بسم الله الرحمن الرحيم
بسم الله الرحمن الرحيم
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده‌ی علوم

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد در رشته‌ی زیست شناسی- سلولی و مولکولی

جداسازی میکروارگانیسم هایی با قابلیت تولید بیوسورفاکتانت از نفت خام و بهینه سازی تولید با استفاده از منابع ارزان قیمت

به کوشش

مسعود وزیرزاده

استاد راهنما

دکتر حمید رضا کربلایی حیدری

شهریور ماه ۱۳۹۱

به نام خدا

اظهارنامه

اینجانب مسعود وزیرزاده (۸۹۰۳۶۷) دانشجوی رشته زیست شناسی گرایش سلولی و مولکولی دانشکده علوم اظهار می کنم که این پایان نامه حاصل پژوهش خودم بوده و در جاهایی که از منابع دیگران استفاده کرده ام و نشانی دقیق و مشخصات کامل آن را نوشته ام. همچنین اظهار می کنم که تحقیق و موضوع پایان نامه ام تکراری نیست و تعهد می نمایم که بدون مجوز دانشگاه دستاوردهای آن را منتشر ننموده و یا در اختیار غیر قرار ندهم. کلیه حقوق این اثر مطابق با آیین نامه مالکیت فکری و معنوی متعلق به دانشگاه شیراز است.

نام و نام خانوادگی: مسعود وزیرزاده

تاریخ و امضا:۱۳۹۱/۶/۲۵

جداسازی میکروارگانیسم هایی با قابلیت تولید بیوسورفاکتانت از نفت خام و بهینه سازی تولید با استفاده از منابع ارزان قیمت

به کوشش:

مسعود وزیرزاده

پایان نامه

ارائه شده به تحصیلات تکمیلی دانشگاه به عنوان بخشی

از فعالیت های تحصیلی لازم برای اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته ی:

زیست شناسی(علوم سلولی و مولکولی)

از دانشگاه شیراز

شیراز

جمهوری اسلامی ایران

ارزیابی شده توسط کمیته ی پایان نامه، با درجه: عالی

دکتر حمید رضا کربلائی-حیدری ، استادیار بخش زیست شناسی (رئیس کمیته) .....

دکتر ساسان محسن زاده، دانشیار بخش زیست شناسی .....

دکتر سید شهاب الدین آیت اللهی ،استاد بخش مهندسی شیمی.....

دکتر علی نیازی، دانشیار بخش پژوهشکده بیوتکنولوژی.....

شهریور۹۱

حرمت اعتبار خود راهرگز در میدان مقایسه خویش با دیگران مشکن

که ما هریک یگانه ایم

موجودی بی نظیر و بی تشابه

و آرمانهای خویش را به مقیاس معیارهای دیگران بنیاد مکن

تنها تو میدانی بهترین در زندگیت چگونه معنا میشود

از کنار آنچه با قلبت نزدیک است آسان مگذر

هر روز همان روز را زندگی کن

و بدینسان تمامی عمر را در کمال زیسته ای.

رویا هایت را فرو مگذار که بی آنان زندگانی را امیدی نیست

و بی امید، زندگی را آهنگی نباشد.

زندگی مسابقه نیست زندگی یک سفر است

و تو آن مسافر باش که در هر گامش

ترنم خوش لحظه ها جاری است.

با کمال خضوع تقدیم به:

مادرم را ئینه "افتادگی"، " عاطفه" و " پارسایی"

که زندگی ام برایش همه " رنج"

و وجودش برایم همه " مهر" بوده است

پدرم، اسطوره محبت، بزرگواری و معرفت؛

که همواره دعای خیر و حضور پر مهرشان یگانه تکیه گاهم در زندگی بوده وهست

دستان خسته و پر مهرشان را می بوسم و

همیشه شرمسار لطف بی حدشان خواهم بود.

سپاسگزاری

با تشکر و سپاس بی کران از استاد بزرگوار جناب آقای دکتر حمید رضا کربلایی حیدری که همواره مرا از بحر معرفت و بزرگواری خویش بهره مند نمودند، باشد که انوار هدایت آنان در سراسر زندگی چراغ راهم باشد.

با کمال تشکر از اساتید گرانقدر جناب آقای دکتر محسن زاده، جناب آقای دکتر نیازی و جناب آقای دکترآیت اللهی که مرا مورد لطف خویش قرار داده و پایان نامه مرا به داوری نشسته و با نیک اندیشی و حسن نظر خود در هر چه پربار تر کردن آن مرا یاری نمودند.

از دوستان خوبم در دانشکده علوم، بخش زیست شناسی صمیمانه سپاسگزارم و موفقیت روز افزون ایشان را آرزومندم.

چکیده

جداسازی میکروارگانیسم هایی با قابلیت تولید بیوسورفاکتانت از نفت خام و بهینه سازی تولید با استفاده از منابع ارزان قیمت

به کوشش
مسعود وزیرزاده

در روش ازدیاد برداشت میکروبی نفت، از میکروارگانیسم ها و فعالیت های متابولیکی آن ها مثل تولید بیوسورفکتانت ها در بازیافت نفت بهره گرفته می شود. این شیوه نسبت به سایر رو شهای ازدیاد برداشت نفت دارای مزیت های منحصر بفردی از جمله هزینه ی پایین و سازگاری بسیار خوب با محیط زیست می باشد. در پژوهش حاضر با فرض اینکه برخی از باکتری های موجود در نفت خام و یا خاک های آلوده به ترکیبات نفتی قادر به تولید بیوسورفاکتانت هستند، نمونه گیری از نفت خام برخی مخازن نفتی و خاک های آلوده منطقه برای جستجوی باکتری تولید کننده بیوسورفاکتانت انجام و پس از استخراج گونه های مختلف باکتری، انجام آزمایشات بررسی پتانسیل تولید بیوسورفکتانت و خصوصیات عملکردی آن جهت انتخاب مناسب ترین گونه ی باکتریایی انجام گرفت. سپسبهینه سازی تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری با تغییر شرایط فیزیکی و شیمیایی محیط کشت مورد مطالعه قرار گرفت. شناساییینوع بیوسورفکتانت تولید شده و محتوای بیوشیمیایی آن به کمک تکنیک های FTIR، TLC، GC-MS و NMR مورد بررسی قرارگرفت و نتایج اولیه حاکی از محتوای لیپوپپتیدی بیوسورفکتانت مورد نظر است. همچنین محیط و شرایط رشد باکتری در استفاده از منابع ارزان قیمت بهینه سازی شد. نتایج نشان داد که بالاترین میزان تولید این بیوسورفکتانت در غلظتهای ۵ ٪ ملاس چغندر قند، ۰/۸ ٪ آمونیوم نیترات در دمای ^{o}C ۳۰ و pH برابر با ۹/۰ حاصل شد.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱- سورفکتانت ها ۵

۱-۱- علم و فناوری سورفکتانت ها ۵

۱-۲ ساختار عمومی سورفکتانت ها ۶

۱-۳- طبقه بندی سورفکتانت ها ۷

۱-۴- سورفکتانت ها و کاهش کشش سطحی ۸

۱-۵- حلالیت سورفکتانت ۹

۱-۶- تشکیل میسل ۱۰

۱-۷- کاربرد های سورفکتانت ها ۱۱

۱-۸- بیوسورفکتانت ها ۱۲

۱-۸-۱- میکروارگانیسم های مولد بیوسورفکتانت ۱۲

۱-۸-۲- تخمین فعالیت بیوسورفکتانت ۱۳

۱-۸-۳- طبقه بندی بیوسورفکتانت ها و منشأ میکروبی آنها ۱۵

۱-۸-۳-۱- گلیکولیپیدها ۱۶

۱-۸-۳-۲- رامنولیپیدها ۱۶

۱-۸-۳-۳- لیپوپپتیدها و لیپوپروتئین ها ۱۷

۱-۸-۳-۴- اسیدهای چرب، فسفولیپیدها، و چربی های خنثی ۱۹

۱-۸-۳-۵- بیوسورفکتانت های پلیمری ۲۰

عنوان **صفحه**

۱-۸-۴ - کاربردهای بیوسورفکتانت ها ۲۱

۱-۸- ۵- مزایای استفاده از بیوسورفکتانت در مقایسه با سورفکتانت های سنتزی..... ۲۲

۱-۸-۶- فاکتورهای مؤثر در تولید بیوسورفکتانت..... ۲۳

۱-۸-۶-۱- منبع کربن..... ۲۳

۱-۸-۶-۲- منبع نیتروژن..... ۲۴

۱-۸-۶-۳- عوامل محیطی ۲۵

۱-۸- ۷- نحوه عملکرد بیوسورفکتانت ها در مخزن ۲۶

۱-۸- ۷-۱- اثر بیوسورفکتانت بر فاکتور های مخزن ۲۶

۱-۸-۷-۲- اثر بیوسورفکتانت بر عملکرد میکروارگانیسم تولید کننده در مخزن.....۲۶

۱-۹- روش های ازدیاد برداشت میکروبی نفت..... ۲۸

فصل دوم: مروری بر پژوهش های انجام شده ۳۱

فصل سوم: مواد و روش های تحقیق

۳-۱- نمونه گیری..... ۳۵

۳-۲- محیط های کشت باکتری..... ۳۵

۳-۲-۱- محیط پیش کشت (preculture) ۳۵

۳-۲-۲- استفاده از محیط کشت اختصاصی.....۳۶

۳-۲-۳- استفاده از محیط کشت جامد ۳۷

۳-۳ استفاده از کیت گرم و میکروسکوپ برای تشخیص خلوص و مشخصات باکتری ۳۷

۳-۴- غربالگری سویه های باکتریایی تولید کننده بیوسورفکتانت..... ۳۸

۳-۵ انتخاب بهترین سویه مولد بیوسورفکتانت ۳۸

۳-۵-۱- اندازه گیری میزان همولیز..... ۳۸

۳-۵-۲- اندازه گیری میزان جابجایی روغن ۳۸

عنوان **صفحه**

۳-۵-۳- اندازه گیری کشش سطحی ۳۹
۳-۵-۴- اندازه گیری فعالیت امولسیون کنندگی ۴۰
۳-۵-۵- بررسی پایداری بیوسورفکتانت تولیدی بر اساس فعالیت امولسیون کنندگی ۴۰
۳-۵-۵-۱- بررسی پایداری بیوسورفکتانت تولیدی توسط باکتری ها
بر اساس فعالیت امولسیون کنندگی در حضور حلال های مختلف ۴۰
۳-۵-۵-۲- بررسی پایداری بیوسورفکتانت تولیدی توسط باکتری ها
بر اساس فعالیت امولسیون کنندگی در حضور دما های مختلف ۴۰
۳-۵-۵-۳- بررسی پایداری بیوسورفکتانت تولیدی توسط باکتری ها
بر اساس فعالیت امولسیون کنندگی در حضور درصد های مختلف نمک ۴۱
۳-۵-۵-۴- بررسی پایداری بیوسورفکتانت تولیدی توسط باکتری ها
بر اساس فعالیت امولسیون کنندگی در حضور pH های مختلف ۴۱
۳-۶- تعیین بهینه رشد باکتری انتخاب شده در دما و pH های مختلف ۴۱
۳-۶-۱- تعیین بهینه رشد باکتری در دما های مختلف ۴۲
۳-۶-۲ تعیین بهینه رشد باکتری در pH های مختلف ۴۲
۳-۶-۳- روش های استفاده شده در تعیین خصوصیات باکتری ۴۲
۳-۶-۳-۱- روش میکروسکوپی ۴۲
۳-۶-۳-۲ روش مولکولی ۴۲
۳-۶-۳-۲-۱ استخراج DNA ۴۳
۳-۶-۳-۲-۲- واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ۴۳
۳-۶-۳-۲-۳-الکتروفورز محصول PCR ۴۵
۳-۶-۳-۲-۳-۱ روش تهیه ی بافر تانک الکتروفورز ۴۵
۳-۶-۳-۲-۳-۲- روش تهیه ژل آگارز ۱٪ ۴۵
۳-۶-۳-۲-۳-۳- الکتروفورز ۴۶

عنوان **صفحه**

۳-۶-۳-۲-۴- خالص سازی محصول PCR از ژل آگارز با استفاده
از کیت (Agarose Gel DNA Extraction Kit)..... ۴۶
۳-۶-۳-۲-۵- استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیک برای تجزیه
و تحلیل توالی بدست آمده ۴۷
۳-۷- جداسازی بیوسورفکتانت تولیدی ۴۸
۳-۸ روش ها و مراحل بهینه سازی تولید بیوسورفکتانت..... ۴۸
۳-۸-۱- طراحی محیط کشت جدید برای تولید بیوسورفکتانت..... ۴۸
۳-۸-۲- انتخاب فاکتور های موثر بر تولید بیوسورفکتانت با استفاده
از روش تک فاکتوری ۴۹
۳-۸-۳- بهینه سازی محیط کشت تولید بیوسورفکتانت با استفاده
از منابع ارزان قیمت ۵۰
۳-۸-۳-۱- روش آماده سازی محیط حاوی ملاس چغندر
و آب پنیر برای تولید بیوسورفکتانت ۵۰
۳-۸-۳-۲- روش آماده سازی محیط حاوی ملاس چغندر
و آمونیم نیترات برای تولید بیوسورفکتانت ۵۱
۳- ۹- تست in situ ۵۱
۳-۱۰- تعیین خصوصیات ساختاری بیوسورفکتانت ۵۳
۳-۱۰-۱- آنالیز TLC ۵۳
۳-۱۰-۲- طیف مادون قرمز و طیف کالریمتری ۵۳
۳-۱۰-۳-آنالیز GC/MS..... ۵۳
۳-۱۰-۴- H-NMR ۵۳

عنوان **صفحه**

فصل چهارم: نتایج

۴-۱-شناسایی و خصوصیات ظاهری باکتری های تولید کننده بیوسورفکتانت ۵

۴-۲- اندازه گیری میزان همولیز ۵۶

۴- ۳- اندازه گیری میزان جابجایی روغن ۵۷

۴- ۴- اندازه گیری کشش سطحی ۵۸

۴-۵- بررسی اثر حلال بر پایداری بیوسورفکتانت ۵۸

۴-۶- بررسی اثر دما بر پایداری بیوسورفکتانت ۵۹

۴-۷- بررسی اثر نمک بر پایداری بیوسورفکتانت ۶۰

۴-۸- بررسی اثر pH بر پایداری بیوسورفکتانت ۶۱

۴-۹- تعیین بهینه رشد باکتری EO-1 در دماهای مختلف ۶۲

۴-۱۰- تعیین بهینه رشد باکتری EO-1 در pH های مختلف ۶۳

۴-۱۱- مشاهده باکتری EO-1 در زیر میکروسکوپ الکترونی SEM ۶۴

۴-۱۲- تشخیص جنس باکتری به روش مولکولی ۶۵

۴-۱۳- انتخاب بهترین منبع کربن برای بهینه سازی محیط
برای تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری EO-1 ..... ۶۶

۴-۱۴- تعیین فاکتور های موثر توسط آزمایش تک فاکتوری ۶۷

۴-۱۵- بهینه سازی محیط کشت با استفاده از منابع کربن ارزان قیمت ۶۸

۴-۱۶- بهینه سازی محیط کشت با استفاده از منبع نیتروژن ارزان قیمت ۶۹

۴-۱۷- روش in situ ۷۰

۴-۱۸- تست TLC بیوسورفکتانت تولیدی توسط باکتری EO-1 ..... ۷۰

۴-۱۹- تست FTIR بیوسورفکتانت تولیدی توسط باکتری EO-1 ..... ۷۱

۴-۲۰- تست GC/MS بیوسورفکتانت تولیدی توسط باکتری EO-1 ..... ۷۲

۴-۲۱- تست H-NMR بیوسورفکتانت تولیدی توسط باکتری EO-1 ..... ۷۳

۴-۲۲- ساختار پیشنهادی بخشی از بیوسورفکتانت تولیدی توسط باکتری EO-1 ..... ۷۳

عنوان **صفحه**

فصل پنجم: بحث ۷۵

فهرست منابع ۷۹

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱) میکروارگانیسم های مولد بیوسورفکتانت ۱۳

جدول ۱-۲) انواع مهم سورفکتانت های میکروبی، منابع میکروبی و خواص آن ها ۱۴

جدول ۳-۱) ترکیب اجزا در محیط رشد محلول نمکی معدنی..... ۳۶

جدول ۳-۲- مخلوط واکنش PCR..... ۴۳

جدول ۳-۳- برنامه تنظیم شده برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز ۴۴

جدول ۳-۴- روش تهیه ی بافرTAE 50x..... ۴۵

جدول ۳-۵) اجزاء و درصد ترکیبات موجود در محیط کشت تولید بیوسورفکتانت..... ۴۹

جدول ۳-۶) مربوط به شمایی از چگونگی انجام آزمایش

توسط2III *Fractional factorial* ۴۹

جدول ۴-۱) نتایج حاصل از تست اندازه گیری کشش سطحی ۵۸

جدول ۴- ۲)نتایج حاصل از تعیین فاکتور های موثر توسط آزمایش تک فاکتوری.....۶۷

جدول۴-۳) نتایج حاصل از in situ..... ۷۰

جدول۴-۴) گروه های عاملی مربوط به هر پیک جذب

در طیف IR بیوسورفکتانت EO-1 ..... ۷۱

فهرست شکل ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱) روش های ازدیاد برداشت نفت ۴

شکل ۱-۲) شمای مولکول سورفکتانت در مرز هوا /آب..... ۶

شکل ۱-۳) نشان دهنده غلظت بحرانی تشکیل میسل یا CMC می باشد..... ۱۰

شکل ۱-۴) رامنولیپید تولید شده توسط گونه *P. aeruginosa* ۱۷

شکل ۱-۵) ساختمان شیمیایی سورفکتین تولید شده توسط *Bacillus Subtilis* ۱۸

شکل ۱-۶) ساختمان شیمیایی phosphatidyl ethanolamin،

یک بیوسورفکتانت قوی تولید شده توسط *Acinetobacter* sp. ۱۹

شکل ۱-۷) ساختمان شیمیایی emulsan تولید شده توسط *Acinetobacter*..... ۲۰

شکل ۳-۱ دستگاه DSA- 100 و نتایج بدست آمده از آن..... ۳۹

شکل ۳-۱) دستگاه سیلاب زنی مغزه ۵۲

شکل ۴-۱)(a) مربوط به باکتری جداسازی شده از لجن حفاری

و (b) مربوط به باکتری جداسازی شده از نفت مارون و (c) مربوط به باکتری

جداسازی شده از نفت مسجد سلیمان..... ۵۵

شکل۴-۲) تست همولیز که در شکل سمت راست گونهٔ باکتری قادر به همولیز کردن

محیط است در صورتیکه در شکل سمت چپ باکتری مارون قادر به همولیز

ولی باکتری مسجد سلیمان قادر به همولیز محیط نمی باشد..... ۵۶

شکل۴-۳) عکس میکروسکوپ الکترونی باکتری EO-1..... ۶۴

شکل۴-۴) آنالیز TLC نمونه به همراه یک لکهٔ قوی..... ۷۰

عنوان **صفحه**

شکل۴-۵) طیف FTIR مربوط به محصول بیوسورفکتانت EO-1 ..... ۷۱
شکل ۴-۶) GC/MS مربوط به محصول بیوسورفکتانت EO-1 ..... ۷۲
شکل ۴-۷) H-NMR مربوط به محصول بیوسورفکتانت EO-1 ..... ۷۳
شکل ۴-۸) ساختار پیشنهادی مربوط به محصول بیوسورفکتانت EO-1 ..... ۷۳

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمودار ۴-۱) نتایج حاصل از تست اندازه گیری میزان جابجایی روغن..... ۵۷

نمودار۴-۲) بررسی اثر حلال بر پایداری بیوسورفکتانت های تولیدی..... ۵۹

نمودار ۴-۳) بررسی اثر دما بر پایداری بیوسورفکتانت ۵۹

نمودار۴-۴) نتایج مربوط به بررسی اثر نمک بر پایداری بیوسورفکتانت ۶۰

نمودار ۴-۵) نتایج حاصل از بررسی اثر pH بر پایداری بیوسورفکتانت.....۶۱

نمودار ۴- ۶)نتایج حاصل از رشد باکتری EO-1 در دماهای مختلف ۶۲

نمودار ۴-۷) نتایج رشد باکتری EO-1 در pH های مختلف.....۶۳

نمودار ۴-۸) درخت فیلوژنی مربوط به باکتری جداسازی شده.....۶۵

نمودار ۴-۹) نتایج حاصل از انتخاب بهترین منبع کربن برای

بهینه سازی محیط برای تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری EO-1 .....۶۶

نمودار ۴-۱۰) نتایج حاصل از بهینه سازی محیط کشت با استفاده

از منابع کربن ارزان قیمت.....۶۸

نمودار ۴- ۱۱) نتایج حاصل از بهینه سازی محیط کشت با استفاده

از منبع نیتروژن ارزان قیمت.....۶۹

فصل اول

مقدمه

نفت و گاز طبیعی حداقل تا یکصد سال آینده به عنوان عمده ترین منابع انرژی در جهان باقی خواهند ماند. ایران به عنوان کشوری که بیش از ۱۰٪ از مخازن نفت دنیا را دارا می باشد، از نقش مهمی در تامین انرژی جهانی برخوردار است(Parnian, 2007).

امروزه نفت حیاتی ترین منبع انرژی و یکی از اصلی ترین عوامل گرداننده اقتصاد دنیاست (Zargari ,2009). از طرفی با افزایش جمعیت در سطح دنیا و صنعتی شدن بیشتر کشورهای در حال توسعه و در مقابل کاهش کشورهای صادر کننده نفت در دنیا، تلاش برای استحصال هر چه بیشتر نفت از درون مخازن نفتی امری کاملاً ضروری به نظر می رسد. فناوری امروزی تولید نفت تنها قادر به استحصال کمتر از نیمی از نفت موجود در مخازن می باشد.

مراحل مختلف تولید از مخزن به صورت معمول به سه دسته تقسیم می شود:

۱- بازیافت اول[1]

۲- بازیافت دوم[2]

۳- بازیافت سوم[3]

پس از اکتشاف یک مخزن نفتی، با حفر چاه، آب و نفت مخزن به دلیل اختلاف فشار درون مخزن نسبت به سطح به خارج منتقل می شوند. با کاهش فشار مخزن از پمپ به منظور استخراج هر چه بیشتر نفت بهره گرفته می شود. این مرحله بازیافت اولیه نامیده می شود. پس از این مرحله برای ادامه یافتن استخراج به اعمال انرژی بیشتر نیاز است. به این منظور آب های سطحی، آب دریا و یا آب شور موجود در ساختارهای زیر زمینی به درون مخزن تزریق می

[1] First oil recovery
[2] Secondary oil recovery
[3] Tertiary oil recovery

شوند تا نفت موجود را به سمت محل های استخراج هدایت کنند. این مرحله بازیافت دوم نامیده می شود (Youssef, 2009). در این مرحله علاوه بر سیلاب زنی با آب، تزریق گاز نیز به منظور تامین فشار مخزن مورد استفاده قرار می گیرد (Green and Willhite 1998). طی این دو مرحله ازدیاد برداشت، تنها یک دوم تا یک سوم از کل نفت موجود در مخازن قابل بازیافت هستند و مابقی به عنوان نفت بر جای مانده[1] درون مخزن باقی می مانند. این بدین معناست که در مقابل استخراج حجمی برابر با یک تریلیون بشکه از نفت خام طی ازدیاد برداشت اولیه و ثانویه، حجم ۲ تا ۴ تریلیون بشکه از آن هنوز در مخازن باقی می ماند(Zhang,2010). از این رو، بازیافت درصد کمی از نفت برجای مانده به دلیل حجم زیاد آن از لحاظ اقتصادی بسیار با ارزش است. روشهای ازدیاد برداشت نفت به این منظور از سالیان قبل مورد استفاده قرار گرفته اند. این مرحله، بازیافت سوم نیز نامیده می شود.

ازدیاد برداشت در مراحل اول و دوم باعث بازیافت حدود ۶۰٪ از نفت درون مخزن می شود. بنابراین استفاده از روشهای سوم تولید نفت برای استحصال درصدی از نفت باقی مانده پس از مراحل اول و دوم اهمیت خاصی پیدا می کند. روشهای مختلف سوم به عنوان روشهای ازدیاد برداشت[2] معروف می باشند (Zargari ,2009). یکی از روش های ازدیاد برداشت، روش سیلاب زنی میکروبی یا MEOR[3] است که به دلیل دارا بودن ویژگی های منحصر بفرد، جایگزین مناسبی برای روشهای متداول ازدیاد برداشت محسوب می شود. در این روش که شامل تزریق محلولی از میکرو اورگانیسم ها و ماده مغذی برای آنها مانند ملاس به مخزن نفتی است، میکرو اورگانیسم ها با استفاده از ماده مغذی و بر اساس متابولیسمی که دارند محصولاتی شامل اسید ها، بیوسورفکتانت (مواد کاهش دهنده کشش سطحی زیستی) و همچنین گازهایی خاص مانند هیدروژن و دی اکسید کربن تولید می کنند. این محصولات روی نفت موجود در محل به روش های مختلفی اثر می گذارند و باعث حرکت آسان تر نفت به سمت چاه های خروجی می شوند (Soudmand Asli ,2005).

مزیت های اصلی این روش نسبت به روشهای متداول ازدیاد برداشت عبارتند از:

---

[1] Residual oil
[2] Enhanced Oil Recovery
[3] Microbial Enhanced Oil Recovery