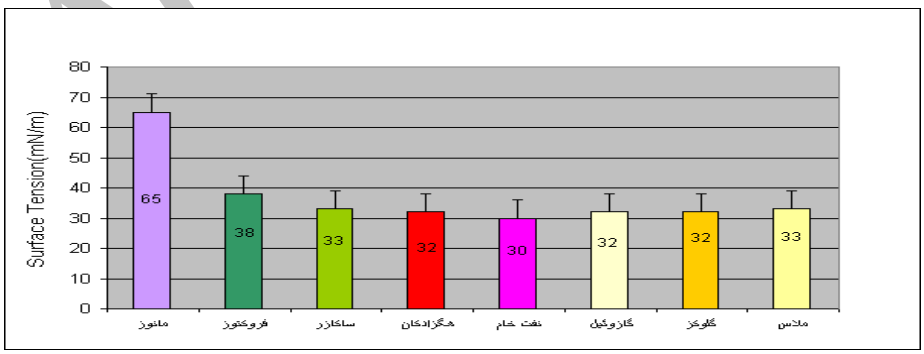
www.SID.ir



نمودار ۲- منحنی اثر pH های مختلف بر فعالیت بیوسورفکتانت حاصل از سویه ***Bacillus licheniformis***

اثر منابع کربن بر تولید بیوسورفاکتانت توسط سویه *Bacillus licheniformis*

نمودار ۳ اثر هفت منبع کربن مختلف شامل: گلوکز، گازوئیل، مانوز، فروکتوز، ساکارز، ملاس، نفت خام و هگزادکان را بر کشش سطحی حاصل از کشت ۴۸ ساعته ۸ سویه مولد بیوسورفاکتانت ***Bacillus licheniformis*** نشان می‌دهد.این سویه درانواع منابع کربن قادر به رشد وتولید بیوسورفکتانت بود. به طوریکه درنفت خام، نفت گاز، هگزادکان، ساکارز، فروکتوز، گلوکز، و ملاس قادر به رشد وکاهش کشش سطحی می‌باشد. منابع کربن ساده نظیر گلوکز، فروکتوز و ساکارز به دلیل ساختار ساده‌تر، به طور قابل ملاحظه‌ای توسط این باسیلوس جدا شده از نفت مورد استفاده واقع شده و کشش سطحی را به میزان بیشتری کاهش می‌دهند (نمودار-۳). بطوریکه ساکارز و گلوکز وبخصوص ساکارز قادر به کاهش کشش به میزان ۳۰mN/m می‌باشد. نفت خام بهترین منبع کربن آلی است.



نمودار ۳ - اثر منابع کربن بر کشش سطحی کشت ۴۸ ساعته سویه ***Bacillus sp.***

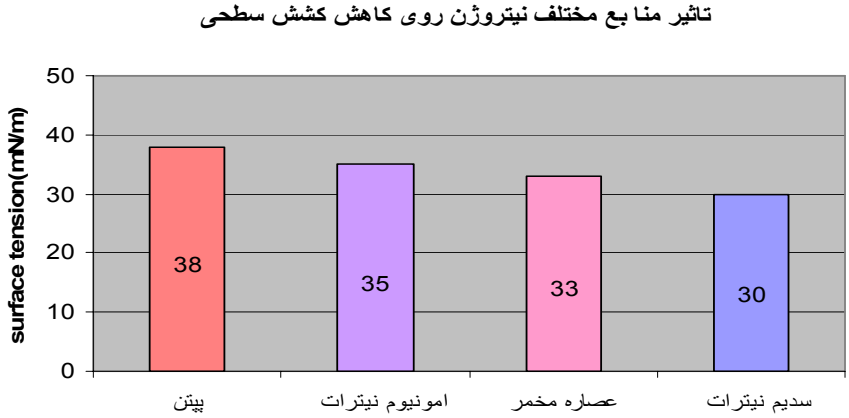
Archive of SID

www.SID.ir

اثر منابع نیتروژن بر تولید بیوسورفاکتانت توسط سویه *Bacillus licheniformis*

نمودار ۴ اثر چهار منبع نیتروژن مختلف شامل: پپتن، نیترات سدیم، عصاره مخمرو امونیوم نیترات را بر کشش سطحی حاصل از کشت ۴۸ ساعته سویه های مولد بیوسورفاکتانت *Bacillus licheniformis* نشان می‌هد.

این سویه درانواع منابع نیتروژن قادر به رشد وتولید بیوسورفکتانت بود،اما همان طور که در نمودار۴ ملاحظه می شود ، سدیم نیترات بهترین منبع نیتروژن برای تولید بیوسورفکتانت بوده به طوری که در این منبع سویه قادر به کاهش کشش سطحی به اندازه ۳۰mN/m بوده(نمودار-۴).



نمودار۴- اثر منابع نیتروژن بر کشش سطحی کشت ۴۸ ساعته سویه ***Bacillus licheniformis***

اندازه گیری مقاومت گرمایی بیوسورفاکتانت‌های حاصله و ارزیابی شرایط پتروفیزیکی وPVT مخزن آسماری میدان بی بی حکیمه

به علت بالا بودن شرایط دمایی در اعماق مخازن نفتی، بیوسورفاکتانت مورد استفاده باید به دماهای بالا مقاوم باشدحوضه نفتی زاگرس بسیار عمیق است به همین سبب درجه حرارت مخزن بالا است، فرایند ازدیاد برداشت باید به صورت EX situ صورت گیرد و روش In situ در میدان مورد مطالعه ناکارآمد تشخیص داده شده است. همچنان که نتایج نشان می دهد میکروارگانیسم‌های جدا شده در دماهای بالا رشد می‌نمایند، ولی تولید فرآورده‌های آن ها به شدت کاهش می‌یابد. در میدان مورد مطالعه ضخامت متوسط قرار گیری سازند آسماری در یال شمالی تاقدیس میدان بی بی حکیمه در حدود ۴۵۰ متر و متوسط درجه حرارت در مخزن آسماری نسبت به سایر میادین با توجه به موقعیت ساختمانی کاهش قابل توجهی را نشان می دهد(نمودار-۵). نقش پارامترهای مختلف مخزنی در جدول ۵ حاکی از شرایط بهینه اجرای عملیات ازدیاد برداشت میکروبی در میدان مورد مطالعه است.

جهت بررسی میزان مقاومت گرمایی بیوسورفاکتانت‌های حاصله به درجه حرارت های بالا، اثر تیمار حرارتی ۱۰۰ °C و ۱۲۰ °C به مدت ۱۵ دقیقه، بر روی کشش سطحی(ST)، فعالیت امولسیفیه‌کنندگی (EC) سوسپانسیون سلولی و مایع کشت حاصل ازسویه ***Bacillus licheniformis*** مورد بررسی قرار گرفت ، نتایج

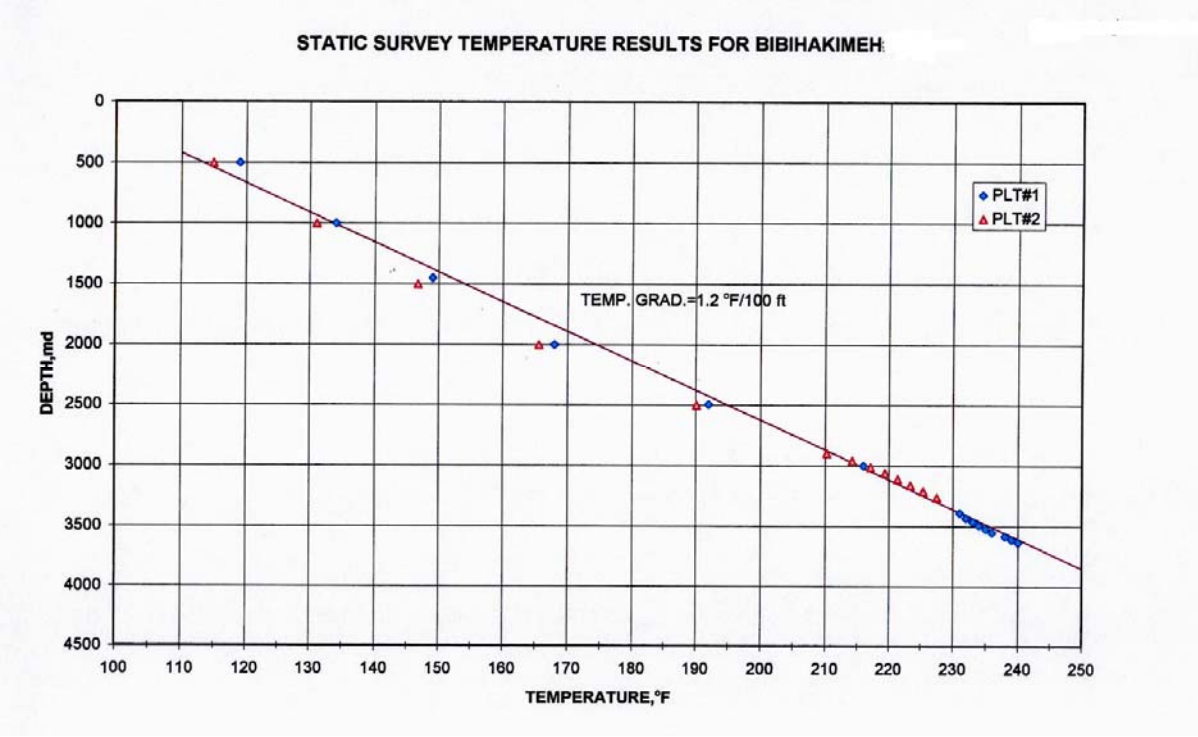
Archive

www.SID.ir

حاصل شده در جدول ۴ آورده شده است. هوادهی نیز در تولید بیوسورفاکتانت نقش به سزایی دارد. به‌عنوان مثال در نمونه مورد مطالعه(***B.licheniformis***) مشخص شده، بیشترین میزان تولید بیوسورفاکتانت وقتی حاصل می‌شود که شرایط اندکی بی‌هوازی است. دما فاکتوربسیار مهمی‌است که در میزان تولید بیوسورفاکتانت موثر می‌باشد. ولی معمولاً بیوسورفاکتانت‌ها در برابر دما مقاومت نشان می‌دهند. بدین صورت که قابلیت امولسیفیکاسیون، کشش سطحی و کشش بین سطحی آن ها پس از ۱۵ دقیقه اتوکلاو در دمای ۱۲۰˚C نیز تغییر نمی‌یابد.

جدول ۴ – اثر تیمار حرارتی بر فعالیت بیوسورفاکتانت حاصل از سویه ***Bacillus licheniformis***

Biosurfactant property	Before heat Treatment	After heat treatment(Temp./time) 100 ^{0}C/15mi	120 ^{0}C/15min
Culture broth			
ST	31.3	31.3	31.1
EC{%}	55.0	55.0	55.0
Cell suspension			
ST	30.4	30.3	30.6
EC(%)	65.0	65.0	65.0



نمودار۵– نسبت دما به عمق در یکی از چاه های میدان بی بی حکیمه

www.SID.ir

به طور کلی میزان تولید بیوسورفکتانت ها منوط به شرایط رشد میکروبی و تمام عوامل مذکور در ارتباط با شرایط حاکم برسنگ مخزن آسماری و یا محیط رشد میکروب های گرما دوست می باشند. سازند آسماری به سن الیگومیوسن و لیتولوژی غالب سازند مذکور به طور عمده شامل سنگ ها ی آهک فسیل دار به رنگ قهوه ای – قهوه ای متمایل به خاکستری نیمه سخت تا سخت ریز بلور میکریتی به طور محلی دولومیتی شده و حاوی مقادیر اندکی بیتومن هستند بخش میانی سازند مذکور شامل سنگ آهک به رنگ قهوه ای روشن تا نخودی سفید نرم تا نیمه سخت با بین لایه های نازک شیلی به رنگ خاکستری مایل به سبز و مارن های خاکستری روشن می باشد. در بخش زیرین سنگ آهک نخودی سخت فسیل دار و در مواردی نیمه سخت و گل سفید می باشد. این سازند به صورت هم ساز بر روی سازند پابده قرار گرفته است. یکی از عوامل موثر در تولید بیوسورفکتانت ماده مصرفی است در بیشتر موارد رشد بر روی کربوهیدرات‌ها، صورت می گرفت ولی این مسأله در مورد تمام میکروارگانیسم‌ها ضروری نمی‌باشد. منبع کربن پارامتر بسیار مهمی‌محسوب می‌شود. تغییر سوبسترا اغلب باعث تغییر در نوع محصول می‌شود. بنابراین با تغییر در موارد اولیه خصیصه بیوسورفاکانت‌ها قابل تغییر خواهد بود. از عوامل موثر دیگر در تولید بیوسورفاکتانت‌ها غلظت آهن، منیزیوم، کلسیم و پتاسیم‌است. میزان متوسط تخلخل و تراوایی در سازند آسماری جهت رشد میکروارگانیسم‌ها از نوع باسیلوس مناسب است.

جدول۵- وضعیت PVT در یکی از چاه های موردمطالعه در میدان بی بی حکیمه

Carbon No.	Boiling Range Of FRAC@ 760mmHg.°C	Weight percent	Cutting Range WT%	SP.Gr.@ 15.56°C	Volume percent	Cutting Range VOL%	Moleculaf Weight	Mol percent	Cutting Range Mol%
C2	—	۰,۱۰۰۰	۰,۱۰۰۰	۰,۳۷۴۰	۰,۲۲۴۶	۰,۲۲۴۶	۳۰	۰,۶۲۴۷	۰,۶۲۴۷
C3	—	۰,۵۶۰۰	۰,۶۶۰۰	۰,۵۰۸۰	۰,۹۲۵۹	۱,۱۵۰۴	۴۴	۲,۳۸۵۱	۳,۰۰۹۸
Ic4	—	۰,۴۲۰۰	۱,۰۸۰۰	۰,۵۶۳۰	۰,۶۲۶۶	۱,۷۷۷۰	۵۸	۱,۳۵۷۰	۴,۳۶۶۸
Nc4	—	۱,۱۰۰۰	۲,۱۸۰۰	۰,۵۸۴۰	۱,۵۸۲۰	۳,۳۵۹۰	۵۸	۳,۵۵۴۱	۷,۹۲۰۹
Ic5	—	۰,۸۵۰۰	۳,۰۳۰۰	۰,۶۲۵۰	۱,۱۴۲۳	۴,۵۰۱۳	۷۲	۲,۲۱۲۴	۱۰,۱۳۳۳
Nc5	—	۰,۸۰۰۰	۳,۸۳۰۰	۰,۶۳۱۰	۱,۰۶۴۸	۵,۵۶۶۱	۷۲	۲,۰۸۲۲	۱۲,۲۱۵۵
C6	-۱,۳۶ ۶۸,۷	۲,۶۶۰۰	۶,۴۹۰۰	۰,۶۷۲۸	۳,۳۲۰۷	۸,۸۸۶۸	۸۲	۶,۰۷۶۸	۱۸,۲۹۲۴
C7	-۶۸,۷ ۹۸,۴	۲,۹۷۰۰	۹,۴۶۰۰	۰,۷۱۱۷	۳,۵۰۵۰	۱۲,۳۹۱۸	۹۵	۵,۸۷۸۳	۲۴,۱۷۰۷
C8	-۹۸,۴ ۱۲۵,۷	۵,۴۰۰۰	۱۴,۸۶۰۰	۰,۷۴۴۳	۶,۰۹۳۶	۱۸,۴۸۵۴	۱۰۷	۹,۴۴۸۹	۳۳,۶۱۹۶
C9	-۱۲۵,۷ ۱۵۰,۸	۴,۶۳۰۰	۱۹,۴۹۰۰	۰,۷۷۴۰	۵,۰۲۴۲	۲۳,۵۰۹۶	۱۱۹	۷,۲۹۶۴	۴۰,۹۱۶۰
C10	-۱۵۰,۸ ۱۷۴,۱	۴,۵۶۰۰	۲۴,۰۵۰۰	۰,۷۸۲۸	۴,۸۹۲۶	۲۸,۴۰۲۲	۱۳۲	۶,۴۷۳۸	۴۷,۳۸۹۸
C11	-۱۷۴,۱ ۱۹۵,۹	۴,۳۷۰۰	۲۸,۴۲۰۰	۰,۷۸۸۸	۴,۶۵۳۱	۳۳,۰۵۵۳	۱۴۸	۵,۵۴۳۱	۵۲,۹۳۲۹
Res>12	Res>۱۹۵,۹	۷۱,۵۸۰۰	۱۰۰,۰۰۰	۰,۸۸۷۲	۶۷,۷۶۳۸	۱۰۰,۸۱۹۱	۲۸۵	۴۷,۰۶۷۱	۱۰۰,۰۰۰۰

www.SID.ir

نتیجه گیری

با توجه به قدمت مخزن نفتی میدان یاد شده و میزان تولید میدان که از سال ۱۳۴۰ تا کنون در حال بهره برداری است نتایج حاکی از کاهش فشار مخزنی، موقعیت ساختمانی و شرایط پتروفیزیکی حاکم در میدان نفتی مورد ارزیابی قرار گرفتند از نظر مشخصات PVT مخزن با توجه به آن که سیستم رانش حاکم در مخزن آسماری Dual (رانش گاز به همراه رانش آب) در این میدان به چشم می خورد در طی سال های گذشته به علت افت فشار در هر دو سیستم رانش افت فشار از نوع Water conning و Gas conning به وجود آمده است ولی پدیده Gas conning با شدت بیشتری تاثیر نموده است و به همین سبب برای جلوگیری از بروز مشکلات، از حفاری جهت دار و افقی استفاده می شود و هزینه حفاری به میزان قابل توجهی افزایش یافته است و مدت زمان حفاری نیز مدت بیشتری به طول می انجامد به همین سبب تامین فشار مخزن و جلوگیری از کاهش فشار افزوده مخزن می تواند نقش به سزایی در افزایش عمر مخزن ایفا نماید. دما در مخزن آسماری در بازه گرمایی ۶۵ تا ۱۲۰ درجه قرار گرفته است به همین سبب در شرایط مذکور امکان رشد باسیلوس به لحاظ شرایط مخزنی برقرار است. سازند آسماری دارای شکستگی های متعددی است و از نظر تراوایی در وضعیت مناسبی قرار دارد میزان تخلخل و اشباع آب در چاه های مختلف در سازند مورد مطالعه به ترتیب بیش از ۷درصد و کمتر از ۵۰ درصد است. با توجه به مشخصات مورفولوژی، بیوشیمیایی، ژنتیکی بهترین شرایط جهت تولیدبیوسورفکتانت از نظر مقدار کربن، ازت، pH، دما، مقاومت گرمایی و... استفاده از سویه ***Bacillus licheniformis*** در میدان بی بی حکیمه برای فرآیند ازدیاد برداشت میکروبی به خصوص به روش EX situ قابل اجرا است.

Archive of SID

References:

1. Saxton, J., *Geology of Arabia peninsula USGS*, **560**, 225 (2006).
2. Beydoun, Z.R., Hughes Clark, M.W., and Stonely, R., *American Association Petroleum Geology* **55**, 336 (1992)
3. Bahmanian, M., *AAPG. Bull.* **77**, 2182 (2006).
4. Cassidy. D.P., and Hudak, A.J., *Journal of Hazardous Materials*, **38** , 253 (2001).
5. Bognolo. G., *Colloids and Surfaces* **152**, 41 (1991).
6. Cooper, D.G., Liss, S.N., and Ferment. J., *Technol.* **59**, 97 (1989).
7. Bessor F., and Michel G., *Biotechnology*, **14**, 1016 (1999).
8. Aalbry, E.A., and Mandel, M., *Biochemical and Biophysical Resarch communications*, **18**, 790 (1965).
9. Cooper D.G., and Goldenbergy, V.A., *Applide Environmantal Mirobiology.***189**, 227 (1999).
10. Cooper, D.G., and Paddock, B.G., *Environ. Microbio*, **46**, 1426 (1983).
11. Banat , I.M., *Bio resource Technology*, **51**, 8 (1995).
12. Black wood, K.S., and Turenne, C.Y., *Jornal of climal microbiology*, **42**, 1626 (2004).
13. Zekriy, A., *society of petroleum Engineers interational*, **96**, 8 (2002).

www.SID.ir