

PEMENCILAN DAN PENCIRIAN BAKTERIA
DARI TELAGA MINYAK TEMPATAN UNTUK PENGHASILAN
ASID DAN PELARUT ORGANIK

S.HASILA HAMZAH

UNIVERSITI TEKNOLOGI MALAYSIA

PEMENCILAN DAN PENCIRIAN BAKTERIA
DARI TELAGA MINYAK TEMPATAN UNTUK PENGHASILAN
ASID DAN PELARUT ORGANIK

S.HASILA HAMZAH

Tesis ini disampaikan sebagai memenuhi
syarat penganugerahan
Ijazah Sarjana Sains (Biosains)

Fakulti Sains
Universiti Teknologi Malaysia

JANUARI 2009

*Kejayaan ini untuk dikongsi bersama;
Suami tercinta; SIDEK MUSTAKIM,
ayahnda bonda yang dikasihi; HAJI HAMZAH & HAJJAH RAGAYAH,
adik beradik serta keluarga mertua.*

PENGHARGAAN

Dengan Nama Allah Yang Maha Pemurah Lagi Maha Pengasih

Alhamdulillah... Atas rahmat dan kasih sayang-Nya yang memberikan saya kekuatan untuk menyiapkan tesis ini sekaligus mengakhiri perjuangan di peringkat ini.

Pertamanya, setinggi penghargaan buat penyelia, Prof. Madya Dr Madihah Md Salleh atas seliaan, perhatian, panduan, dan tunjuk ajarnya. Begitu juga dengan penyelia bersama, Prof. Madya Dr Zaharah Ibrahim yang juga banyak memberi perhatian, pengalaman dan sokongan terhadap saya selama ini. Dr Adibah dan Dr Rosli Illias turut terlibat selaku Penyelidik di dalam kumpulan Penyelidikan Bersama Petronas.

Terima kasih kepada pihak yang memberi peluang menyambung pengajian di peringkat ini iaitu, Pusat Pengajian Siswazah yang menyediakan Skim Biasiswa UTM-PTP selama empat semester dan Fakulti Sains yang menyediakan kemudahan dan ruang kerja bagi menjalankan penyelidikan di Makmal Penyelidikan 1, Jabatan Biologi. Tidak lupa kepada warga pengelola penyelidikan dari Petronas Research Scientific and Supply (PRSS) iaitu Dr Nazarudin, Ezrin Johanna dan Khor Siak Foo yang pembekalkan sampel kajian serta Badan Perunding Projek iaitu Dr Scott Bailey, Micro-Bac (USA) Inc. dan Cham Soon Hoe, Micro-Bac (M) Sdn Bhd.

Kepada staf jabatan, Kak Timah, Kak Radiah dan Awang. Teman-teman seperjuangan di MP1 - Moon, Raha, Fareh, Azza dan Sue-N. Warga MP2 - Nda, Kak Pah, Mai, En. Fathul; Makmal Mikrob - Daddy, Kak Iza, dan Firdaus. Tidak lupa kawan-kawan yang lain yang telah memberi sokongan –Yat, Esah, Aslizah, Azreen, Wani, Wawa, Chong, Hong Jing, Onn dan kawan-kawan di Makmal Bioproses, FKKS. Terima kasih semua atas sokongan, bantuan dan kenangan bersama dalam mewarnai perjalanan hidup ini.

Akhir sekali dengan sepenuh hati, terima kasih kepada keluarga, terutama mak dan apak yang tidak jemu menanti kejayaan anaknya ini. Kak Ina dan Kak Liza dan Humaini sekeluarga, Hushaimi dan keluarga mertua serta suami tercinta yang sabar dan banyak memberi sokongan moral dan material. Hanya Allah dapat membalasnya!

ABSTRAK

Empat puluh lima bakteria termofilik berjaya dipencil daripada sampel air-minyak telaga minyak petroleum Malaysia menggunakan enam jenis media berbeza pada julat suhu antara 50 hingga 100°C dalam keadaan anaerobik lampau. Pemencilan bakteria yang berpotensi sebagai penghasil asid dan pelarut organik dilakukan menggunakan kaedah piring perataan, gulingan botol dan goncangan agar. Enam belas bakteria yang mempunyai kestabilan yang tinggi dipilih dan disaring untuk penghasilan asid organik, pelarut organik, gas dan biosurfaktan. Bakteria B160 yang dipencil daripada telaga Baram G85L merupakan penghasil terbaik asid dan pelarut organik. Pencirian bakteria B160 menggunakan kaedah jujukan 16S rDNA menunjukkan bakteria ini mempunyai 99% persamaan dengan *Bacillus licheniformis*. Penghasilan asid dan pelarut organik oleh *Bacillus licheniformis* B160 dilakukan menggunakan kultur sekelompok secara pegun di dalam botol Schott terubahsuai. Media dibekalkan dengan 30 g/L sukrosa menghasilkan asid (asid asetik, asid butirik) dan pelarut organik (aseton, butanol dan etanol) masing-masing pada kepekatan 1.030 g/L dan 2.290 g/L. Walaubagaimanapun, media yang dibekalkan dengan glukosa pada kepekatan yang sama dapat menghasilkan 1.3 kali lebih tinggi jumlah asid tetapi 1.2 kali lebih rendah jumlah pelarut tanpa penghasilan butanol. Media berasaskan kanji juga boleh digunakan sebagai substrat bagi penghasilan asid dan pelarut organik tetapi tidak memberi hasil yang memuaskan bagi kedua-duanya. Hasil mendapati hanya kanji terlarut dapat menghasilkan asid asetik dan aseton masing-masing pada kepekatan 0.004 g/L dan 2.14 g/L. Substrat kanji lain seperti kentang, sagu dan ubi kayu tidak berkesan dalam penghasilan asid dan pelarut organik. Kesan kepekatan sukrosa pada julat 10–100 g/L juga dikaji. Pada kepekatan melebihi 30 g/L, substrat digunakan untuk penghasilan sel ($Y_{x/s}$) berbanding pembentukan pelarut organik ($Y_{p/s}$), dimana hasil sel ($Y_{x/s}$) adalah 1-2 kali ganda lebih tinggi berbanding pembentukan pelarut organik per gram substrat ($Y_{p/s}$). Pada kepekatan sukrosa yang lebih rendah (10–30 g/L), nilai $Y_{p/s}$ adalah 1.6 kali lebih tinggi daripada $Y_{x/s}$. Hasil menunjukkan bahawa penghasilan pelarut organik amat menggalakkan pada kepekatan sukrosa kurang daripada 50 g/L. Kesan penggunaan sumber nitrogen organik dan tak organik turut dikaji. Sumber nitrogen organik menghasilkan jumlah pelarut yang lebih tinggi berbanding penggunaan sumber tak organik dan campuran antara kedua-duanya. Penghasilan pelarut di dalam media yang dibekalkan dengan 0.3% (j/i) pepton adalah 2 kali ganda lebih tinggi daripada ekstrak daging dan nitrogen tak organik. Penghasilan pelarut di dalam media dengan campuran sumber nitrogen adalah 4-19 kali lebih rendah berbanding pepton (5.017 g/L). Nisbah C:N yang tinggi diperlukan untuk penghasilan biomas dan pelarut organik. Jumlah tertinggi pelarut diperolehi pada nisbah C:N 44.55. Apabila C:N melebihi nisbah 44.55, jumlah biomas meningkat tetapi sebaliknya bagi penghasilan pelarut organik. Media pada pH awal 7.0 menghasilkan jumlah kepekatan asid dan pelarut organik tertinggi (7.504 g/L). Pada pH kurang daripada 5.5, penghasilan biomas terencat, sekaligus merendahkan penghasilan asid dan pelarut organik. Fenomena yang sama turut berlaku pada pH 8.0.

ABSTRACT

A total of forty five thermophilic bacteria were successfully isolated from water-oil samples of Malaysia petroleum reservoir using six different types of medium at temperature ranging from 50 to 100°C under strict anaerobic condition. Isolation of potential solvent and acid producer bacteria was performed using spread plate, rolling bottle and shake agar techniques. Sixteen bacteria with high stability were chosen and screened for their capability in producing organic acid, solvent, gas and biosurfactant. Bacteria B160 which isolated from Baram G85L reservoir was the best producer for acid and solvent. Characterization of bacteria B160 using 16S rDNA sequencing showed this strain has 99% similarity with *Bacillus licheniformis*. Production of organic acid and solvent production by *Bacillus licheniformis* B160 was conducted in static batch culture using modified Schott bottle. Medium supplemented with 30 g/L of sucrose produced total concentration of acids (acetic, butyric) and solvents (acetone, butanol, and ethanol) at 1.030 g/L and 2.290 g/L respectively. However, medium supplemented with similar concentration of glucose produced 1.3 fold higher acid and 1.2 times lower solvent without butanol. Starchy based materials can also be used as a substrate for acid and solvent production but it does not give a great impact for the enhancement of both products. Approximately only soluble starch produced acetic acid and acetone at concentration of 0.004 g/L and 2.140 g/L, respectively. Starchy materials such as potato, sago and tapioca did give significant effect towards solvent and acid productions. The effect of sucrose on acid and solvent was studied at the range of 10–100 g/L. Sucrose concentration more than 30 g/L favors for cells yield ($Y_{x/s}$), rather than solvent formation ($Y_{p/s}$). Yield of cells ($Y_{x/s}$) at sucrose concentration higher than 30 g/L was comparatively 1-2 times higher than solvent formation per gram of substrate ($Y_{p/s}$). At low concentration of sucrose (10-30g/L), $Y_{p/s}$ was 1.6 times higher than $Y_{x/s}$. Sucrose concentration below than 50 g/L was more suitable for enhancement of solvent production. Acid and solvent production preferred organic nitrogen sources rather than inorganic and mixture of both nitrogen sources. Solvent production in medium supplemented with 0.3% (w/v) peptone was comparatively 2 times higher than meat extract and inorganic nitrogen. Solvent production in medium using mixture of nitrogen sources was 4-19 times lower than peptone (5.017 g/L). High C:N ratio was needed for enhancement of biomass and solvent production. The highest solvent production was observed at C:N ratio 44.55. When the C:N ratio increased beyond 44.55, total biomass increased but not for solvent production. Medium with initial pH 7 produced the highest concentration of total acid and solvent (7.504 g/L). At pH lower than 5.5 biomass productions were inhibited, thus decreased total acid and solvent production. Similar phenomena occurred when initial pH 8.0 was used.

KANDUNGAN

BAB	TAJUK	MUKA SURAT
	TAJUK TESIS	i
	DEKLARASI	ii
	DEDIKASI	iii
	PENGHARGAAN	iv
	ABSTRAK	v
	ABSTRACT	vi
	KANDUNGAN	vii
	SENARAI JADUAL	xiv
	SENARAI RAJAH	xvi
	SENARAI SIMBOL / SINGKATAN	xviii
	SENARAI APENDIKS	xix
1	PENGENALAN	
	1.0 Pendahuluan	1
	1.1 Objektif Kajian	3
2	KAJIAN LITERASI	
	2.0 Pengenalan	4
	2.1 Mikroorganisma	7
	2.1.1 Konsep Pemilihan Mikrob	9
	2.1.2 Kaedah Penyaringan	9
	2.1.3 Aplikasi Teknik	10
	2.2 Produk Biologi dan Fungsinya dalam MEOR	12

2.3	Penghasilan Asid dan Pelarut Organik	14
2.3.1	Regulasi Produk	16
2.3.2	Bakteria Penghasil Asid dan Pelarut Organik	17
2.3.3	Pengoptimuman Produk	20
2.3.3.1	Substrat	20
2.3.3.2	Nitrogen	21
2.3.3.3	pH	22
2.4	Aplikasi Teknik MEOR	22
2.5	Pencirian Melalui Kaedah Molekular	24
2.5.1	Prinsip Asas Elektroforesis Gel	25
2.5.2	Prinsip Asas Tindakbalas Berantai Polimerase (PCR)	25
2.6	Kesimpulan	26
3	BAHAN DAN KAEDAH UMUM	
3.0	Pengenalan	27
3.1	Sampel	29
3.1.1	Analisis Kimia	29
3.2	Penyediaan Medium	30
3.2.1	Medium Kaldu	30
3.2.2	Medium Agar	30
3.2.3	Larutan Vitamin dan Surih Mineral	31
3.3	Konsep Teknik Hungate	31
3.3.1	Teknik Gulingan Botol	32
3.3.2	Kaedah Goncangan Agar	33
3.3.2	Kaedah Plat Perataan	34
3.4	Pemencilan Mikroorganisma	34
3.5	Penyaringan produk berpotensi untuk MEOR	35
3.5.1	Gas	35
3.5.2	Biosurfaktan	35
3.5.3	Asid dan Pelarut Organik	36
3.6	Penyimpanan Mikrob	37
3.6.1	Penyimpanan Jangka Panjang	37

3.6.2	Penyimpanan Jangka Pendek	38
3.7	Penyediaan Inokulum	38
3.8	Analisis	39
3.8.1	Prosedur Pewarnaan Gram dan Spora	39
3.8.2	Berat Kering Sel	39
3.8.3	Pengesanan Gula Penurun	40
3.8.4	Pengesanan Gula Bukan Penurun	40
3.8.5	Pengesanan Kanji	41
3.9	Pencirian Bakteria	41
3.9.1	Analisis 16S rDNA	41
3.9.1.1	Pengekstrakkan Genomik	42
3.9.1.2	Elektroforesis Gel Agaros	43
3.9.1.3	Tindakbalas Berantai Polimerase (PCR)	44
3.9.1.4	Penjjukan DNA	47
3.9.1.5	Analisis Homologi	47
4	PERSAMPELAN DAN ANALISIS SAMPEL	
4.0	Pengenalan	48
4.1	Bahan dan Kaedah	49
4.1.1	Penyediaan Radas untuk Persampelan	50
4.1.2	Proses Persampelan	51
4.1.3	Analisis Sampel	52
4.2	Hasil dan Perbincangan	52
4.2.1	Fisiologi Telaga Minyak	52
4.2.2	Analisis Logam	54
4.2.2.1	Analisis Asid Bebas	59
4.3	Kesimpulan	62
5	PEMENCILAN DAN PENCIRIAN BAKTERIA DARIPADA TELAGA MINYAK TEMPATAN	
5.0	Pengenalan	63
5.1	Bahan dan Kaedah	65
5.1.1	Penyediaan Media Pengkulturan	66

5.1.2	Teknik Hungate	66
5.1.3	Pemencilan Mikroorganisma	67
5.1.4	Penyaringan Produk	67
5.1.5	Pencirian Morfologi	68
	5.1.5.1 Morfologi Koloni	68
	5.1.5.2 Morfologi Sel	68
5.1.6	Analisis Filogenetik	68
5.2	Hasil dan Perbincangan	69
5.2.1	Pemencilan Mikrob	69
5.2.2	Penyaringan Gas, Surfaktan, Asid dan Pelarut Organik	76
5.2.3	Pemilihan Mikrob	80
5.2.4	Pencirian Mikrob	81
5.3	Kesimpulan	85
6	PENGHASILAN ASID DAN PELARUT ORGANIK DALAM KULTUR SEKELOMPOK	
6.0	Pendahuluan	86
6.1	Bahan dan Kaedah	87
	6.1.1 Mikroorganisma	87
	6.1.2 Media	88
	6.1.3 Fermentasi	88
	6.1.4 Analisis Sampel	89
6.2	Hasil dan Perbincangan	89
	6.2.1 Kesan Sumber Karbon Berbeza	89
	6.2.2 Kesan Kepekatan Sukrosa Berbeza	95
	6.2.3 Kesan Penggunaan Sumber Nitrogen Berbeza	97
	6.2.4 Kesan pH Awal Kultur	101
6.3	Kesimpulan	104
7	KESIMPULAN	
7.0	Kesimpulan Umum	105
7.1	Cadangan	106

RUJUKAN	107
APENDIKS	121

SENARAI JADUAL

NO. JADUAL	TAJUK	MUKA SURAT
2.1	Kaedah-kaedah yang terlibat di dalam proses pengeluaran minyak.	6
2.2	Pengkelasan bakteria berpotensi dalam proses perolehan semula minyak.	8
2.3	Konsep di dalam Teknik Hungate.	11
2.4	Produk-produk mikrobiologi yang berpotensi dalam aplikasi perolehan semula minyak.	13
2.5	Senarai beberapa <i>Clostridium sp.</i> yang digunakan dalam kajian penghasilan asid organik dan pelarut organik.	18
2.6	Senarai bakteria bukan <i>Clostridium sp.</i> yang pernah digunakan dalam kajian fermentasi asid organik dan pelarut organik.	19
2.7	Kejayaan siri aplikasi teknologi MEOR di lapangan sebenar oleh beberapa buah negara.	23
3.1	Pencetus universal untuk amplifikasi PCR.	45
3.2	Peringkat-peringkat dalam proses tindakbalas berantai polimerase (PCR).	45
4.1	Keputusan ujian analisis pelbagai jenis ion dan logam yang sering dikesan dalam sampel air telaga minyak.	56
4.2	Asid bebas yang dikesan terkandung dalam sampel air telaga minyak tempatan.	61
5.1	Pemerhatian ke atas kultur pengkayaan pada suhu 80°C	70
5.2	Pemerhatian ke atas kultur pengkayaan pada suhu 70°C	71

5.3	Pemerhatian ke atas kultur pengkayaan pada suhu 60°C.	72
5.4	Pemerhatian ke atas kultur pengkayaan pada suhu 50°C.	73
5.5	Pencirian kultur tulen yang berjaya dipencil daripada telaga minyak Malaysia pada suhu 50°C	74
5.6	Hasil penyaringan yang diperolehi daripada kultur tulen yang dipencil daripada telaga minyak Malaysia	77
5.7	Senarai bakteria yang berpotensi untuk aplikasi MEOR	80
6.1	Penghasilan asid dan pelarut organik melalui fermentasi secara terus oleh <i>B. licheniformis</i> B160 menggunakan kepelbagai sumber karbon pada kepekatan 30g/L	91
6.2	Penghasilan asid dan pelarut organik oleh <i>B. licheniformis</i> B160 melalui fermentasi terhadap sukrosa pada kepekatan yang berbeza	96
6.3	Penghasilan asid dan pelarut organik melalui fermentasi sukrosa (30 g/L) oleh <i>B. licheniformis</i> B160 menggunakan pelbagai sumber nitrogen	98
6.4	Kesan pH awal kultur terhadap fermentasi sukrosa oleh <i>B. licheniformis</i> B160 bagi penghasilan asid dan pelarut organik.	102

SENARAI RAJAH

NO. RAJAH	TAJUK	MUKA SURAT
2.1	Biosintesis penghasilan beberapa produk MEOR (di dalam petak) terhadap glukosa oleh bakteria.	15
3.1	Rekabentuk umum kajian bagi kajian pemencilan dan penyaringan bakteria daripada telaga minyak tempatan untuk penghasilan asid dan pelarut organik.	28
3.2	Sistem nyahgas.	33
4.1	Rekabentuk kajian persampelan dan analisis sampel	50
5.1	Rekabentuk kajian bagi pemencilan dan pencirian bakteria daripada telaga minyak tempatan	65
5.2	Peratusan kultur tulen yang diperolehi berdasarkan telaga minyak	76
5.3	Hasil elektroforesis gel agaros bagi pemencilan genomik DNA Baram 160.	82
5.4	Hasil elektroforesis gel agaros bagi amplifikasi produk PCR.	83
5.5	Koloni tunggal di atas media pertumbuhan pepejal RGM1	84
5.6	Morfologi sel bagi <i>B. licheniformis</i> B160 di bawah mikroskop imbasan elektron (SEM) dengan pembesaran 5000X	85
6.1	Graf durasi masa bagi penghasilan asid dan pelarut organik di dalam media sukrosa pada kepekatan 30 g/L.	94

- 6.2 Graf durasi masa bagi penghasilan asid dan pelarut organik di dalam media sukrosa yang dibekalkan dengan sumber nitrogen organik (pepton) pada pH 7.0. 100

SENARAI SIMBOL / SINGKATAN

AAS	-	Atomic Absorption Spectroscopy
DNA	-	asid deoksiribonukleik
EDTA	-	asid etilenediamina tetrasetik
et al.	-	et alii (dan lain-lain)
H ₂ O ₂	-	hidrogen peroksida
H ₂ SO ₄	-	asid sulfurik
HCl	-	asid hidroklorik
g/L	-	gram per Liter
mM	-	milliMolar
NaOH	-	natrium hidroksida
nm	-	nanometer
OD	-	optical density
ppm	-	bahagian per juta
RNA	-	asid ribonukleik
PCR	-	tindak balas berantai polimerase
rpm	-	pusingan per minit
SEM	-	Scanning Electron Microscopy
i/i	-	isipadu per isipadu
j/i	-	jisim per isipadu
μM	-	micrometer
°C	-	darjah Celsius

SENARAI APENDIKS

APENDIKS	TAJUK	MUKA SURAT
A	Media Pertumbuhan.	121
B	Larutan Vitamin dan Surih Mineral.	124
C	Keluk Piawai.	126
D	Maklumat Persampelan.	129
E	Maklumat Fizikal Telaga Minyak Tempatan.	135
F	Kromatogram Penyaringan Asid dan Pelarut Organik	136
G	Hasil Blast Bagi Bakteria B160.	140
H	Pengiraan Nisbah Karbon-Nirogen (C/N).	143

BAB 1

PENGENALAN

1.0 Pendahuluan

Pengurangan bekalan sumber tenaga tanpa pembaharuan di masa hadapan yang bergantung kepada minyak mentah menjadikan kos bahan tersebut meningkat dari masa ke semasa dan menyedarkan masyarakat dunia untuk mencari sumber baru yang lebih murah dan mudah didapati secara berterusan. Dalam pada masa yang sama, bagi memenuhi pasaran semasa, usaha turut dijalankan bagi meningkatkan pengeluaran minyak mentah yang masih terperangkap di dalam telaga minyak kerana kelemahan kaedah sedia ada yang digunakan. Kemajuan bidang bioteknologi memperkenalkan kaedah yang mesra alam menggunakan mikroorganisma untuk memaksimumkan pengeluaran minyak mentah. Kaedah ini dipanggil '*Microbial Enhanced Oil Recovery*' atau MEOR.

Melalui penggunaan kaedah ini, bakteria yang disuntik ke dalam telaga minyak bersama bekalan nutrien, diberi tempoh pertumbuhan disamping menjalankan metabolisma untuk menghasilkan produk biokimia secara *in-situ* bagi mengaruh proses pengeluaran minyak. Produk biokimia yang dimaksudkan boleh terdiri daripada gas, biosurfaktan, biopolimer, asid dan pelarut organik. Gas memberi tekanan untuk menolak minyak keluar, sementara biosurfaktan, biopolimer, asid dan pelarut organik berfungsi

sebagai agen pelarut atau '*emulsifier*' untuk mengeluarkan sisa minyak yang masih terperangkap di dalam rongga struktur telaga minyak dengan merendahkan kelikatan dan meningkatkan kadar alir minyak, sekaligus memudahkan pergerakan keluar minyak ke telaga pengeluar (Khire dan Khan, 1994).

Kajian dan aplikasi lapangan menggunakan kaedah MEOR telah mula digunakan sejak 1940-an. Antara stren yang berjaya digunakan adalah daripada spesis *Bacillus licheniformis*. Sebahagian besar spesis ini bersifat fakultatif anaerobik, termofilik dan berbentuk rod serta mengandungi spora. Kejayaan dalam kaedah ini banyak bergantung kepada daya ketahanan bakteria yang digunakan terhadap persekitaran fizikal yang ekstrem di dalam telaga minyak. Justeru, pemilihan sumber mikrob adalah penting dalam kajian seumpama ini dan penyelesaian terbaik adalah mendapatkan bakteria indigenus, iaitu melakukan proses pemencilan bakteria daripada sampel yang diambil dari telaga minyak.

Pelarut organik seperti aseton, butanol dan etanol telah digunakan dengan meluas dalam industri kimia, getah, pertanian, kosmetik dan perubatan. Terkini ia turut membantu dalam industri petroleum. Pengeluarannya di buat menerusi fermentasi glukosa oleh bakteria. Spesis yang popular digunakan dalam fermentasi asid dan pelarut organik adalah daripada spesis *Clostridium*. Di kalangan spesis ini pula, *C. acetobutylicum* adalah paling popular digunakan sejak perang dunia I dan II. Perkembangan dalam teknologi mikrobiologi dan bioteknologi membuka ruang kepada penerokaan baru terhadap pencarian dalam mempelbagaikan strain yang lebih baik. Selain *Clostridium sp.*, fungi (*Aspergillus niger*) dan yis (*Saccharomyces sp.* dan *Candida sp.*) turut digunakan dalam fermentasi asid organik dan pelarut manakala dari jenis bakteria bukan *Clostridia* pula terdiri daripada *Zymomonas sp.* dan *Bacillus sp.* Kajian fermentasi asid dan pelarut organik yang meluas menggunakan spesis *Clostridia* ini menjadi panduan dalam kajian fermentasi asid dan pelarut organik oleh bakteria yang dipencil dari telaga minyak untuk aplikasi MEOR.

1.1 Objektif Kajian

Penggunaan mikrob dalam teknologi perolehan semula minyak untuk meningkatkan pengeluaran minyak mentah negara masih belum diaplikasikan sepenuhnya. Ini kerana kaedah konvensional seperti penggunaan bahan kimia masih diamalkan dan kebergantungan kepada sumber luar seperti surfaktan yang melibatkan kos yang tinggi. Melalui kajian ini, diharap usaha ke arah aplikasi bioteknologi moden dapat dimulakan untuk menyumbang kepada ekonomi negara. Beberapa objektif yang terlibat dalam kajian ini digariskan seperti berikut;

1. Mengenalpasti komposisi kimia seperti ion-ion logam, bahan organik dan asid lemak yang terkandung di dalam sampel minyak-air.
2. Memencil, menyaring dan mengenalpasti bakteria yang berpotensi untuk teknologi MEOR.
3. Mengkaji penghasilan asid dan pelarut organik oleh kultur terpilih.

RUJUKAN

- Alcomo I. E. (1997). *Study Guide to Accompany Fundamentals of Microbiology*. 5th Edition. Canada: The Benjamin/Cummings Publishing Company.
- Altintas M. M., Kutlu Ö. Ülgen, Betül Kirdar Z. Ilse Önsan, dan Stephen G. Oliver (2002) Improvement of ethanol production from starch by recombinant yeast through manipulation of environmental factors. *Enzyme and Microbial Technology*, 31: 640-647
- Anderson D. L., Sarver A. Q. dan Chin Y. H. (1986). Preliminary Studies Leading to Microbial Enhanced Oil Recovery. *Society of Petroleum Engineers SPE15155*
- Arbakariya A., Rosfarizan M., Suraini A. A. dan Raha A. R. (2005). Sago starch as a green fermentation feedstock for solvent (acetone-butanol-ethanol) production. *R&D Bulletin*, Faculty of Biotechnology and Biomolecular Science. 1: 6-11.
- Assobhei O., El Kanouni A., Ismaili M., Loutfi M, dan Petitdemange H. (1998). Effect of acetic and butyric acid on the stability of solvent and spore formation by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 during repeated subculturing. *Fermentation and Bioengineering*. 85 (2): 209-212.
- Balch W. E., Scherberth S., Tanner R. S. dan Wolfe R. S., (1977). *Acetobacterium*, A new genus of hydrogen-oxidizing, carbondioxide reducing, anaerobic bacteria. *International Journal System Bacteriology*. 27: 355
- Ballongue J., Amine J., Masion E., Petitdemange H., dan Gay R. (1985). Induction of acetoacetate decarboxylase in *Clostridium acetobutylicum*. *Microbiology Letter* 29: 273-277
- Banat I. M. (1995). Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. *Bioresource Technology*. 51:1-12

- Bangkong S., dan M. Ali S. (2003). Further evaluation of Microbial Treatment Technology for improved oil production in Bokor field, Sarawak. *Society of Petroleum Engineer SPE* 84867.
- Bart T. dan Riis M. (1992). Interaction between organic acids anions in formation waters and reservoir mineral phases. *Organic Geochemicals*. 19: 455-482
- Barth T. dan Bjerlykke A. (1993). Organic acids from source rock maturation: generation potentials, transport mechanisms and relevance for mineral diagenesis. *Applied Geochemicals*. 8: 325-337.
- Bernard F. P., Connan J., Aquitaine E., Magot M dan Sanofi E. B. (1992). Indigenous microorganisms in connate water of many oil fields. A new tool in exploration and production technique. *Annual Technical conference and exhibition of the society of petroleum engineers*. Washington DC USA 467-476.
- Bodour A. A., dan Miller-Maier R. M. (1998). Application of a modified drop-collapsing technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Microbiological Methods*. 32: 273-280
- Brosseau J. D., Jwo-Yee Yan dan K. Victor Lo. (1986). The relationship Between Hydrogen Gas and Butanol Production by *Clostridium Saccharoperbutylacetonicum*. *Biotechnology and Bioengineering*. 28: 305-310
- Brown Lewis, Rebecca Bryant, Cliff Mark, James Stephens, Alex Vadie dan Larry Zickefoose (1999) Microbial options for Increasing oil recovery. Technology Connections Petroleum Technology Council.
- Bryant R. S. (1989). Laboratory and field studies on microbially enhanced oil recovery. *Development in Industrial Microbiology*. 30: 255-267
- Bubela B. (1987). A comparison of Strategies for Enhanced Oil Recovery Using in situ and extra situm Produced Biosurfactants. In: Biosurfactants and Biotechnology. Ed: Naim Kosaric, W. L. Cairns, Neil C. C. Gray, Marcel Dekker, Inc. USA
- Buday Z., J. C. Linden dan M. N. Karim. (1990). Improved Acetone-Butanol fermentation analysis using subambient HPLC column Temperature. *Enzyme Microbiological Technology*. 12: 24-27.
- Byung Hong Kim, Para Bellows, Rathin Datta dan J. G. Zeikus. (1984). Control of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* fermentations: utilization of carbon monoxide to inhibit hydrogen production and to enhanced butanol yields. *Applied Environmental Microbiology*. 48(4): 764-770

- Caldwell D. R. (1995). *Microbial Physiology and Metabolism*. W.m C. Brown Communications, Inc.
- Campos E. J., Qureshi N., dan Blaschek H. P. (2005). Production of Acetone butanol ethanol from degermed corn using *Clostridium beijerinckii* BA101. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 98:553-561
- Casida L. E., Jr (1968). *Industrial Microbiology*. Wiley Eastern Limited, New Delhi India. 55-75
- Catherine Bass dan Hilary Lappin-Scott. (1997). The Bad Guys and Good Guys in Petroleum Microbiology. *Oilfield Review*, Spring. 17-25
- Collins A. G. (1975). *Development in Petroleum Science 1, Geochemistry of Oilfield Waters*. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.
- Collins A. G. dan Wright C. C. (1985). Enhanced Oil Recovery Injection Waters, In: *Enhanced Oil Recovery, 1: Fundamentals and Analyses*, New York: Elsevier Science Publishing Company Inc. 151-221
- Collins C. H. dan Patricia M. Lyne. (1976). *Microbiological Methods*. Butterworth & Co.
- Compere A. L. dan Griffith W. L. (1979). Evaluation of substrate for butanol production. *Development Industrial Microbiology* 20:509-517
- Cooper, D. G. (1986). Biosurfactant. *Microbiological Sciences*. 3: 145-149
- Cote R. J. dan Gherna R L (1994). *Nutrition and Media*. In: Phillip Gerhardt, R G E Murray, Willis A Wood and Noel R Krieg. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Ed: Phillip Gerhardt, R. G. E. Murray, Willis A. Wood and Noel R Krieg Washington, D C, American Society for Microbiology. 155-178
- Davidson S. W. dan Russel H. H., (1998). A MEOR Pilot Plant Test in the Loco Field. In: *Proceeding of Symposium on Application of Microorganisms to Petroleum Technology. Bartlesville*, Ed: T. E. Burchfield and S. Bryant, August, 12-13 1987, Bartsville Project Office, US. DOE, OK, VII 1-VII 12
- Davydova-Charakh'yan, Kuznetsova V. G., Mityushina L. L. dan Belyaer S. S. (1993). Methane forming bacilli from oil field and tataria and Western Siberia. *Microbial Microbiology*. 61(2): 299 – 305
- Detroy R. W. (1981). Bioconversion of agricultural biomass to organic chemicals, in Goldstein I. S., CRC Press Inc. Florida. 19-44.

- Dewitt J. P., Jackson J. V. dan Paulus T. J. (1989). Actinomycetes. In: Fermentation Process Development of Industrial Organisms. Ed: Justin O Neway. Marcel Dekker Inc NY & Basel. 1-72.
- Donaldson E. C., George V. Chilingarian dan Teh Fu Yen (1989). Introduction: The Need for Microbial Enhanced Oil Recovery. In: *Microbial Enhanced Oil Recovery*. Ed: Erle C. Donaldson, George V. Chilingarian and Teh Fu Yen. *Microbial Enhanced Oil Recovery* New York, Elsevier Science Publishers B V. 1-15
- Dostalek M. dan Spurny M., (1968). *Folia Biology*. 4: 166
- Driessen F. M., (1981). Protocooperation of Yogurt Bacteria in Continuous Culture. In: Mixed Culture Fermentation. Ed: Bushell M E and Slater J. H. London, Academy Press. 99-120
- Ehrlich H. L. (1997). Microbes and metal. *Applied Microbiology Biotechnology*. 48: 687-692.
- Elander R. P. (2002). Penyaringan Mikrob, Pemilihan dan Pembaikan. *BioTeknologi Asas*. Penerjemah: Yusuf Abdul Hamid, Ibrahim Che Omar dan Darah Ibrahim. Penerbit USM Pulau Pinang. 202-216
- Ennis B. M., Gutierrez N. A., dan Maddox I. S. (1986). The Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation: A Current Assessment. *Process Biochemistry*. 21: 131-147.
- Evers R. H. (1972). Mixed-Media Filtration of Oily Wastewaters SPE 4216. In: *SPE Symposium on The Handling of Oilfield Waters*. Dec. 4-5, 1972. Los Angeles, California. American Institute of Mining, Metallurgical and Petroleum Engineers, Inc.
- Ezeji T. C., N. Qureshi, dan H. P. Blaschek. (2005). Continuous butanol fermentation and feed starch retrogradation butanol fermentation sustainability using *Clostridium beijerinckii* BA101. *Biotechnology*. 115: 179-187.
- Farida Habib Shah (1996). Asas Teknologi DNA Rekombinan. Kuala Lumpur, Dewan Bahasa dan Pustaka.
- Fermanek J., Roderick M. dan Hans P B. (1997). Enhanced butanol production by *Clostridium beijerinckii* BA101 grown in semi defined P2 medium containing 6 percent maltodextrin or glucose. *Applied Environmental Microbiology*. 63(6): 2306-2310
- Filbay R. H. (1975). *The Nature of Metals in Petroleum*. In: The Role of Trace Metals in Petroleum. Ed: Yen T. F. Ann Arbor Science Publishers Inc. Michigan. 31-58.

- Fond O., Matta-Ammouri G., Petitdemange H. dan, Engasser J. M. (1985). The role of acid on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum*. *Applied Microbiology Biotechnology* 22: 195-200
- Furati K. M. (1998). History effects on oil recovery efficiency. *Petroleum Science and Engineering*. 19:295-308.
- Gapes J. R., Swobo H., Haslinge dan Nimcevic D. (2000). The effect of heat-shocking on batch fermentation by *Clostridium beijerinckii* NRRL B592. *Applied Microbiology Biotechnology* 54: 118-120
- Gary E. Jenneman (1989). The potential for in-situ Microbial applications. In: *Microbial Enhanced Oil Recovery*. Ed: Erle C. Donaldson, George V. Chilingarian and The Teh Fu Yen. *Microbial Enhanced Oil Recovery*. The Netherland: Elsevier Science Publishers BV. 37-74
- Genta Kobayayashi, Koji Eto, Yukihiro Tashiro, Kenichi Okubo, Kenji Sonomoto dan Ayaaki Ishizaki (2005). Utilization of Excess Sludge by Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation Employing *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC13564). *Bioscience and Bioengineering*. 99(5): 517-519
- Ghazali, M Abd Karim dan Mat Ali Hj Salim (2001). Microbial enhanced oil recovery (MEOR) Technology in Bokor Field, Sarawak. *Society of Petroleum Engineer SPE* 72125
- Girbal L. dan Soucaille P. (1998). Regulation of solvent production in *Clostridium acetobutylicum*. Tibtech, Elsevier Science Ltd. Vol. 16.
- Gottwald M., Hippe H., dan Gottchalk J. C. (1984). Formation of n-butanol from D-Glucose by strains of *C. tetanomorphum* group. *Applied Environmental Microbiology*. 48(3): 573-576
- Groudeva V. I., Ivanova I. A., Groudav S. N., dan Uzunov G. G. (1993). *Biohydrometal. Technology Proceeding International Biohydrometal Symposium*. 2: 349-356.
- Gula M. M., Russel H. H., Janloo S. M. dan Conway T. (1991). Effects of sodium chloride on growth and metabolism on two strain of *Clostridium*. *Microbial Enhancement Oil Recovery – Recent Advance*. 31: 183-206
- Harrison P. M. dan Hoare R. J. (1980). *Metals in Biochemistry*. Chapman and Hall Ltd. USA
- Hitzman, D. O., (1983). Petroleum microbiology and the history of its role in enhanced oil recovery. *Proc. 1982 Int. Conf. Microbial Enhancement of Oil Recovery*. Ed: E. C.

- Donaldson and J. B. Clark. (Eds.) *Proc. 1982 International Conference Microbial Enhancement of Oil Recovery*, NTIS, Springfield, VA. 162-218
- Hodgson G. W. (1971) *Origin of Petroleum: Chemical Constraints*. In: *Origin and Refining of Petroleum*, Ed: Gould R. F. *Advances in Chemistry Series 103*, American Chemical Society Washington DC. 1-29
- Hungate R. E. (1969). A roll tube method for cultivation of strict an aerobic. In: *Methods in Microbiology*. Ed: Norris J R and Ribbons D W. London, Academy Press. 117-132
- Ibrahim Che Omar (1994). *Pengantar Mikrobiologi Industri*. Penerbit USM Pulau Pinang.
- Jain D. K., Thompson D. L. C., Lee H. dan Trevors J. T. (1991). A Drop-collapsing Test for Screening Surfactant-producing Microorganisms. *Microbiological Methods*. 13: 271-279
- Jang L. K. dan Yen T. F. (1990). Mechanisms of Microbial Enhanced Oil Recovery. In: *Microbial Enhanced Oil Recovery: Principle and Practice*. Ed: Yen T. F. Boca Raton CRC Press. 157-164
- Jeanton C., Anna-Louise Reysenbach, Stephane L'Haridon, Agata Gambacorta, Norman R. Pace, Philippe Glenat dan Daniel Prieur. (1995). *Thermotoga subterranea* sp. nov., a new thermophilic bacterium isolated from a continental oil reservoir. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 164: 91-97
- Jones D. T. dan Woods D. R. (1986). Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiology Review* 50: 484-524
- Karimi K., Brandberg T., Edebo L. dan Taherzadeh M. J. (2005). Fed-batch cultivation of *Muovindicus* in dilute-acid lignocellulosic hydrolysate for ethanol production. *Biotechnology Letters*. 27(28): 1395-1400
- Karp Gerald (1996). *Cell and Molecular Biology Concepts and Experiments*. John Wiley & Sons, Inc., USA
- Kemal Behlulgil, Tanju Mehmetoglu dan Sedat Donmez (1992). Application of Microbial Enhanced Oil Recovery Technique to A Turkish Heavy Oil. *Applied Microbiology Biotechnology*. 36: 833-835.
- Khire J. M. dan Khan M. I. (1994). Microbially Enhanced Oil Recovery (MEOR). Part I. Importance and Mechanism of MEOR. *Enzyme Microbial Technology*. 16: 170-172

- Kim B. H., Para Bellows, Rathin Datta dan J. G. Zeikus. (1984). Control of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* fermentations: utilization of carbon monoxide to inhibit hydrogen production and to enhanced butanol yields. *Applied and Environmental Microbiology*. 48(4): 764-770
- Kinghorn, Robert Richard Francis (1983). *An Introduction to the Physics and Chemistry of Petroleum*. John Wiley & Sons Ltd England.
- Kitahata S., Tsuyuma, N. dan Okada, S. (1973). Purification and Some Properties of Cyclodextrin Glycosyltransferase from a strain of *Bacillus* species. *Agro Biology Chemistry*. 38 (2): 387-393
- Klaus W. dan Arpe H. J. (1983). *Industrial Organic Chemistry*. 2nd revised and extended edition. VCH Publishers, Germany.
- Kosaric N., Wieczorek A., Cosentino G. P., Magee R. J. dan Prenosil J. E. (1983). *Ethanol Fermentation*. Verlag Chemie, Weinheim. 257-386
- Krouwel P. G., Groot W. J., Kossen N. W. F., dan Van der Laan, W. F. M. (1983). Continuous isopropanol-butanol-ethanol fermentation by immobilized *Clostridium beijerinckii* cell in a packed bed fermenter. *Enzyme Microbial Technology*, 5: 46-54
- Lazar I. (1983). Some Characteristics of the bacterial inoculum used for oil release from reservoirs. In: *Microbial Enhanced Oil Recovery*. Ed: J. E. Zajic, D. G. Cooper, T. R. Jack and N. Kosaric. PennWell Publishing Company, Tulsa Oklahoma. 73-82
- Lazăr I. dan Constantinescu P. (1985). Field Trial Results of Microbial Enhanced Oil Recovery, Microbes and Oil Recovery. *International Bioresources*. 1: 122-144
- Lazăr I., S. Dobrotă, M. C. Ștefănescu, I. Săndulescu, R. Păduraru dan M. C. Ștefănescu. (1992). MEOR, Recent field Trials in Romania. *Fourth International Microbial Enhanced Oil Recovery Conference*, Upton, Long Island, New York, Sept 8-11.
- Lazăr I., S. Dobrotă, M. Ștefănescu dan V. Velehorsch, (1991a). Microbial Enhancement of Oil Recovery. In: *Recent Advances*. Ed: E. C. Donaldson. Elsevier, Amsterdam, 347-364
- Lazăr I., S. Dobrotă, M. Ștefănescu, P. Constantinescu, C. Moroson, N. Botea dan O. Iliescu, (1991b). Microbial Enhancement of Oil Recovery. In: *Recent Advances*. Ed: E. C. Donaldson. Elsevier, Amsterdam, 365-386
- Lichaa, Ada dan Oppenheimer (1990). A Method to Determine the number of hydrocarbon degrading Bacteria in Microbial Enhanced Oil Recovery. In:

- Microbial Enhancement of oil recovery-recent advance*. Ed: E. C. Donaldson, Microbial Enhancement of oil recovery-recent advance. Oklahoma, USA, 1991
- Lico M. S., Yousif K Kharaka, William W. Carothers dan Victoria A. Wright (1982). Method for Collection and analysis of Geopressed Geothermal and oil Field Waters. Geological Survey Water – Supply Paper 2194, US Department of the Interior, USA.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. dan Parker, J. (2000). *Brock Biology of Microorganisms*. 9th Edition. Upper Sandle River. N. J.: Prentice-Hall.
- Madihah M. S., Ariff A. B., Rosfarizan M., Rosli A., Akmam F. H., Ghani B.A. dan Karim M. I. A. (1994). Study on microbes from several oil producing wells in Malaysia. UPM and Land General Bhd., 1-11
- Madihah M. S., Ariff A. B., Sahaid K. M, Suriani A. A. dan Karim M. I. A. (2001). Direct fermentation of gelatinized sago starch to acetone-butanol-ethanol by *Clostridium acetobutylicum*. *Microbiology and Biotechnology*. 17: 567-576
- Madihah, M. S. (2002). Direct Fermentation of Gelatinized Sago Starch to Sovent (Acetone-Butanol-Ethanol) by *Clostridium acetobutylicum* P262. Universiti Putra Malaysia: PhD Thesis. 75-76.
- Mansour S. Almalik (1996). Effect of interfacial tenstion and permeability damage on Oil recovery by bacteria TJOG. 2 (3): 31-41
- Margarita L., Miroshnichenko, Hans Hippe Erko Stackebrandt, Nadezhda A Kostrikina, Nikolai A. Chernyh, Christian Jeanthon Tamara N. Nazina, Sergei S. Belyanev dan Elizaveta A. Bonch-Osmolovskaya (2001). Isolation and characterization of *Thermococcus sibiricus* sp. Nov. from a Western Siberia high-temperature oil reservoir. *Extremophiles*. 5: 85-91.
- Maruo B. dan Yashikawa H. (1989). *Topics in secondary Metabolism 1. Bacillus subtilis: Molecular Biology and Industrial Application*. Elsevier Science Publisher BV Amsterdam.
- Marquis R. E. (1983). Barotolerance and microbial enhancement of oil recovery. *Microbial Enhanced Oil Recovery*. 8-3.
- Mathews C. K., K. E. van Holde dan Kevin G. Ahern (2000). *Biochemistry*. 3rd Edition. Benjamin/Cummings, San Francisco CA.
- McInerney M. J., Knapp R. M., Chisholm J. L., Bhupathiraju V. K. dan Coates J. D. (1999). Use of indigenou or injected microorganisms for enhanced oil recovery.

- Proceeding of the 8th international symposium on microbial ecology*. Halifax, Canada. 312-318.
- McNeil B. dan Kristiansen B. (1987). The effect of medium composition on the Acetone-Butanol Fermentation in continuous culture. *Biotechnology and Bioengineering*. 29: 383-387
- Miller T. L. dan Wolin M. J. (1974). A Serum Bottle Modification of the Hungate Technique for Cultivation Obligate Anaerobes. *Applied Microbiology*. 27(5): 985-987.
- Milner O. I. (1963). *Analysis of Petroleum for Trace Elements*. The McMillan Company, New York.
- Mollah H. dan Stuckey D. C. (1992). The influence of H₂, CO₂ and dilution rate on the continuous fermentation of acetone-butanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 37: 533-538
- Monot F., Jean-Rene M., Henri P. dan Robert G. (1982). Acetone and Butanol Production by *Clostridium acetobutylicum* in a synthetic medium. *Applied and Environmental Microbiology*. 44(6): 1318-1324.
- Monot F., Engasser J. M., dan Petitdemange H. (1984). Influence of pH and undissociated butyric acid on the production of acetone and butanol in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 19: 422-426
- Morris J. G. (1994). Obligate anaerobic bacteria in biotechnology. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 48: 75-99
- Morris J. G. (1986). Anaerobic Metabolism of Glucose. In: *Comprehensive Biotechnology, The Principle, Application and Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine*. Vol. 1 The Principle of Biotechnology: Scientific Fundamentals. Ed: Murray Moo-Young, Bull A. T., Dalton, H. Pergamon Press. 1: 357-378.
- Mueller R. F. dan Nielsen P. H. (1996). Characterization of thermophilic consortia from two souring oil reservoir. *Applied Environmental Microbiology*. 62: 3083-3087.
- Naomichi Nishio, Hano Biebl dan Marinus Meiners (1983). Effect of pH on the production of Acetone and Butanol by *Clostridium acetobutylicum* in a minimum Medium. *Fermentation Technology*. 61(1): 101-104

- Ohara H., Keiichiro Hiyama dan Toshiomi Yoshida. (1992). Kinetics of Growth and lactic acid production in continuous and batch culture. *Applied Microbiology Biotechnology*. 37: 544-548.
- Olliver B., Caumette P., Garcia J. L., dan Mah R. A. (1994). Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiology Review*. 58(1):27.
- Ooi Seok Wei (2001). Isolation and characterization of indigenous microorganisms in Malaysian oil fields. Thesis Ijazah Sarjana Kejuruteraan (Bioproses), Jabatan Bioproses, FKKS. Universiti Teknologi Malaysia.
- Ostroff A. G. (1972). Subsurface water – Tools for Petroleum Exploration. Society of Petroleum Engineers SPE 4225. In: *SPE Symposium on The Handling of Oilfield Waters*. Dec. 4-5, 1972. Los Angeles, California. American Institute of Mining, Metallurgical and Petroleum Engineers, Inc.
- Park C. H., Martin R. Okos dan Phillip C. Wankat. (1989). Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) Fermentation in an Immobilized Cell Trickle Bed Reactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 34: 18-29
- Patton C. C. (1977). *Oilfield Water Systems*. 2nd Edition. Campell Petroleum Series, Oklahoma.
- Portwood J. T. dan Hiebert F. K. (1992). Mixed Culture Microbial Enhanced Waterflood: Tertiary MEOR Case Study. *Society of Petroleum Engineer SPE 24820*.
- Pratt C. W. dan Cornely K. (2004). *Essential Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc.,
- Präve P., Faust U., Sittig W. dan Sukatsch D. A. (1987). *Basic Biotechnology, A Student's Guide*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim. 67-106
- Priest F. G. dan Sharp R. J. (1989). Fermentation of Bacilli. In: *Fermentation Process Development of Industrial Organisms*, Ed: Neway J. O. Marcel Dekkel Inc. New York. 73-123
- Ridha B. C. Gharbi. (2000). An expert system for selecting and designing EOR processes. *Petroleum Science and Engineeing* 27:33-47.
- Ralph A. Slepecky (1992). What is a *Bacillus*? In: *Biology of Bacilli*. Ed: Roy H. Doi and Martina McGloughlin. Butterworth-Heinemann, Read Publishing (USA) Inc.
- Ratlidge C. (2002). Biokimia pertumbuhan dan metabolisme. *BioTeknologi Asas*. Penerjemah: Yusuf Abdul Hamid, Ibrahim Che Omar dan Darah Ibrahim. Penerbit USM Pulau Pinang, 10-36

- Ratliff T., Hoskins B. C. dan Schneider D. R. (1996). Improved water flood operation in the Permian Basin through microbial culture treatment. *Society of Petroleum Engineer SPE 35216*
- Ravot G., Magot M., Fardeau M. L., Patel K. B. C., Prensier G., Egan A., Garcia J. L. dan Olliver B. (1995). *Thermotoga elfii* sp. Nov., a novel thermophilic bacterium from an African oil producing well. *International Systematic Bacteriology* 45: 304-308.
- Rebecca S. B. (1987). Potential uses of Microorganisms in Petroleum Recovery Technology. *Proceedings of The Oklahoma Academy of Science*. 67:97-104
- Rogers P. P. L., Lee K. J., Skotnicki M. L., dan Tribe D. E. (1982). Ethanol Production by *Zymomonas mobilis*. In: *Advances in Biochemical Engineering: Microbial Reactions*. Ed: A. Fiechter. Springer-Verlag. 37-84
- Sarin D. M., Marchal R. dan Vandecasteele J. P. (1990). Control of selectivity of butyric acid fermentation and improvement of fermentation performance with *Clostridium tyrobutylicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 32: 387-392
- Sayyoub M. H. (2002). Microbial Enhanced Oil Recovery: Research Studies in the Arabic Area During the Last Ten Years. *Society of Petroleum Engineer SPE 75218*.
- Sharpley J. M. (1966). *Elementary Petroleum Microbiology*. Gulf Publishing Company Texas.
- Sheehy A. J. (1990). Field study of microbial EOR. *7th Symposium on Enhanced Oil Recovery*. Oklahoma. Tulsa. 785-790.
- Shennan J. L. dan Levi J. D. (1987). In situ Microbial-Enhanced Oil Recovery. In: Naim Kosaric, W. L. Cairns and Neil C. C. Gray. *Biosurfactant and Biotechnology*. New York. Marcel Dekker, Inc. 165-182.
- Shuler M. L. dan Fikret Kargi (2002). *Bioprocess Engineering Basic Concept*. Second Edition. Prentice Hall Inc. USA.
- Singer M. E. and Finnerty W. R. (1984). A microbial surfactant – Physiology, Biochemistry and Application. *Development in Industrial Microbiology*. 25:31-40.
- Singleton P. (2004). *Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine*. 6th Edition. John Wiley & Sons Ltd England. 481-512.
- Slater J. H. (1981). Mixed Culture and Microbial Communities. In: *Mixed Culture Fermentation* Ed: Bushell M. E. dan Slater J. H. London, Academy Press. 1-24.
- Slobodkin A. I, Christian Jeanthon, Stéphane L'Haridon, Tamara Nazina, Margarita Miroshnichenko dan Elizaveta Bonch-Osmolovskaya. (1999). Dissimilatory

- reduction of Fe(III) by Thermophilic Bacteria and Archaea in Deep Subsurface Petroleum Reservoirs of Western Siberia. *Current Microbiology*. 39: 99-102.
- Somerville H. J. (1981). Mixed Culture in Aerobic Waste Treatment. In: *Mixed Culture Fermentation*. Ed: Bushell M. E. and Slater J. H. London, Academy Press. 81-98.
- Somrutai W., Takagi M. dan Yoshida T. (1996). Acetone-butanol fermentation by *Clostridium aurantibutyricum* ATCC 17777 from a model medium for palm oil mill effluent. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81(6): 543-547
- Soni B. K., Kapp C., Goma G., dan Soucaille P (1992). Solvent production from starch: effect of pH on amylase and glucoamylase localization and synthesis in synthetic medium. *Applied Microbiology Biotechnology*. 37: 539-543
- Sonnleitner B. (1983). Biotechnology of Thermophilic Bacteria –Growth, Products and Application. In: *Advanced in Biochemical Engineering/Biotechnology- Microbial Activities*. Ed: Fiechter A. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 28: 69-138
- Speight J. G. (2002). *Handbook of Petroleum Product Analysis*. Wiley Interscience, John Wiley & Sons, Inc. New Jersey.
- Spivey M. J. (1978) The acetone-butanol-ethanol fermentation. *Process Biochemistry*. 13: 2-5.
- Stanbury P. F., Whitaker A. dan Hall S. J. (1995). *Principle of Fermentation Technology*. Pergamon Press, England.
- Streeb L. P. dan Brown F. G. (1992). MEOR-Altamont/Bluebell Field Project. *Society of Petroleum Engineer SPE* 24334.
- Takahata Y., Toshihiro Hoaki dan Tadashi Maruyama. (2001). Starvation survivability of Thermococcus strain isolated from Japanese oil reservoirs. *Archive Microbiology*. 176: 264-270.
- Tanner R. S., Udegbunam E. O., McInerney M. J. dan Knapp R. M. (1991), *Geomicrobiology*. 9: 169-195.
- Tashiro Y., Katsuhisa Takeda, Genta Kobayashi, Kenji Sonomoto, Ayaaki Ishizaki dan Sadazo Yoshino. (2004). High Butanol Production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 in Fed-Batch Culture with pH-Stat Continuous Butyric Acid and Glucose Feeding Method. *Bioscience and Bioengineering*. 98 (4):263-268.

- Troostembergh J. C. (1996). Starch-based Raw Materials for Fermentation Application. In: *Biotechnology*. Ed: H. J. Rehm and G. Reed, A. Puhler and P. Stadler. *Product of Primary Metabolism*. Edited by M Roehr. 6: 32-46.
- Updegraff D. M. (1990). Early research on microbial enhanced oil recovery. *Development in Industrial Microbiology*. 31: 135-142
- Uyub Abdul Manaf (2001). Morfologi, Struktur Halus dan Fungsi Mikroorganisma. Utusan Publication & Distribution Sdn Bhd, Kuala Lumpur.
- Voget C. E., C. F. Mignone dan R. J. Ertola. (1985). Influence of temperature on solvent production from whey. *Biotechnology Letters*. 7(8): 607-610
- Wayman M. dan Parekh R. (1987). Production of Acetone-Butanol by Extractive Fermentation using Dibutylphthalate as Extractant. *Fermentation Technology*. 65 (3): 295-300
- Weaver R. F. (1999). *Molecular Biology*. WCB McGraw-Hill. USA.
- Welsh W., R. E. Williams dan I. A. Veliky. (1986). A note on the effect of nitrogen source on growth of and solvent production by *Clostridium acetobutylicum*. *Applied Bacteriology*. 61: 413-419.
- Westlake D. W. S. (1984). Heavy crude oils and oil shales: tertiary recovery of petroleum from oil Bearing formation. In: *Petroleum Microbiology*. Ed: Ronald M Atlas. Macmillan Publisher Company, USA.
- White F. H. dan Kidney E. (1981). Yeast-Bacterium Interactions in the Brewing Industry. In: *Mixed Culture Fermentation*. Ed: Bushell M. E. dan Slater J. H. London, Academy Press. 121-136.
- Wright C. C. (1972). The Identification of Water-Borne Oils SPE 4226. In: *SPE Symposium On The Handling of Oilfield Waters*, Dec. 4-5, 1972. Los Angeles, California. American Institute of Mining, Metallurgical and Petroleum Engineers, Inc.
- Yakimov M. M., Mohammed M. Amro, Michael Bock, Klaus Boseker, Herbert L. Fredrickson, Dagobert G. Kessel dan Keneth N. Timmis. (1997). The potential *Bacillus licheniformis* strain for in situ enhanced oil recovery. *Petroleum Science and Engineering*. 18: 147-160
- Yarbrough H. F. dan Coty Y. F. (1983). Microbially Enhanced Oil Recovery from the Upper Cretaceous Nacatoch Formation, Union Country, Arkansas. *Proceeding*

International Conference Microbial Enhancement Oil Recovery, Publication. NTIS
Springfield Va. 149-153

Yen T. F. (1975). Chemical Aspects of Metals in Native Petroleum. In: *The Role of Trace Metals in Petroleum*. Ed: Yen T. F. Ann Arbor Science Publishers Inc. Michigan. 1-30.

Yijiang Zhang, Zhengshun Xu, Ping Ji dan Weihong Hou (1999). Microbial EOR Laboratory Studies and Application Results in Daqing Oilfield. *Society of Petroleum Engineer SPE 54332*.

Yukihiro Tashiro, Katsuhisa Takeda, Genta Kobayashi, Kenji Sonomoto, Ayaaki Ishizaki dan Sadazo Yoshino (2004). High Butanol Production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 in Fed-Batch Culture with pH-Stat Continuous Butyric Acid and Glucose Feeding Method. *Bioscience and Bioengineering*. 98(4): 263-268.