

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

منصوره فرید، 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 بین‌سطحی 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 بین‌سطحی 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 الکتروفوروتیک، 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 بین‌سطحی 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: *B. licheniformis*، *P. putida*، کاهش کشش بین‌سطحی، تغییر ترشوندگی، رئولوژی بین‌سطحی، آب‌گریزی

*مسئول مکاتبات

آدرس الکترونیکی osfour@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 سوپستراها را محدود می‌کند؛ به همین دلیل باکتری اغلب برای افزایش دادن دسترسی زیستی و جذب این سوپستراها ماده فعال سطحی زیستی تولید می‌کند [۳-۶]. علاوه بر کاهش کشش سطحی، 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 همکاران 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 قطره‌آویزان رفتار جذب سلول‌های باکتریایی پنج باکتری را بدون مداخله پروتئین‌ها و مواد فعال سطحی 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 *P.putida* (gram-negative) و *B.licheniformis* (gram-positive) با ساختار سلولی متفاوت بر تولید مواد فعال سطحی، تأثیرگذاری بر مکانیسم‌های کشش بین سطحی، قابلیت امولسیون‌کنندگی، تغییر گرانشی و سیال‌جابجاکنده و تغییر ترشوندگی سنگ مخزن با هدف ازدیاد برداشت نفت پرداخته می‌شود.

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 OD₆₀₀ 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 به دست 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 (KH₂PO₄) mM ۱۸، ۱۰۰ mM Na₂HPO₄، ۱/۳۷ M NaCl و ۲۷ mM KCl) 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:

برای این منظور اثر نوع و ترکیب محیط کشت در توانایی تولید مواد فعال سطحی 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 تحرک پذیری الکتروفروتنیک 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 نفت خیز جنوب با API=۳۳/۹ است. ورقه‌های نازک مورد استفاده مربوط به یکی از مخازن کربناته جنوب ایران است. از ورقه‌های نازک، با ضخامت 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 برات LB خریداری شده از شرکت مرک به عنوان محیط پیش‌کشت 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 $\rho_{25^\circ\text{C}}=0/9123 \text{ g/cm}^3$ ، گرانیروی ۶۰/۸۲۰۵ mPa.s و برای تنظیم pH محیط نیز از محلول سدیم هیدروکسید یک مولار و

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 کشش سطحی 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.

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

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

همچنین، آزمایش‌های زاویه تماس روی نمونه‌های ورقه نازک کربنات انجام شدند. تمامی سطوح قبل از آزمایش در دستگاه دین استارک با تولوئن شسته شدند. برای نفت‌دوست کردن، صفحات تمیز کربنات به مدت ۷ day در دمای $80^{\circ}C$ 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 نمونه‌های 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.

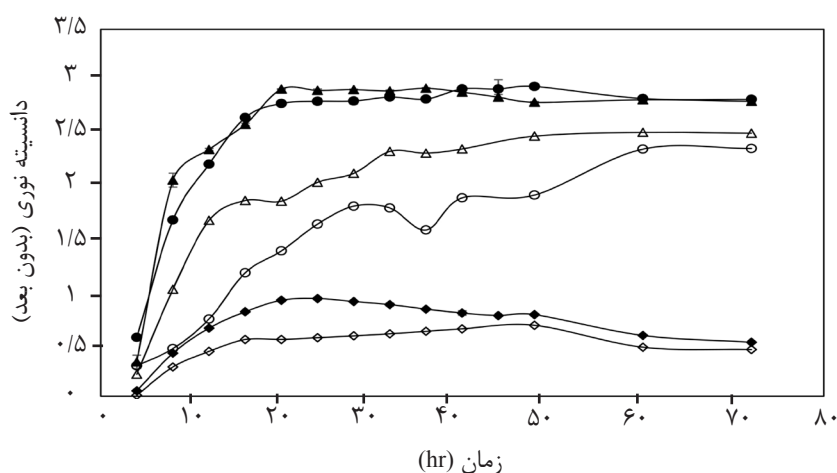
تجهیزات

اندازه‌گیری‌های چگالی نوری به وسیله اسپکتروفوتومتر فرابنفش-مرئی شرکت پرکین‌المر^۱ مدل Lambda25 انجام شدند. برای اندازه‌گیری کشش سطحی نمونه‌های سوپرناتانت از تنسیومتر مدل TD1C ساخت شرکت لاودا^۲ استفاده شد. همچنین برای اندازه‌گیری پتانسیل زتا، کشش سطحی و رئولوژی انبساط و تراکمی حجمی بین سطحی به ترتیب از زتا سائزر Nano ZS (Malvern)، تنسیومتر آنالیز پروفایل قطره PAT-IM (Sinterface) و دستگاه PAT-IM (Sinterface) استفاده شد.

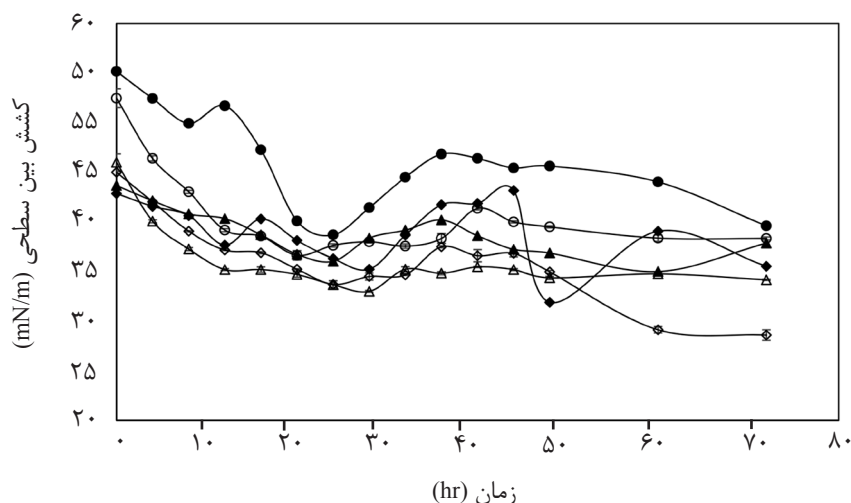
نتایج و بحث

وضعیت رشد دو باکتری در منابع کربن آب‌دوست و آب‌گریز برای بررسی اثر آب‌دوست و آب‌گریز بودن منبع

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 (△) 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 (△) و روغن (●).

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.

در مورد محیط کشت‌های روغنی حداقل کاهش کشش سطحی پس از این زمان مشاهده شد که می‌تواند به دلیل ماهیت آگریزی این سویسترا 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

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

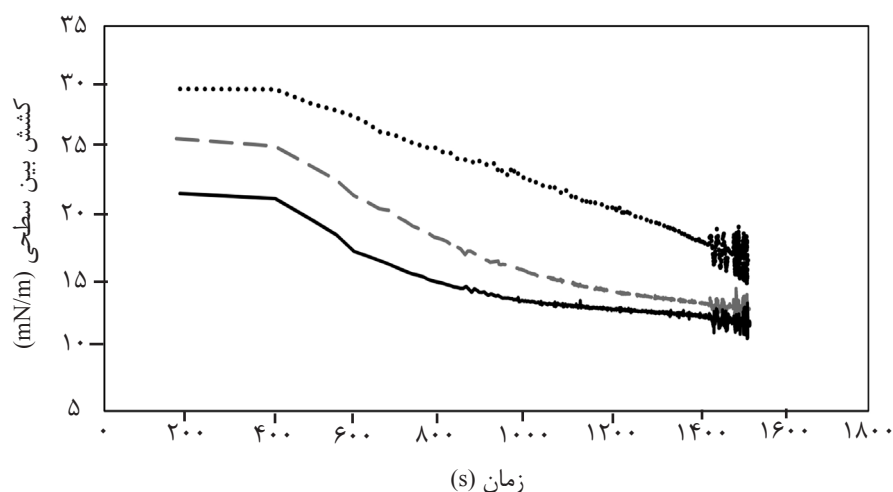
| منبع کربن محیط کشت | | | باکتری |
|---------------------------|------------|-------|-------------------------|
| گلوکز به همراه روغن زیتون | روغن زیتون | گلوکز | |
| ۲۸/۲۶ | ۳۶/۴ | ۳۰/۱۹ | <i>P. putida</i> |
| ۲۳/۹۶ | ۲۷/۸۷ | ۲۹/۰۷ | <i>B. licheniformis</i> |

روی این سطح نیز مشاهده کرد. جذب و دفع سریع این مواد از روی سطح تماس فازی منجر به دامنه تغییرات کشش بین سطحی 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 بین سطحی دو باکتری در هر سه محیط کشت را طی فرکانسهای مختلف نشان می‌دهد.

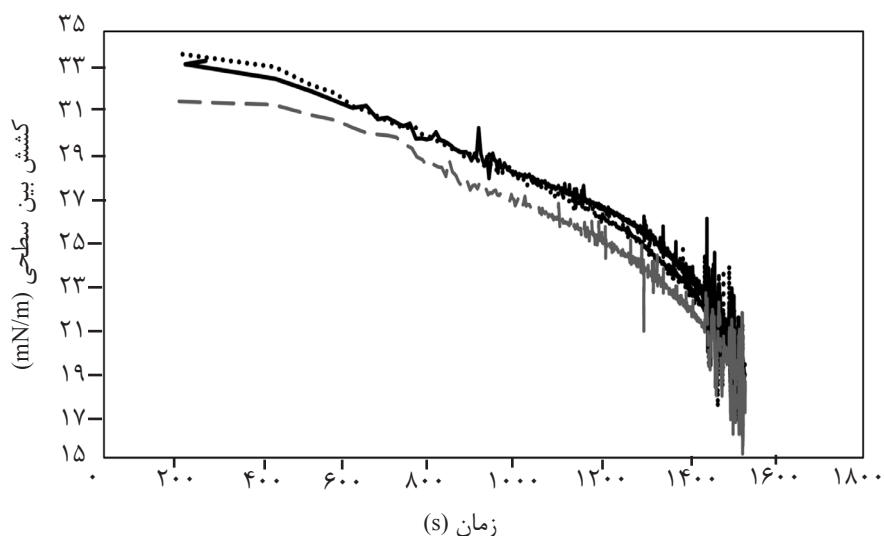
آب‌گریزی سطح سلول و تحرک‌پذیری الکتروفوروتیک باکتری

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 ۲۰-۳۰ 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 به دست آمده رفتار آب‌گریزی هر دو باکتری تحت تأثیر محیط کشت و همچنین میزان و فاز رشد باکتری است.

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 بین سطحی به مدت ۹۰۰ s تا رسیدن کشش بین سطحی به مقدار تعادلی ثابت نگه‌داشته شد. حداقل مقادیر کشش بین سطحی تعادلی برای باکتری *B.licheniformis* در محیط کشت گلوکزی حاصل می‌شود. در مورد محیط کشت‌های باکتری *P.putida* مقادیر کشش بین سطحی 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



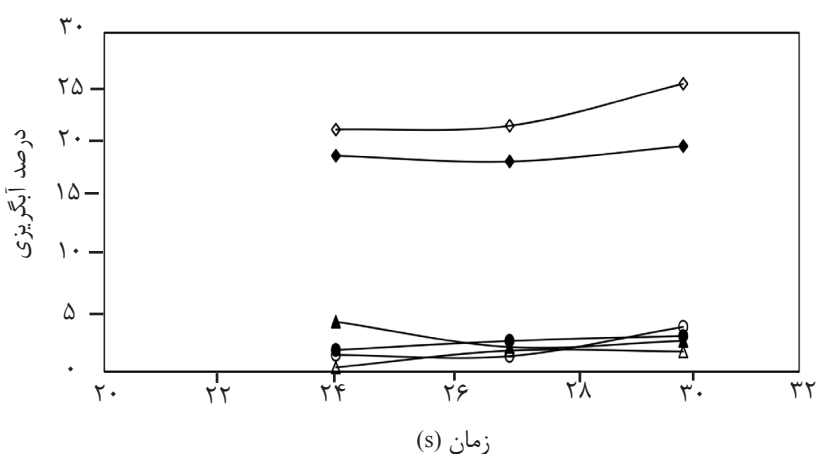
شکل ۳ کشش بین سطحی محیط کشت‌های باکتری *B.licheniformis* با منبع کربن گلوکز (—)، گلوکز به همراه روغن (····) و روغن (- -) در کل زمان اندازه‌گیری (قبل از رسیدن به مقدار تعادلی و پس از آن طی تغییر سینوسی مساحت حفاصل طی چهار فرکانس ۰/۰۲، ۰/۰۵، ۰/۱ hr)



شکل ۴ کشش بین سطحی 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، ۰/۰۵ و ۰/۱ Hz)

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

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



شکل ۵ مقادیر آنگریزی بر حسب زمان آنکوباسیون 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 (◊).

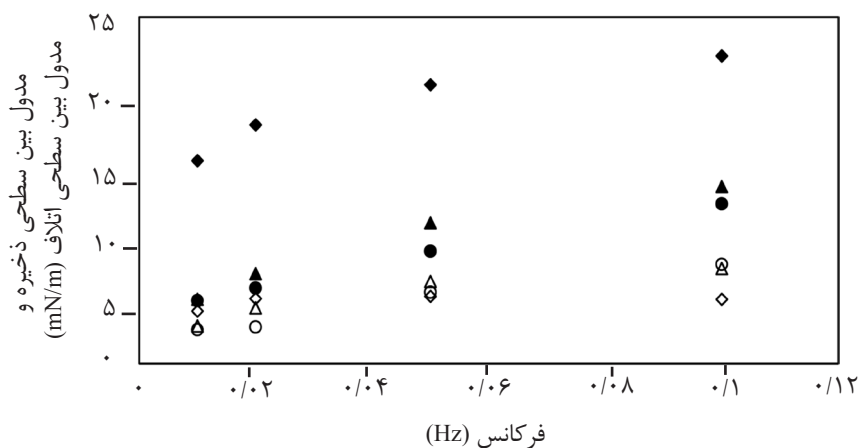
محیط کشت روغنی در سطح تماس آبی-آلی از دو محیط کشت دیگر ویسکوالاستیک تر است. مشاهده مقادیر E'' بر حسب فرکانس برای محیط کشت های این باکتری نشان می دهد با افزایش فرکانس، E'' افزایش می یابد. این موضوع نشان می دهد مدول اتلاف در اثر مقاومت مولکول های سطحی به تغییر شکل است. در واقع با افزایش فرکانس، برخورد و اصطکاک مولکول های بین سطحی افزایش می یابد و در نتیجه منجر به اتلاف بیشتر انرژی صرف شده برای تغییر شکل سطح تماس خواهد شد.

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

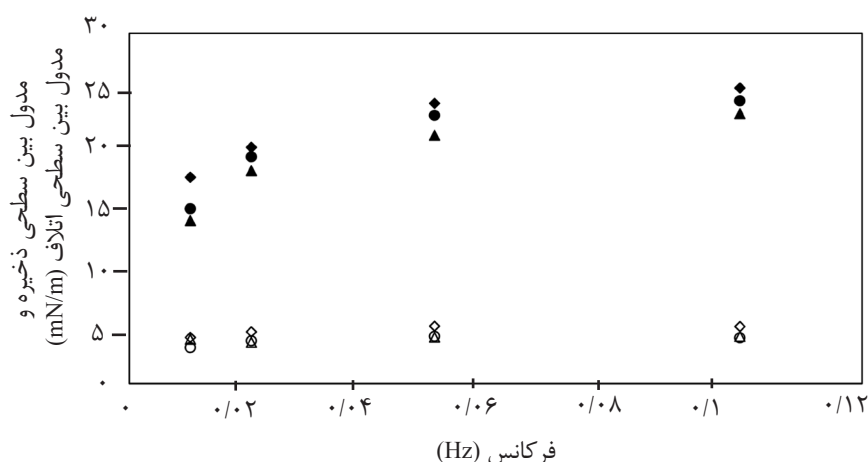
مقایسه مقادیر آگریزی هر دو باکتری، تشابه آگریزی طی رشد در محیط کشت های حاوی گلوکز و گلوکز-روغن را نشان می دهد. همان گونه که مشاهده می شود بیشترین مقادیر آگریزی برای باکتری رشد یافته در محیط کشت روغن به دست آمد. در این محیط، باکتری *P.putida* نسبت به باکتری *B.licheniformis* آگریزی بیشتری از خود نشان داد. نتیجه به دست آمده از اندازه گیری پتانسیل زتا دو باکتری رشد یافته در محیط کشت روغن زیتون، بار منفی بیشتر باکتری *B.licheniformis* ($-19/7$ mV) را در مقایسه با باکتری *P.putida* ($-6/17$ mV) نشان داد. این نتایج با نتایج آگریزی تطابق کامل دارد و تأیید کننده آگریزی بودن *P.putida* رشد یافته در محیط کشت روغنی است.

اندازه گیری رئولوژی بین سطحی

مدول های انبساط-تراکمی بین سطحی که مقیاسی از مقاومت سطح تماس به تغییرات را نشان می دهند از تبدیل فوریه داده های نوسان سینوسی تعیین شدند. این مدول ها به منظور بررسی اثر باکتری ها و متابولیت های تولیدی آنها بر فیلم تشکیل شده در سطح تماس و پایداری امولسیون های شکل گرفته اندازه گیری شدند. همانگونه که در شکل ۶ نشان داده شده فیلم تشکیلی توسط باکتری *B.licheniformis* در



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

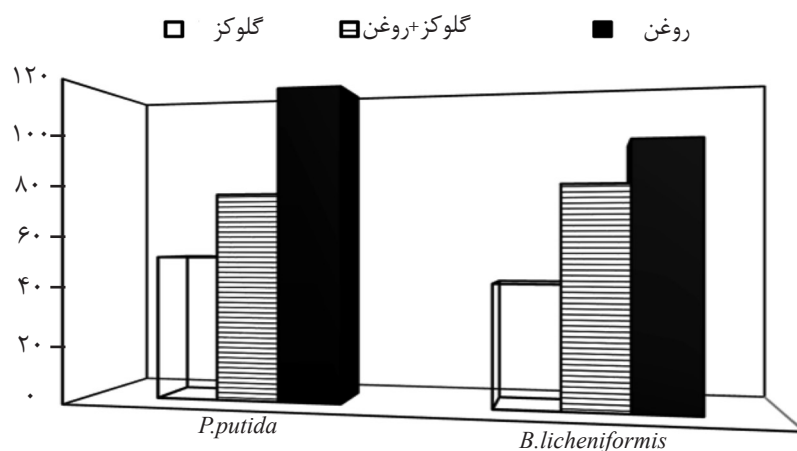


شکل ۷ مدول بین سطحی ذخیره E' (با نمادهای توپر) و اتلاف E'' (با نمادهای توخالی) محیط کشت‌های باکتری *P. putida* طی رشد در سه منبع کربن گلوکز (○)، گلوکز به همراه روغن (△) و روغن (◇).

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.

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



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.

نتیجه گیری

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 آبریزی 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 آبریزی 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 : آبریزی (%)

IFT : کشش بین سطحی (mN/m)

OD : چگالی نوری

ST : کشش سطحی (mN/m)

θ : زاویه تماس (Degree)

Hz : هرتز

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، آبریزی و رشد باکتری نیز نقش مؤثری دارد. مقایسه بین درصدهای کاهش کشش سطحی ناشی از سوپرناتانت دو باکتری *P. putida* و *B. licheniformis* 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 آبریزی 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 آبریزی بیشتر باکتری در محیط کشت روغنی و بنابراین تمایل بیشترش به تشکیل فیلم در سطح تماس آبریز 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

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 Rühls 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]. Rühls 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., Milner 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 Desai A. 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.



Petroleum Research

Petroleum Research 2018 (August-September), Vol. 28, No. 99. 33-36

DOI: 10.22078/pr.2018.2475.2146

Changes in Interfacial Properties of the Fluid/Fluid/Rock Affected by Activity of *Bacillus licheniformis* and *Pseudomonas putida* Bacteria during Growth in Different Carbon

Mansure Farid¹, Shahriar Osfouri^{1*}, Reza Azin² and Seyed Ali Jafari¹

1. Department of Chemical Engineering, Faculty of Petroleum, Gas and Petrochemical Engineering, Persian Gulf University, Bushehr, Iran

2. Department of Petroleum Engineering, Faculty of Petroleum, Gas and Petrochemical Engineering, Persian Gulf University, Bushehr, Iran

osfourii@pgu.ac.ir

DOI: 10.22078/pr.2018.2825.2309

Received: August/26/2017

Accepted: May/26/2018

Abstract

The most important mechanism of microbially enhanced oil recovery processes is changes in interfacial properties of fluid/fluid/rock affected by bacterial cells and their metabolites. In this study, two bacteria *B.licheniformis* and *P.putida* and three different sources of carbon were used. Results showed that due to the effect of carbon source on bacterial growth and also type and value of produced metabolites, changes in interfacial properties of fluid/fluid/rock is affected by used carbon source. The better growth of both bacteria occurred in a culture medium containing glucose. Pendant drop tensiometry, electrophoretic mobility measurement, interfacial dilational rheology and contact angle test were used to investigate the effect of cell structure and culture medium composition on interfacial tension reduction, emulsion stability, and wettability alteration mechanisms. The results of this section showed more potential of *P.putida* bacteria in surfactant production. Also, results showed that glucose is a better culture medium for *B.licheniformis* bacteria. Produced biosurfactants and bacterial culture of *B.licheniformis* bacteria in medium with glucose carbon source reduced surface tension and interfacial tension by 29.07% and 43.87%, respectively. Submerging thin section in glucose culture medium of *B.licheniformis* bacteria reduced the contact angle of water drop from 109.081 to 44.898°. In the case of *P.putida* bacteria, the oily and glucose culture media are respectively the effective media for influencing the fluid-fluid and fluid-rock interface. The produced biosurfactants and bacterial culture of *P.putida* bacteria in medium with olive oil carbon source reduced surface tension and interfacial tension by 36.4% and 27.1%, respectively. The contact angle of drop water was reduced from 109.081 to 54.050° in glucose culture medium of *P.putida* bacteria.

Keywords: *B.licheniformis*, *P.putida*, Interfacial Tension Reduction, Wettability Alteration, Interfacial Rheology, Hydrophobicity

INTRODUCTION

The most important mechanism of MEOR processes is the alteration of oil/water/rock interfacial properties. In the case of fluid-fluid interface modification, interfacial tension (IFT) reduction and rheological properties modification of water-oil interface are the most important governing mechanisms [1]. In addition to biosurfactant production, adhering bacteria and biofilm formation on the interface can cause IFT reduction by altering rheological properties of the interface [2]. Three groups of factors including the characteristics of microbial cells, oil surface properties, and environmental factors are effective in adhering bacteria to an interface [1, 2]. Investigation of bacterial adsorption by interfacial rheometer and pendant drop tensiometer showed biofilm elasticity magnitude was in harmony with the order of measured IFT reduction [2]. In this study, *Bacillus licheniformis* and *Pseudomonas putida* bacteria with different cell structure were investigated to compare their effects on MEOR mechanisms.

EXPERIMENTAL

BACTERIA, CRUDE OIL, THIN SECTION AND MEDIA

The candidate bacteria chosen for this study were *Bacillus licheniformis* and *Pseudomonas putida* obtained from IBRC¹. The crude oil was a relatively light oil with API= 33.9 from NISOC². The used thin sections were taken from a carbonate reservoir in the southern Iran. Two types of media were used to culture bacteria. The first medium used to enhance the growth bacteria was Luria Bertani (LB) broth (Merck, Germany) and the second medium was minimal salt medium optimized by Joshi et al. [3]. Olive oil was used as the hydrophobic substrate.

METHODS

Experimental measurements were carried out on the three minimal medium with glucose, olive oil and equal mixture of them as carbon sources. Optical density (OD) was measured using a spectrophotometer (Lambda 25, Perkin Elmer) at 600nm every 4h for a period of 48h and then every 12h until 72h. The bacterial supernatant was prepared by centrifuging bacterial suspension at 5500 rpm for 10min. For measuring the bacterial cell hydrophobicity, solutions of 24, 30 and 34h incubated bacteria in the 10X phosphate buffer with pH=7 were prepared. We measured the OD of the sample before and after mixing with normal hexadecane (with a ratio of 6). Then we calculated bacterial adhesion (BATH). For contact-angle experiments, oil-wet thin sections were soaked into bacterial solutions for 48 hours, and finally, contact angles were measured by placing the water drop on the surfaces. The oil-wet thin section before soaking it into bacterial solutions was used as the control sample.

RESULTS AND DISCUSSIONS

BACTERIAL GROWTH

Figure 1 shows the improved growth of *B.licheniformis* in comparison with *P.putida*. The results indicated that high concentration of glucose in the culture medium does not lead to better growth of the bacterium. Surface activity: The results of surface tension (ST) measurements in Table 1 showed that the maximum ST reduction percentage of *B.licheniformis* and *P.putida* supernatant were related to the culture mediums with glucose and olive oil as carbon source respectively.

1. Iranian Biological Resource Center

2. National Iranian South Oil Company

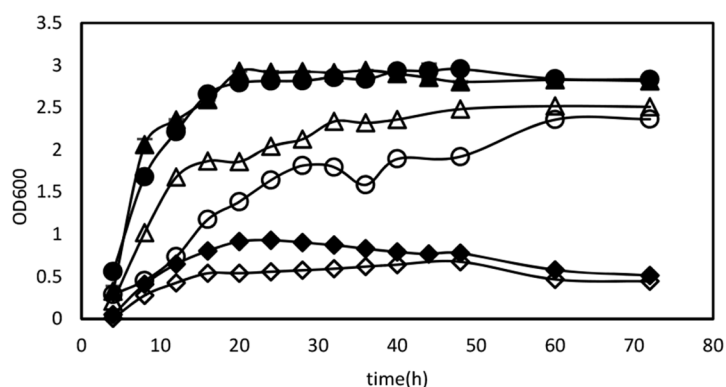


Figure 1: Time-course profile of *B.licheniformis* (solid Symbols) and *P.putida* (hollow symbols) growth in three media containing carbon glucose (○), glucose-oil (Δ) and oil (◆).

Table 1: The ST reduction percentages of supernatant solutions of *B.licheniformis* and *P. putida* bacteria

| bacteria | Batch culture carbon source | | |
|------------------------|-----------------------------|-----------|---------------------|
| | glucose | Olive oil | Glucose + olive oil |
| <i>P.putida</i> | 30.19 | 36.4 | 28.26 |
| <i>B.licheniformis</i> | 29.07 | 27.87 | 23.96 |

Comparison of the two bacteria in biosurfactant production showed that *P.putida* bacteria is more potent.

Dynamic IFT in the water-oil interface between 48h incubated bacterial culture as water phase and n-hexadecane as oil phase by pendant drop tensiometry method were measured. The drop size was fixed for 900 s. In the case of *B.licheniformis*, glucose culture medium due to more surfactant has minimum equilibrium IFT and range of IFT changes. In the case of *P.putida* all three cultures of *P.putida* have an approximately equivalent range of IFT changes.

HYDROPHOBICITY

To compare the tendency of the two bacteria to adsorb at a hydrophobic interface, BATH test and bacterial electrophoretic mobility were measured. Results showed that *P.putida* is more hydrophobic than *B.licheniformis* due to its less negative charge (-6.17 mV as compared to -19.7 mV) and higher BATH (%) value. In addition,

bacterial culture with olive oil carbon source had the highest hydrophobicity values.

INTERFACIAL RHEOLOGY

The loss and storage modules were determined from Fourier transform of sinusoidal oscillation data. Moreover, these modules were measured to determine the effect of bacteria and their metabolites on the film at the interface and the stability of the formed emulsions. The results of Figure 2, show in the case of *B.licheniformis* when aqueous phase is culture medium with olive oil, the formed biofilm is more viscoelastic. Comparison of the formed biofilms by *B.licheniformis* and *P.putida* show *P.putida* culture media form more viscoelastic biofilms. The results of measuring the contact angle of the water drop in the gas/water/rock system showed the wettability alteration toward more water-wet condition when thin sections were soaked in culture solution with glucose carbon source.

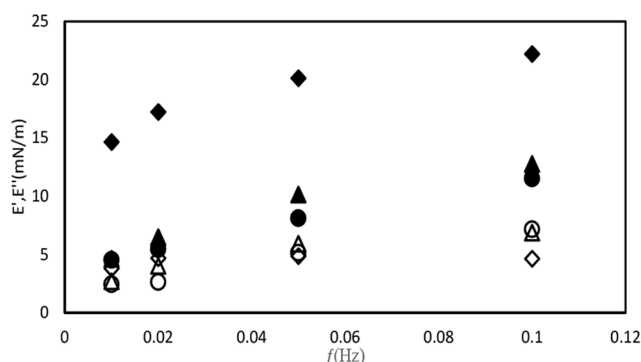


Figure 2: Interfacial elastic E' (solid symbols) and viscous E'' (hollow symbols) moduli for *B.licheniformis* cultures with glucose (○), glucose with oil (△) and oil (◆) carbon source.

CONCLUSIONS

In this research, the effect of culture medium on most important mechanisms in MEOR processes namely IFT reduction and wettability alteration was studied. The results of rheological studies on the formation of a stable film at water-oil interface showed the positive role of bacterial cells and the inhibitory role of surfactants in increasing network points. The results of the experiments showed that *B.licheniformis* bacteria with a less hydrophobicity forms a hydrophilic film that has the ability to accumulate at water-carbonate rock interface. On the other hand, the *P.putida* bacterium forms a hydrophobic film that has an accumulation potential at the water-oil interface.

REFERENCES

- [1]. 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.
- [2]. Rühls 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.

- [3]. Joshi S., Yadav S. and Desai A. 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.