تغییر در خواص بین‌سطحی سیال/سیال/سنگ تحت تأثیر فعالیت دو باکتری *Bacillus licheniformis* و *Pseudomonas putida* حین رشد در منابع کربن مختلف

منصوره فرید[۱]، شهریار عصفوری[۱*]، رضا آذین[۲] و سید علی جعفری[۱]

۱- گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی نفت، گاز و پتروشیمی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران

۲- گروه مهندسی نفت، دانشکده مهندسی نفت، گاز و پتروشیمی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۶/۴ تاریخ پذیرش: ۹۷/۳/۵

چکیده

مهم‌ترین مکانیسم فرآیندهای ازدیاد برداشت میکروبی نفت، تغییر خواص بین سطحی سیال/ سیال/ سنگ است که تحت تأثیر سلول‌های باکتریایی و متابولیت‌های تولیدی آنها است. برای این منظور در این تحقیق از دو باکتری *B.licheniformis* و *P.putida* و سه منبع کربن مختلف استفاده شد. نتایج نشان داد با توجه به تأثیر نوع منبع کربن روی رشد باکتری و همچنین نوع و میزان متابولیت‌های تولیدی، تغییر در خواص بین سطحی سیال/ سیال/ سنگ تحت تأثیر نوع منبع کربن استفاده شده است. به دنبال بررسی تأثیر ساختار سلولی و اثر محیط کشت بر سازوکارهای کاهش کشش بین‌سطحی، پایداری امولسیون‌ها و تغییر ترشوندگی از روش‌های تنسیومتری قطره آویزان، سنجش تحرک‌پذیری الکتروفروتیک، سنجش رئولوژی انبساط-تراکمی و آزمون تعیین زاویه تماس استفاده شد. نتایج، پتانسیل بیشتر باکتری *P.putida* را در تولید ماده فعال سطحی نشان داد. همچنین نتایج به‌دست آمده نشان داد برای باکتری *B.licheniformis*، محیط کشت گلوکزی محیطی بهتر است. مواد فعال سطحی تولیدی و محیط کشت باکتری *B.licheniformis* در محیط با منبع کربن گلوکز به ترتیب کشش سطحی و کشش بین‌سطحی را ۲۹/۰۷٪ و ۴۳/۸۷٪ کاهش داد. قرار دادن ورقه نازک در محلول محیط کشت گلوکزی باکتری *B.licheniformis*، زاویه تماس قطره آب را از °۱۰۹/۰۸۱ به °۴۴/۸۹۸ کاهش داد. برای باکتری *P.putida* محیط روغنی و گلوکزی به ترتیب به عنوان محیطی مؤثر برای تأثیر بر سطح تماس سیال-سیال و سیال-سنگ است. مواد فعال سطحی تولیدی و محیط کشت باکتری *P.putida* در محیط با منبع کربن روغن زیتون به ترتیب کشش سطحی و کشش بین سطحی را ۳۶/۴٪ و ۲۷/۱٪ کاهش داد. زاویه تماس قطره آب از °۱۰۹/۰۸۱ به °۵۴/۰۵۰ در محیط کشت گلوکزی باکتری *P.putida* کاهش یافت.

کلمات کلیدی: *P.putida*، *B.licheniformis*، کاهش کشش بین‌سطحی، تغییر ترشوندگی، رئولوژی بین سطحی، آب‌گریزی

*مسؤول مکاتبات
آدرس الکترونیکی osfouri@pgu.ac.ir
شناسه دیجیتال (DOI: 10.22078/pr.2018.2825.2309)

مقدمه

فناوری ازدیاد برداشت میکروبی نفت یک روش برداشت ثالثیه دوست‌دار محیط زیست تلقی می‌شود که شامل استفاده از تجمعات میکروبی و محصولات حاصل از متابولیسم‌های میکروبی برای افزایش برداشت از چاه‌های نفت است [۱]. مهم‌ترین مکانیسم این فرآیند تغییر خواص سطح تماس نفت-آب-سنگ است که می‌تواند روی دو مرز سیال-سنگ و سیال-سیال اثرگذار باشد. در اصلاح سطح تماس سیال-سیال، کاهش کشش بین‌سطحی و اصلاح خواص رئولوژیکی سطح تماس این دو فاز مهم‌ترین مکانیسم‌های حاکم هستند [۲]. انحلال‌پذیری بسیار کم هیدروکربن‌های نفتی در آب ظرفیت باکتری برای دسترسی و تجزیه این گونه سوبستراها را محدود می‌کند؛ به همین دلیل باکتری اغلب برای افزایش دادن دسترسی زیستی و جذب این سوبستراها ماده فعال سطحی زیستی تولید می‌کند [۳-۶]. علاوه بر کاهش کشش‌سطحی، باکتری‌ها با چسبیدن خود به سطح تماس و تشکیل فیلم و تغییر دادن خواص رئولوژیکی سطح تماس قادر به کاستن از کشش بین‌سطحی هستند [۷ و ۸]. دو مکانیسم اصلی برای توضیح تغییر ترشوندگی توسط مواد فعال سطحی، مکانیسم تشکیل جفت یونی بین سرهای باردار مولکول ماده فعال سطحی و اجزای نفت خام جذب شده روی سنگ و همچنین تشکیل یک تک لایه از مولکول‌های ماده فعال سطحی در اثر برهم‌کنش بین انتهای آب‌گریز مولکول ماده فعال سطحی و اجزای نفت خام جذب شده است [۹]. اوستاد و همکاران مشاهده کردند که در مغزه‌های گچی نفت‌تر، هر دو ماده فعال سطحی کاتیونی و آنیونی ترشوندگی سنگ را به حالت آب‌تری بیشتر تغییر می‌دهند؛ اما مواد فعال سطحی کاتیونی مؤثرتر از مواد فعال سطحی آنیونی بودند. آنها تشکیل جفت یونی بین سرهای با بار مثبت مواد فعال سطحی کاتیونی و مواد جذب‌شده با بار منفی (غالباً گروه‌های کربوکسیلیک از نفت خام روی سطح گچ) را عامل آب‌تر ساختن مغزه دانستند [۱۰ و ۱۱]. گام اولیه در تشکیل فیلم زیستی چسبیدن باکتری به سطح تماس است. در فرآیند چسبیدن سلول‌ها به این سطح سه گروه از عوامل شامل مشخصات سلول‌های میکروبی (بار سطحی، آبگریزی و ترکیب سطح سلول)، خواص سطحی نفت و عوامل محیطی مثل قدرت یونی، pH و حضور ترکیبات خاص مثل مواد فعال سطحی مؤثرند. از میان این عوامل، شاخصه آبگریزی سطح سلول مهم‌ترین عامل است [۲، ۸، ۱۲ و ۱۳]. کریمی و همکارن برای بررسی تأثیر متابولیت‌های میکروبی و اثر چسبندگی باکتری بر ترشوندگی از دو سطح شیشه‌ای با ترشوندگی‌های اولیه مختلف استفاده کردند [۴]. آنها دریافتند که سطوح زمان‌دهی شده در نفت‌خام به دلیل جذب مواد آلی، مواد مغذی لازم برای باکتری را فراهم می‌آورند و توانایی سلول‌ها برای اتصال به سطح را افزایش می‌دهند. از طرف دیگر، جذب مواد آلی زبری سطح سنگ را افزایش می‌دهد و در اثر افزایش زبری، سطح تماس در دسترس برای چسبیدن باکتری به سطح افزایش می‌یابد. راهس و همکاران با استفاده از رئولوژی بین‌سطحی و تنسیومتری قطره آویزان رفتار جذب سلول‌های باکتریایی پنج باکتری را بدون مداخله پروتئین‌ها و مواد فعال‌سطحی زیستی (بافر باکتریایی) اندازه گرفتند. آنها مشاهده کردند که بزرگی الاستیسیته فیلم تشکیل شده کاملاً متناسب با ترتیب کاهش کشش بین سطحی اندازه‌گیری شده است [۸]. در این تحقیق به بررسی و مقایسه دو باکتری *B.licheniformis* (*gram-positive*) و *P.putida* (*gram-negative*) با ساختار سلولی متفاوت بر تولید مواد فعال سطحی، تأثیرگذاری بر مکانیسم‌های کشش بین سطحی، قابلیت امولسیون کنندگی، تغییر گرانروی و سیال جابجاکننده و تغییر ترشوندگی سنگ مخزن با هدف ازدیاد برداشت نفت پرداخته می‌شود.

برای این منظور اثر نوع و ترکیب محیط کشت در توانایی تولید مواد فعال‌سطحی زیستی بررسی می‌شود. برای نیل به این منظور کشش سطحی و بین سطحی در دو محیط کشت جداگانه اندازه‌گیری گردید. همچنین با استفاده از روش تحرک‌پذیری الکتروفروتیک و سنجش رئولوژی انبساط و تراکمی بین سطحی پتانسیل ماده فعال سطحی تولید شده در کاهش کشش بین سطحی و چسبیدن به سطح تماس فازی نیز سنجیده می‌شود. علاوه بر این، برای بررسی تغییر ترشوندگی بر اثر تأثیر همزمان تشکیل فیلم زیستی، جذب مواد از محلول باکتریایی و اثر ماده فعال سطحی تولیدی در محیط‌های کشت متفاوت از آزمون تغییر زاویه تماس بر روی ورقه‌های نازک کربناته نفت دوست شده استفاده خواهد شد.

مواد و روش‌ها

باکتری، نفت خام، ورقه نازک و محیط کشت

دو باکتری *B.licheniformis* (آمپول لیوفیلیزه) و *P.putida* (کشت فعال) از مرکز ملی ذخائر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری شد. نفت خام استفاده شده نیز نفت خام نسبتاً سبک متعلق به شرکت ملی مناطق نفت‌خیز جنوب با API =۳۳/۹ است. ورقه‌های نازک مورد استفاده مربوط به یکی از مخازن کربناته جنوب ایران است. از ورقه‌های نازک، باضخامت ۵ mm و قطر ۳/۷ cm برای انجام آزمایش‌ها، استفاده شده است. محیط کشت‌های استفاده شده شامل دو دسته محیط پیش‌کشت و محیط کشت اصلی است. از محیط کشت‌های آگار و براث LB خریداری شده از شرکت مرک به عنوان محیط پیش کشت و محیط کشت نمک معدنی بهینه شده توسط جوشی و همکاران به عنوان محیط کشت اصلی استفاده شد [۱۴]. برای مشاهده اثر منبع کربن آب‌گریز نیز از روغن زیتون با دانسیته $\rho_{25^\circ C}$ =۰/۹۱۲۳ g/cm^3 ، گرانروی ۶۰/۸۲۰۵ mPa.s و برای تنظیم pH محیط نیز از محلول سدیم هیدروکسید یک مولار و اسیدکلریدریک یک نرمال استفاده شد.

روش انجام آزمایش

هر ارلن شامل محیط کشت اصلی (سه محیط کشت اصلی یکی با منبع کربن گلوکز با غلظت ۳۴ g/L، دومی با منبع کربن روغن زیتون با همین غلظت و محیط کشت سوم از ترکیب این دو منبع کربن به نسبت مساوی ۱۷ g/L گلوکز و ۱۷ g/L روغن زیتون) را اتو کلاو کرده و با محیط کشت شبانه با OD_{600} در حدود ۱ با نسبت حجمی ۵٪ تلقیح و در شیکر انکوباتور با دمای ۳۰°C و دور ۱۹۰ rpm انکوبه می‌کنیم. وضعیت رشد دو باکتری در هر سه محیط کشت با اندازه‌گیری چگالی نوری تا ۷۲ hr به فاصله زمانی هر ۴ hr تا ۴۸ hr و پس از آن هر ۱۲ hr، در طول موج ۶۰۰ nm مورد ارزیابی قرار داده شد. سوپرناتانت از سانتریفیوژ سوسپانسیون باکتریایی به مدت ۱۰ min با سرعت ۵۵۰۰ rpm به‌دست آمد. برای اندازه‌گیری آزمایش آب‌گریزی سطح سلول، ۵ cc از هر کدام از محلول‌های باکتریایی رشد یافته در هر سه محیط کشت را رأس سه زمان ۲۴، ۲۷ و ۳۰ hr انکوباسیون با استفاده از سانتریفیوژ کردن به مدت ۱۰ min و با سرعت ۵۵۰۰ rpm از سوپرناتانت جداسازی می‌شود. باکتری جدا شده با محلول بافر فسفات نمکی ۱۰X با pH=۷ (KH_2PO_4 mM ۱۸، Na_2HPO_4 ۱۰۰ mM، NaCl ۱/۳۷ M و KCl ۲۷ mM) را دوبار شستشو داده و سپس به آن ۵ cc بافر اضافه کرده و چگالی نوری آن اندازه‌گیری می‌شود. محلول‌های سوسپانسیون باکتریایی را با نسبت ۶ با نرمال-هگزادکان ترکیب کرده و به مدت ۲ min تکان داده می‌شود. سپس به آنها ۱۵ min استراحت داده شده و پس از آن ۲ cc از فاز آبی پایینی برای اندازه‌گیری چگالی نوری برداشت می‌شود [۱۵]. برای محاسبه آب‌گریزی سطح سلول از اختلاف بین چگالی نوری قبل و پس از اختلاط با هیدروکربن استفاده می‌شود:

$$BATH(\%) = 100 * (1 - \frac{OD_{600,t}}{OD_{600,0}}) \quad (۱)$$

$OD_{600,0}$ چگال نوری قبل از اختلاط، $OD_{600,t}$ چگالی نوری پس از اختلاط و BATH(٪) میزان آبگریزی را را نشان می‌دهند.

همچنین، آزمایش‌های زاویه تماس روی نمونه‌های ورقه نازک کربناته انجام شدند. تمامی سطوح قبل از آزمایش در دستگاه دین استارک با تولوئن شسته شدند. برای نفت‌دوست کردن، صفحات تمیز کربناته به مدت ۷ day در دمای ۸۰°C در نفت قرار داده شدند. سپس سطوح را با نرمال هپتان شسته و زمان داده شد تا خشک شوند. به عنوان نمونه‌های شاهد، زاویه تماس قطرات آب روی سطوح نفت‌دوست شده پیش از قراردادن در محلول‌های باکتریایی اندازه‌گیری می‌شوند. برای نمونه های اصلی، صفحات به مدت ۴۸ hr در محلول‌های باکتریایی قرار داده شدند. سپس به منظور جدا کردن باکتری‌های غیرمتصل سطوح دو بار با آب مقطر شستشو داده و سپس در هوای آزاد قرار می‌گیرند تا خشک شوند. در خاتمه با قرار دادن قطره آب روی سطوح، زوایای تماس اندازه‌گیری می‌شود.

تجهیزات

اندازه‌گیری‌های چگالی نوری به‌وسیله اسپکتروفتومتر فرابنفش-مرئی شرکت پرکین اِلمر[1] مدل Lambda25 انجام شدند. برای اندازه‌گیری کشش سطحی نمونه‌های سوپرناتانت از تنسیومتر مدل TD1C ساخت شرکت لاودا[2] استفاده شد. همچنین برای اندازه‌گیری پتانسیل زتا، کشش سطحی و رئولوژی انبساط و تراکمی حجمی بین سطحی به ترتیب از زتا سایزر Nano ZS (Malvern)، تنسیومتر آنالیز پروفایل قطره PAT-1M (Sinterface) و دستگاه PAT-1M (Sinterface) استفاده شد.

نتایج و بحث

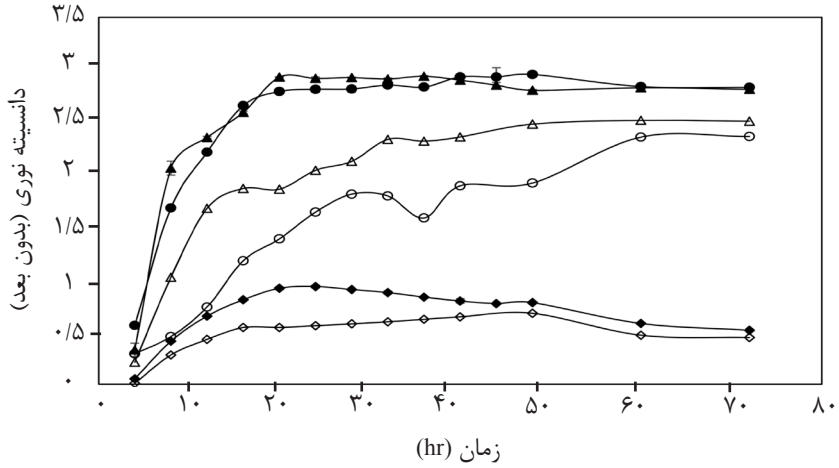
وضعیت رشد دو باکتری در منابع کربن آب‌دوست و آب‌گریز

برای بررسی اثر آب‌دوست و آب‌گریز بودن منبع کربن بر رشد هر دو باکتری از سه منبع کربن گلوکز، روغن زیتون، و ترکیب گلوکز-روغن زیتون استفاده شد. شکل ۱ رشد دو باکتری را در هر سه محیط کشت نشان می‌دهد. نتایج نشان داده شده بیانگر رشد بهتر باکتری *B.licheniformis* نسبت به باکتری *P.putida* در هر سه محیط کشت است. از بررسی نتایج ارائه شده در شکل ۱ مشاهده می‌شود که رشد باکتری *B.licheniformis* در دو محیط کشت گلوکز و گلوکز-روغن تقریباً معادل و بیشتر از محیط کشت صرفاً روغنی است، در صورتی که رشد باکتری *P.putida* در محیط کشت گلوکز-روغن بیشتر از دو محیط کشت دیگر است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت غلظت بالای گلوکز بر رشد هر دو باکتری *B.licheniformis* و *P.putida* بی‌تأثیر است یا بر آن اثر منفی دارد. غلظت بالای گلوکز در این محیط می‌تواند به عنوان بازدارنده رشد باکتری عمل کند. این در حالی است که از منظر اقتصادی نیز استفاده از غلظت بالای گلوکز مطلوب نیست. در مورد محیط کشت روغنی به دلیل آب‌گریز بودن این منبع و همچنین داشتن پیوندهای قوی هیدروژنی بیشتر در مقایسه با کربوهیدرات‌ها، جذبشان برای باکتری دشوار است. بنابراین هر دو باکتری رشد کمتری در محیط کشت حاوی منبع کربن روغن زیتون دارند.

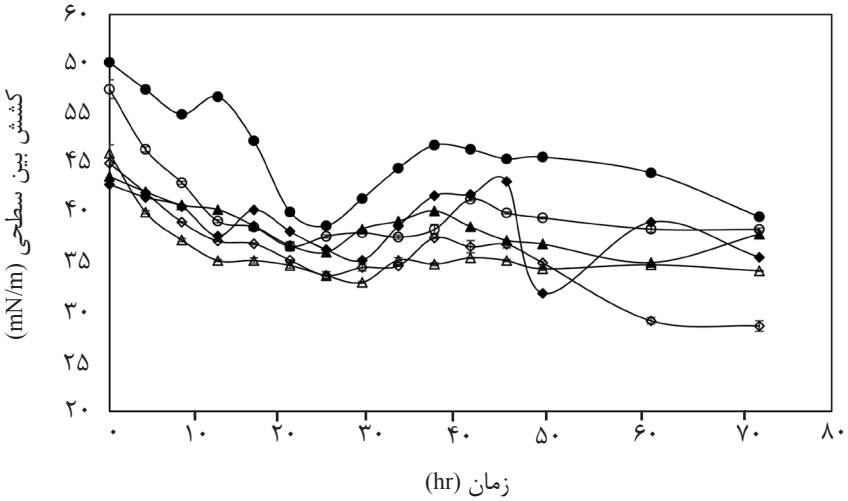
فعالیت سطحی

کشش سطحی سوپرناتانت کشت و کشش بین‌سطحی دینامیک بین محیط کشت و نرمال هگزادکان برای دو باکتری در هر سه محیط کشت اندازه‌گیری شد. شکل ۲ نتایج اندازه‌گیری کشش‌سطحی را نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود حداکثر کاهش کشش سطحی در فاصله زمانی ۲۰-۳۰ h انکوباسیون اتفاق میافتد. این زمان منطبق با آغاز فاز پایای رشد است.

1. Perkin Elmer
2. Lauda



شکل ۱ منحنی رشد باکتری *B.licheniformis* (با نمادهای توپر) و *P.putida* (با نمادهای توخالی) در سه محیط کشت حاوی منبع کربن گلوکز (○)، گلوکز-روغن (Δ) و روغن (♦).



شکل ۲ کاهش کشش سطحی ناشی از رشد باکتری *B.licheniformis* (با نمادهای توپر) و *P.putida* (با نمادهای توخالی) در هر سه محیط حاوی منبع کربن گلوکز (○)، گلوکز به همراه روغن (Δ) و روغن (♦).

در مورد محیط کشت‌های روغنی حداقل کاهش کشش سطحی پس از این زمان مشاهده شد که می‌تواند به دلیل ماهیت آبگریزی این سوبسترا و تحریک سویه باکتریایی به تولید ماده فعال سطحی زیستی باشد. مطابق با درصدهای کاهش کشش سطحی ارائه شده در جدول ۱، حداکثر درصد کاهش کشش سطحی توسط باکتری *B.licheniformis* در محیط گلوکزی و توسط باکتری *P.putida* در محیط روغنی حاصل شد. مقایسه پتانسیل دو باکتری برای تولید ماده فعال سطحی نشان می‌دهد که باکتری *P.putida* در هر سه محیط کشت، کاهش کشش سطحی بیشتری را نسبت به باکتری *B.licheniformis* ایجاد می‌کند.

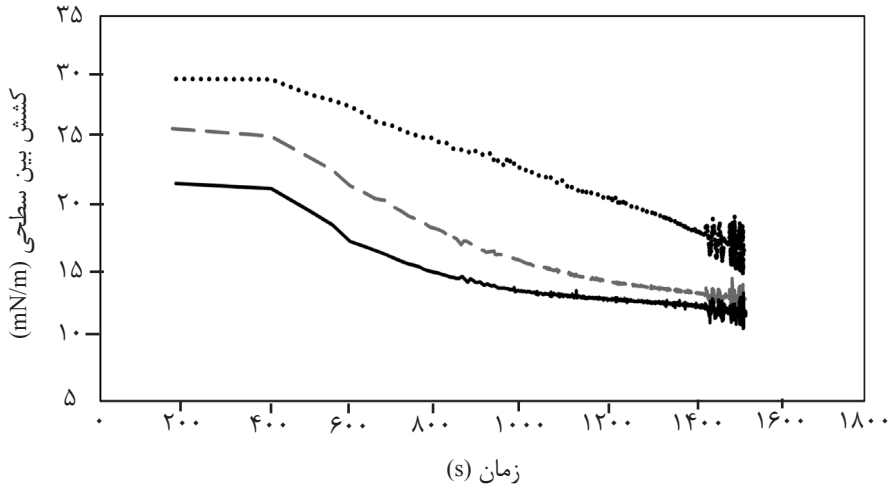
جدول ۱ مقادیر درصدهای کاهش در کشش سطحی محلول‌های سوپرناتانت دو باکتری *B.licheniformis* و *P.putida* نسبت به محیط فاقد باکتری

باکتری	منبع کربن محیط کشت		
	گلوکز	روغن زیتون	گلوکز به همراه روغن زیتون
P.putida	۳۰/۱۹	۳۶/۴	۲۸/۲۶
B.licheniformis	۲۹/۰۷	۲۷/۸۷	۲۳/۹۶

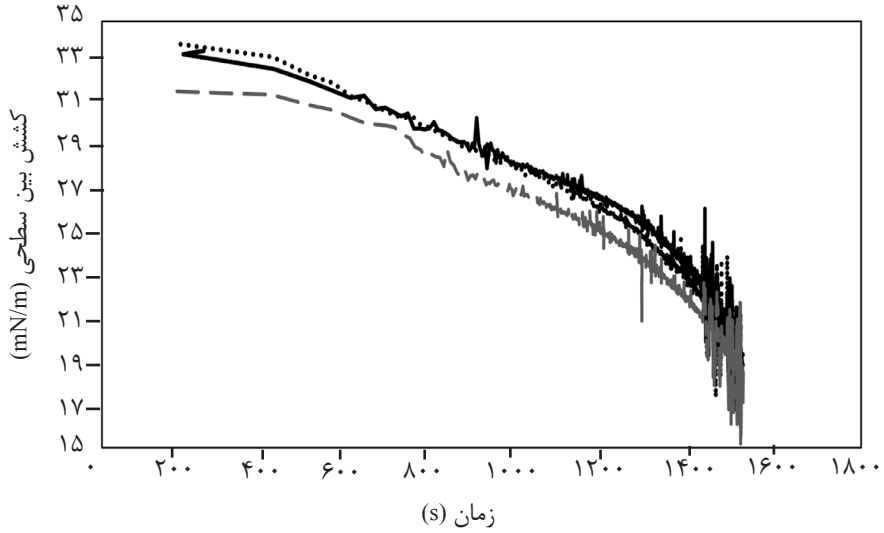
کشش بین سطحی دینامیک محیط کشت‌های ۴۸ hr انکوبه شده دو باکتری به عنوان فاز آبی و نرمال هگزادکان به عنوان فاز آلی به وسیله تنسیومتری قطره آویزان اندازه‌گیری گردید. اندازه قطره برای اندازه گرفتن کشش بین‌سطحی به مدت ۹۰۰ s تا رسیدن کشش بین‌سطحی به مقدار تعادلی ثابت نگه‌داشته شد. حداقل مقادیر کشش بین‌سطحی تعادلی برای باکتری *B.licheniformis* در محیط کشت گلوکزی حاصل می‌شود. در مورد محیط کشت‌های باکتری *P.putida* مقادیر کشش بین‌سطحی تعادلی ارائه شده تقریباً معادل هستند؛ البته مقادیر کشش بین سطحی نتیجه شده برای محیط کشت روغنی اندکی از دو محیط دیگر کمتر است. نتایج ارائه شده نوسان سینوسی مساحت سطح تماس و پاسخ کشش بین سطحی به این تغییر مساحت در شکل ۳ و ۴ نشان می‌دهد که دامنه تغییرات کشش بین سطحی در هر سیکل تراکم و انبساط در مورد محیط کشت گلوکزی *B.licheniformis* در مقایسه با محیط کشت روغنی و محیط کشت گلوکز-روغن کمتر است. تولید ماده فعال سطحی بیشتر با وزن مولکولی پایین در محیط گلوکزی را می‌توان از روی جذب و دفع سریع آن از روی سطح تماس فازی مطابق با خاصیت متحرک بودن لایه تشکیل شده توسط مواد فعال سطحی با وزن مولکولی پایین روی این سطح نیز مشاهده کرد. جذب و دفع سریع این مواد از روی سطح تماس فازی منجر به دامنه تغییرات کشش بین‌سطحی کمتر در محیط گلوکزی در همه فرکانس‌ها شده است. در مورد باکتری *P.putida* دامنه تغییرات در هر سه محیط کشت تقریباً با هم برابر هستند. این نتایج تأیید کننده برابری مقادیر کشش بین سطحی تعادلی در هر سه محیط است. جدول ۲ دامنه تغییرات کشش بین‌سطحی دو باکتری در هر سه محیط کشت را طی فرکانسهای مختلف نشان می‌دهد.

آب‌گریزی سطح سلول و تحرک‌پذیری الکتروفروتیک باکتری

گام اولیه در تشکیل فیلم زیستی چسبیدن باکتری به سطح تماس است. برای تعیین تمایل جذب دو باکتری روی سطح تماس آبی-آلی، آب‌گریزی و بار سطحی دو باکتری اندازه‌گیری شد. در بازه زمانی ۳۰-۲۰ hr انکوباسیون که همزمان با حداکثر کاهش کشش سطحی است؛ آب‌گریزی هر دو باکتری در هر سه محیط کشت اندازه‌گیری و در شکل ۵ نشان داده شده است. در این آزمایش از فاز آبگریز نرمال هگزادکان به عنوان فاز آلی استفاده شد. مطابق با نتایج به‌دست آمده رفتار آب‌گریزی هر دو باکتری تحت تأثیر محیط کشت و همچنین میزان و فاز رشد باکتری است.



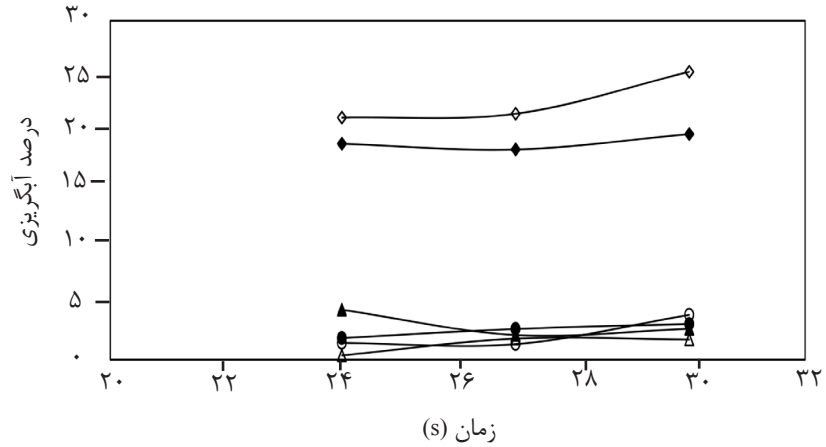
شکل ۳ کشش بین‌سطحی محیط کشت‌های باکتری *B.licheniformis* با منبع کربن گلوکز (——)، گلوکز به همراه روغن (...) و روغن (- -) در کل زمان اندازه‌گیری (قبل از رسیدن به مقدار تعادلی و پس از آن طی تغییر سینوسی مساحت حدفاصل طی چهار فرکانس ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۵ و ۰/۱ hr)



شکل ۴ کشش بین‌سطحی محیط کشت‌های باکتری *P.putida* با منبع کربن گلوکز (——)، گلوکز به همراه روغن (...) و روغن (– –) در کل زمان اندازه‌گیری (قبل از رسیدن به مقدار تعادلی و پس از آن طی تغییر سینوسی مساحت حدفاصل طی چهار فرکانس ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۵و ۰/۱ Hz)

جدول ۲ مقادیر دامنه کشش بین سطحی (mN/m) برای باکتری *B.licheniformis* و *P.putida* طی رشد در هر سه منبع کربن

باکتری	محیط کشت	۰/۰۱ Hz	۰/۰۲ Hz	۰/۰۵ Hz	۰/۱ Hz
B.licheniformis	گلوکز	۰/۳۹	۰/۴۵	۰/۶۴	۰/۸۹
	روغن	۱/۱۸	۱/۳۹	۱/۵۲	۱/۵۹
	گلوکز+روغن	۰/۳۵	۰/۵۱	۰/۷۹	۰/۹۹
P.putida	گلوکز	۱/۱۲	۱/۴۸	۱/۶۳	۱/۷۲
	روغن	۱/۳۳	۱/۵۵	۱/۷۳	۱/۸۲
	گلوکز+روغن	۱/۱۵	۱/۴۴	۱/۶۷	۱/۷۷



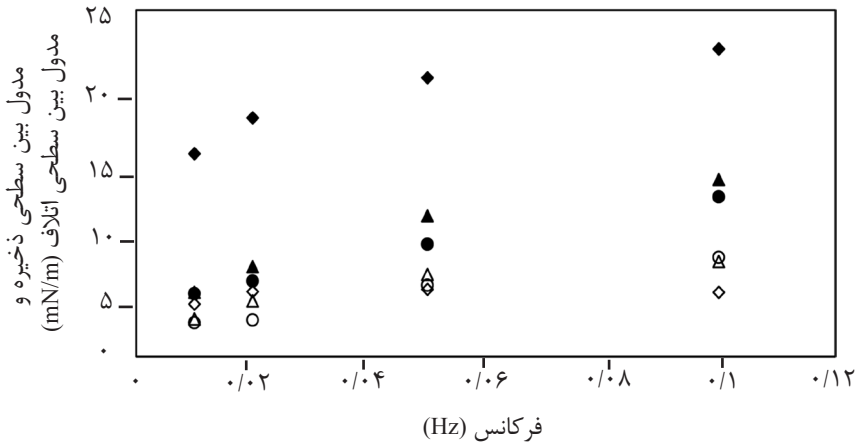
شکل ۵ مقادیر آبگریزی بر حسب زمان انکوباسیون برای باکتری *B.licheniformis* (با نمادهای توپر) و *P.putida* (با نمادهای توخالی) طی رشد روی سه منبع کربن گلوکز (○)، گلوکز به همراه روغن (Δ) و روغن (♦).

مقایسه مقادیر آب‌گریزی هر دو باکتری، تشابه آبگریزی طی رشد در محیط کشت‌های حاوی گلوکز و گلوکز-روغن را نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود بیشترین مقادیر آب‌گریزی برای باکتری رشد یافته در محیط کشت روغن به‌دست آمد. در این محیط، باکتری *P.putida* نسبت به باکتری *B.licheniformis* آبگریزی بیشتری از خود نشان داد. نتیجه به‌دست آمده از اندازه‌گیری پتانسیل زتا دو باکتری رشد یافته در محیط کشت روغن زیتون، بار منفی بیشتر باکتری *B.licheniformis* (۱۹/۷ mV-) را در مقایسه با باکتری *P.putida* (۶/۱۷ mV-) نشان داد. این نتایج با نتایج آبگریزی تطابق کامل دارد و تأیید کننده آبگریزتر بودن *P.putida* رشد یافته در محیط کشت روغنی است.

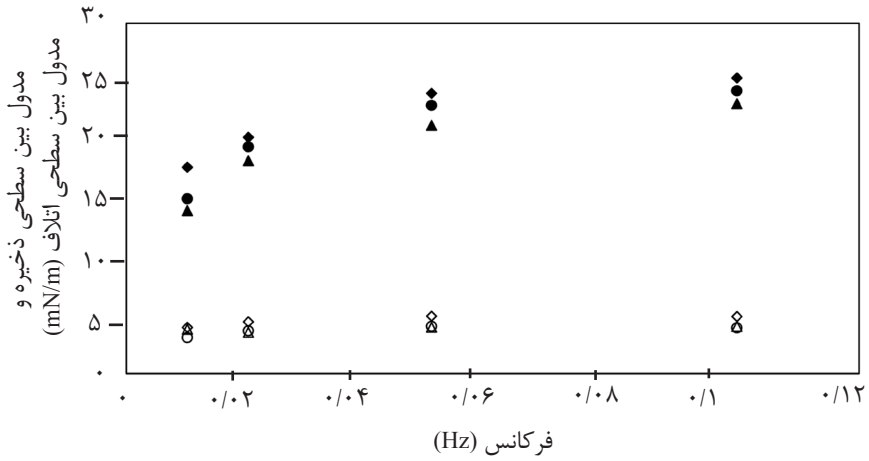
اندازه‌گیری رئولوژی بین سطحی

مدول‌های انبساط-تراکمی بین سطحی که مقیاسی از مقاومت سطح تماس به تغییرات را نشان می‌دهند از تبدیل فوریه داده‌های نوسان سینوسی تعیین شدند. این مدول‌ها به منظور بررسی اثر باکتری‌ها و متابولیت‌های تولیدی آنها بر فیلم تشکیل شده در سطح تماس و پایداری امولسیون‌های شکل گرفته اندازه‌گیری شدند. همانگونه که در شکل ۶ نشان داده شده فیلم تشکیلی توسط باکتری *B.licheniformis* در محیط کشت روغنی در سطح تماس آبی-آلی از دو محیط کشت دیگر ویسکوالاستیک‌تر است. مشاهده مقادیر "E بر حسب فرکانس برای محیط کشت‌های این باکتری نشان می‌دهد با افزایش فرکانس، "E افزایش می‌یابد. این موضوع نشان می‌دهد مدول اتلاف در اثر مقاومت مولکول‌های سطحی به تغییر شکل است. در واقع با افزایش فرکانس، برخورد و اصطکاک مولکول‌های بین سطحی افزایش می‌یابد و در نتیجه منجر به اتلاف بیشتر انرژی صرف شده برای تغییر شکل سطح تماس خواهد شد.

مطابق شکل ۷، نتایج نشان می‌دهد که برای باکتری *P.putida* ویسکوالاستیسیته فیلم تشکیل شده در محیط گلوکزی کمی از دو محیط دیگر بیشتر است. مقایسه فیلم‌های تشکیل شده توسط باکتری *P.putida* و *B.licheniformis*، ویسکوالاستیک‌تر بودن فیلم‌های باکتری *P.putida* را نشان می‌دهد. این موضوع می‌تواند تأییدی بر آبگریزی بیشتر باکتری *P.putida* باشد. در محیط کشت‌های باکتری *P.putida* مدول اتلاف تقریباً مقدار ثابتی با افزایش فرکانس نشان می‌دهد. این موضوع نشان می‌دهد مدول اتلاف حاصل ترکیبی از اثرات اصطکاک ناشی از ویسکوزیته و تبادل نفوذی با فاز توده است.



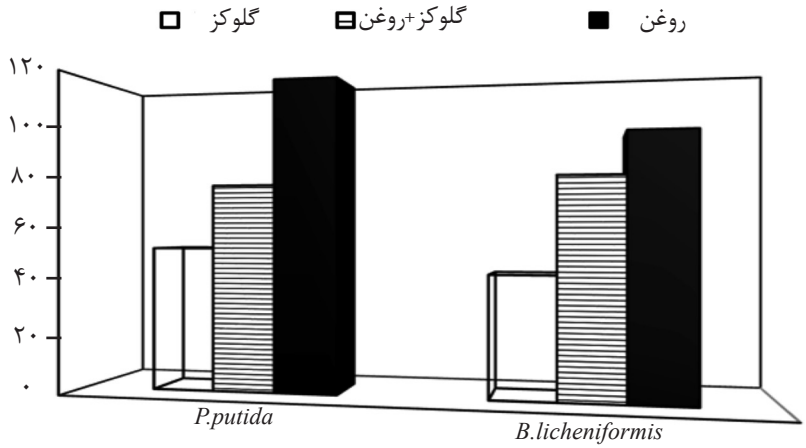
شکل ۶ مدول بین سطحی ذخیره E′ (با نمادهای توپر) و اتلاف E″ (با نمادهای توخالی) محیط کشت‌های باکتری *B.licheniformis* طی رشد در سه منبع کربن گلوکز (○)، گلوکز به همراه روغن (Δ) و روغن (♦).



شکل ۷ مدول بین سطحی ذخیره E′ (با نمادهای توپر) و اتلاف E″ (با نمادهای توخالی) محیط کشت‌های باکتری *P.putida* طی رشد در سه منبع کربن گلوکز (○)، گلوکز به همراه روغن (Δ) و روغن (♦).

اندازه‌گیری زاویه تماس

نتایج اندازه‌گیری زاویه تماس قطره آب در سیستم سه‌فازی آب/گاز/سنگ قبل از همجواری با محلول‌های باکتریایی و پس از همجواری با آنها در شکل ۸ نشان داده شده است. مقایسه نتایج نشان می‌دهد تغییر ترشوندگی به سمت آب تری بیشتر در محیط باکتری رشد یافته در محیط گلوکز اتفاق افتاده است. یک دلیل این موضوع می‌تواند مربوط به رشد بیشتر باکتری در محیط گلوکز در مقایسه با منبع کربن روغن و امکان تشکیل و اتصال باکتری بیشتری روی سطح سنگ باشد. از طرف دیگر محیط کشت روغن پس از طی زمان استراحت به منظور همجواری با سطح ورقه نازک، ممکن است روی سطح سنگ جذب و به آن بچسبد و بر این اساس پتانسیل آبدوست شدن سطح نیز را کاهش دهد. همچنین نتایج نشان داد که باکتری *B.licheniformis* نسبت به باکتری *P.putida* طی رشد در محیط روغنی پتانسیل بیشتری برای تغییر ترشوندگی سطح به سمت آب‌دوستی دارد. در محیط گلوکزی نیز قابلیت باکتری *B.licheniformis* بیشتر است هرچند که این تفاوت زیاد قابل ملاحظه نیست.



شکل ۸ زاویه تماس اندازه‌گیری شده قطره آب روی سطح ورق نازک پس از همجواری در محلول‌های محیط کشت دو باکتری *P.putida* و *B.licheniformis* با سه منبع کربن گلوکز، گلوکز-روغن و روغن. زاویه تماس قطره آب پیش از قرار دادن در محلول‌های محیط کشت ۱۰۹° است.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق به تأثیر محیط کشت بر مهمترین مکانیسم‌های شناخته شده در فرآیندهای ازدیاد برداشت میکروبی نفت یعنی کاهش کشش بین‌سطحی و تغییر ترشوندگی پرداخته شد. در کاهش کشش بین‌سطحی علاوه بر مواد فعال سطحی، آبگریزی و رشد باکتری نیز نقش مؤثری دارد. مقایسه بین درصدهای کاهش کشش سطحی ناشی از سوپرناتانت دو باکتری *B.licheniformis* و *P.putida* پتانسیل بیشتر باکتری *P.putida* را در تولید مواد فعال سطحی نشان داد. مقادیر کمتر کشش بین‌سطحی در محیط‌های کشت باکتری *B.licheniformis* نسبت به *P.putida* را حتی با وجود آبگریزی کمتر، می‌توان به رشد بهتر باکتری *B.licheniformis* طی زمان انکوباسیون ۴۸ hr مربوط دانست. نتایج بررسی رئولوژی در تشکیل فیلم پایدار در سطح مشترک فاز آبی-آلی، نقش مثبت سلول باکتری و همچنین نقش بازدارنده مواد فعال سطحی را در افزایش نقاط شبکه‌ای نشان داد. نتایج اندازه‌گیری ویسکوالاستیسیته فیلمهای تشکیل شده توسط باکتری *B.licheniformis* نشان داد با وجود رشد بیشتر باکتری و همچنین تولید مواد فعال سطحی بیشتر در محیط گلوکزی نسبت به محیط روغنی، ویسکوالاستیسیته در محیط گلوکزی کمتر است. این موضوع را می‌توان از یک طرف به آبگریزی بیشتر باکتری در محیط کشت روغنی و بنابراین تمایل بیشترش به تشکیل فیلم در سطح تماس آبگریز آبی-آلی مربوط دانست و از طرفی نقش بازدارنده مواد فعال سطحی با وزن مولکولی پایین نیز عاملی برای ویسکوالاستیسیته کمتر به حساب آورد. در واقع تحرک‌پذیری بالاتر مواد فعال سطحی موجب جذب سریع‌تر آنها روی سطح تماس شده و درصد اشباع سطح از مواد فعال سطحی بیش از سلول‌های باکتریایی می‌شود. از سوی دیگر بر مبنای اندازه‌گیری‌های انجام شده روی باکتری *P.putida*، نشان داده شد در رئولوژی انبساط و تراکمی نه تنها لایه محرک کشش بین‌سطحی مهم است بلکه کل لایه جذب شده حائز اهمیت است. این اندازه‌گیری‌ها نشان دادند با وجود آبگریزی بیشتر باکتری *P.putida* در محیط روغنی و بنابراین تمایل بیشتر به تشکیل فیلم در سطح تماس آبی-آلی در این محیط کشت اما، تولید بیشتر مواد فعال سطحی در محیط روغنی و نقش بازدارندگی آنها و همچنین رشد بهتر باکتری در محیط گلوکزی موجب می‌شود ویسکوالاستیسیته فیلم تشکیلی در محیط گلوکزی کمی از دو محیط دیگر بیشتر شود. نتایج آزمایش‌ها نشان داد باکتری *B.licheniformis* با آبگریزی کمتر، فیلمی آب‌دوست تشکیل می‌دهد که قابلیت تجمع در سطح تماس سنگ کربناته-آب را دارد و از طرف دیگر باکتری *P.putida* نیز فیلمی آب‌گریز تشکیل می‌دهد که پتانسیل تجمع در سطح تماس آب-روغن را دارد.

علائم و نشانه‌ها

E': مدول بین سطحی ذخیره (mN/m)

E'': مدول بین سطحی اتلاف (mN/m)

f: فرکانس (Hz)

H: آبگریزی (٪)

IFT: کشش بین سطحی (mN/m)

OD: چگالی نوری

ST: کشش سطحی (mN/m)

θ: زاویه تماس (*Degree*)

Hz: هرتز

مراجع

[1]. Xiao M., Zhang Z. Z., Wang J. X., Zhang G. Q., Luo Y. J., Song Z. Z. and Zhang J. Y., "*Bacterial community diversity in a low-permeability oil reservoir and its potential for enhancing oil recovery*," Bioresource Technology, Vol. 147, pp. 110-116, 2013.

[2]. Sarafzadeh P., Hezave A. Z., Mohammadi S., Niazi A. and Ayatollahi S., "*Modification of rock/fluid and fluid/*

fluid interfaces during MEOR processes, using two biosurfactant producing strains of Bacillus stearothermophilus SUCPM# 14 and Enterobacter cloacae: A mechanistic study," Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Vol. 117, pp. 457-465, 2014.

[3]. Darvishi P., Ayatollahi S., Mowla D. and Niazi A., "*Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPPI-2*," Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Vol. 84, pp. 292-300, 2011.

[4]. Karimi M., Mahmoodi M., Niazi A., Al-Wahaibi Y. and Ayatollahi S., "*Investigating wettability alteration during MEOR process, a micro/macro scale analysis*," Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Vol. 95, pp. 129-136, 2012.

[5]. Kowalewski E., Rueslåtten I., Steen K., Bødtker G., and Torsæter O., "*Microbial improved oil recovery—bacterial induced wettability and interfacial tension effects on oil production*," Journal of Petroleum Science and Engineering, Vol. 52, pp. 275-286, 2006.

[6]. Wang X., Li D., Hendry P., Volk H., Rashid A., Liu K., Ahmed M., Gong S., Ata B Wan Daud W. and Utherland T. D. S, "*Effect of nutrient addition on an oil reservoir microbial population: implications for enhanced oil recovery*," Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology, DOI: 10.4172/2157-7463.1000118, 2013.

[7]. de Wouters T., Jans C., Niederberger T., Fischer P. and Rühs P. A., "*Adhesion potential of intestinal microbes predicted by physico-chemical characterization methods*," PloS one, Vol. 10, Doi.org/10.1371/journal.pone.0136437, 2015.

[8]. Rühs P., Böcker L., Inglis R. and Fischer P., "*Studying bacterial hydrophobicity and biofilm formation at liquid–liquid interfaces through interfacial rheology and pendant drop tensiometry*," Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Vol. 117, pp. 174-184, 2014.

[9]. Salehi M., Johnson S. J. and Liang J. T., "*Mechanistic study of wettability alteration using surfactants with applications in naturally fractured reservoirs*," Langmuir, Vol. 24, pp. 14099-14107, 2008.

[10]. Austad T., Matre B., Milter J., Saevareid A, and Øyno L., "*Chemical flooding of oil reservoirs 8. Spontaneous oil expulsion from oil-and water-wet low permeable chalk material by imbibition of aqueous surfactant solutions*," Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, Vol. 137, pp. 117-129, 1998.

[11]. Standnes D. C. and Austad T., "*Wettability alteration in chalk: 2. Mechanism for wettability alteration from oil-wet to water-wet using surfactants*," Journal of Petroleum Science and Engineering, Vol. 28, pp. 123-143, 2000.

[12]. Wu C., Lim J. Y., Fuller G. G. and Cegelski L., "*Disruption of Escherichia coli amyloid-integrated biofilm formation at the air–liquid interface by a polysorbate surfactant*," Langmuir, Vol. 29, pp. 920-926, 2013.

[13]. Zhang Z. and Christopher G., "*Effect of Particulate Contaminants on the Development of Biofilms at Air/Water Interfaces*," Langmuir, Vol. 32, pp. 2724-2730, 2016.

[14]. Joshi S., Yadav S. and DesaiA . J., "*Application of response-surface methodology to evaluate the optimum medium components for the enhanced production of lichenysin by Bacillus licheniformis R2*," Biochemical Engineering Journal, Vol. 41, pp. 122-127, 2008.

[15]. Rosenberg M. and Rosenberg E., "*Bacterial adherence at the hydrocarbon-water interface*," Oil and Petrochemical Pollution, Vol. 2, pp. 155-162, 1985.