

Doctor

José Luis Salazar

Director de División de Nuevas Creaciones (C
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMER

E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-133429- -00007-0000

Fecha: 2014-09-30 16:34:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 21

Referencia: Expediente No. 13.133.429

Solicitud de Patente de Invención titulada: "Prevención de la agregación de
biomasa en pozos de inyección"

Solicitante: E.I Du Pont de Nemours and Company

RESPUESTA AL AUTO NOTIFICADO POR FIJACIÓN EN LISTA
DEL 8 DE JULIO DE 2014, OFICIO NO. 8001 (EXAMEN DE FONDO)

ÁLVARO CORREA ORDÓÑEZ, mayor de edad y vecino de Bogotá D.C., identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de la sociedad en referencia, doy respuesta al auto emanado por ese Despacho dentro del término legal:

1. Objeciones del Examinador**1.1 Claridad de la solicitud**

El examinador establece que las reivindicaciones 1, 12, 14, 16 no son claras porque contienen las expresiones "aproximadamente" y "al menos".

Así mismo, se menciona que las reivindicaciones 1, 4 y 6 no son claras porque comprende expresiones generales como "microorganismos", "fluidos", "primera formulación de solución de nutriente", "segunda formulación de solución nutriente", "periodo de cierre", y "periódicamente".

Por último, se afirma que las reivindicaciones 1,2 y 17 no son claras porque comprenden características funcionales que no le pueden brindar novedad ni nivel inventivo a las reivindicaciones tales como: *"donde la primera solución sustenta el crecimiento de uno o más microorganismo de (a) en el lugar subterráneo objetivo pero no fomenta la agregación de biomasa ni la producción de biopelículas, en donde la segunda formulación de solución nutriente fomenta el biotaponamiento de poros y canales en el lugar subterráneo objetivo", "ayuda a mover la suspensión de uno o más microorganismo de (a) al sitio subterráneo objetivo", "el lactato fomenta el crecimiento de la Pseudomonas stutzeri y mantiene la P. stutzeri en suspensión" y "que fomenta la formación de biotaponos mediante la cepa P stutzeri de (a)".*

1.2 Descripción

El examinador requiere que se presente el depósito de material biológico de los microorganismos nombrados en la descripción y el capítulo reivindicatorio (reivindicaciones 9 y 17).

1.3 Novedad

El Examinador ha reconocido la novedad de la presente invención.

1.4 Nivel inventivo

El examinador considera que las reivindicaciones 1 y 6 a 17 de la solicitud en estudio carecen de nivel inventivo debido a las enseñanzas de **D1** (US 2009/0263887) y que las reivindicaciones 1 a 9 y 17 no tienen nivel inventivo debido a las enseñanzas del documento **D2** (Artículo 1¹)

Con relación a la reivindicación 1 de la solicitud en estudio y al compararla con lo descrito en los documentos D1 y D2, el examinador en forma resumida establece lo siguiente:

¹ "In Situ Biosurfactant Production by Bacillus Strains injected into a Limestone Petroleum Reservoir"

"Los documentos D1 y D2 se consideran el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 1, porque divulgan métodos de recuperación de hidrocarburos con bacterias.

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1 y el método del documento D1 consiste en que D1 no menciona la adición opcional de fluidos después de la inyección de la suspensión de bacterias.

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1 y el método del documento D2 consiste en que en D2 no se menciona la adición de diversas formulaciones de nutrientes después de la inyección de la suspensión de bacterias.....(...)....

Sin embargo, la inyección de agua posterior a la inyección de las bacterias, ya está divulgado en el documento D2 que se refiere a la producción de hidrocarburos de un pozo de producción.

En consecuencia, una persona normalmente versada en la materia incluiría la adición de agua posterior a la inyección de las bacterias de D2 como etapa de recuperación de hidrocarburos en el procedimiento de la anterioridad D1, esperando con certeza lograr el método, como el de la reivindicación 1 de la solicitud, lo cual es considerado obvio y, por lo tanto, sin altura inventiva...(....)....

Con relación a la reivindicación 17 el examinador establece en forma resumida lo siguiente:

" Los documentos D1 y D2 se consideran el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 17, porque divulgan métodos de recuperación de hidrocarburos con bacterias.

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 17 y el método del documento D1 consiste en que D1 no menciona la adición opcional de fluidos después de la inyección de la suspensión de bacterias.

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 17 y el método del documento D2 consiste en que en D2 no se menciona la adición de diversas formulaciones de nutrientes después de la inyección de la suspensión de bacterias ni la que las bacterias corresponden a

la especie *Pseudomonas stutzeri*.

El efecto que logra el incluir la adición opcional de fluidos después de la inyección de la suspensión de bacterias es que permiten la obtención de hidrocarburos de forma más eficiente al trasladar la suspensión de bacterias al sitio deseado en la formación subterránea....(...).

Sin embargo, la inyección de agua posterior a la inyección de las bacterias, ya está divulgado en el documento D2 que se refiere a la producción de hidrocarburos de un pozo de producción (Pág. 1240, Párr. 3).

En consecuencia, una persona normalmente versada en la materia incluiría la adición de agua posterior a la inyección de las bacterias de D2 como etapa de recuperación de hidrocarburos en el procedimiento de la anterioridad D1, esperando con certeza lograr el método, como el de la reivindicación 17 de la solicitud, lo cual es considerado obvio y, por lo tanto, sin altura inventiva...(...).

2. Argumentos a favor de la patentabilidad de la solicitud

2.1 Modificación a una solicitud en trámite

Con el objeto de atender a las anteriores observaciones y de conformidad con el artículo 34 de la Decisión 486 que permite al solicitante en cualquier momento del trámite modificar su solicitud sin que se presente ampliación a la invención inicialmente presentada, se presenta un nuevo pliego reivindicatorio conformado por 16 reivindicaciones.

2.2 Claridad de las reivindicaciones

Con relación a las expresiones "aproximadamente" y "al menos" informamos a su Despacho que la palabra "aproximadamente" se canceló del pliego reivindicatorio. Ahora bien con relación a la expresión "al menos", aclaramos que dicha expresión no se encuentra en ninguna parte del capítulo reivindicatorio.

El preámbulo de la reivindicación 1 se modificó con el fin de superar las observaciones de claridad. Así mismo, se cambió la palabra microorganismos por "*Pseudomonas stutzeri*".

Adicionalmente, la reivindicación 1 se limitó con limitaciones de la reivindicación 11 de la siguiente forma:

"Un método para la prevención de la agregación de biomasa en un lugar subterráneo objetivo; el método comprende las etapas de:

- a) preparar una suspensión de biomasa que comprende una o más especies de Pseudomonas stutzeri;*
 - b) introducir la suspensión de (a) a un pozo de inyección del lugar subterráneo objetivo;*
 - c) opcionalmente, introducir uno o más fluidos al pozo de inyección;*
 - d) introducir una primera formulación de solución nutriente al pozo de inyección, en donde la primera solución nutriente sustenta el crecimiento de uno o más microorganismos de (a) en el lugar subterráneo objetivo pero no fomenta la agregación de biomasa ni la producción de biopelículas; y*
 - e) introducir una segunda formulación de solución nutriente al pozo de inyección, en donde la segunda formulación de solución nutriente fomenta el biotaponamiento de poros y canales en el lugar subterráneo objetivo;*
- en donde la primera formulación de solución nutriente comprende lactato y no acetato".*

Por lo tanto, se cancela la reivindicación 11.

- Con relación a la observación de su Despacho en cuanto a que las reivindicaciones 1, 2 y 17 comprenden expresiones que son características funcionales que no le brindan novedad ni nivel inventivo a las reivindicaciones de las cuales depende.

Respetuosamente, aclaramos a su Despacho que estas expresiones son características esenciales de la invención y de ninguna manera hacen que las reivindicaciones carezcan de claridad por el contrario estas características ayudan a entender en qué consiste la invención.

En conexión con lo anterior, me permito dirigir la atención de su Despacho a las enseñanzas de la guía para examen de solicitudes de patente de invención y modelo de utilidad expedida por la Superintendencia de Industria y Comercio, en su página 77:

"Las reivindicaciones deben incluir características estructurales y funcionales cuando para la persona del oficio normalmente versada en la materia no sea obvio el funcionamiento de los elementos característicos y la relación entre estos. Por ejemplo: (Lo subrayado son características funcionales):

1. Sacacorchos, caracterizado por estar compuesto de un cuerpo principal o palanca (1), en cuya parte intermedia se sitúa una rosca helicoidal o tirabuzón (3) abatible mediante un eje de sujeción (2), y en el extremo de este cuerpo principal existe otro eje (7) por el que bascula un brazo acanalado (8) acabado en forma de convexa (17) para servir de punto de apoyo al cuello de la botella y que posee en los laterales y enfrentados entre sí unas ranuras (12) por las que se deslizan las prolongaciones establecidas a tal efecto del citado eje (7).

Por otro lado, las reivindicaciones pueden incluir características estructurales y funcionales cuando para la persona del oficio normalmente versada en la materia sea obvio el funcionamiento de los elementos característicos y la relación entre estos.

Por lo anteriormente expuesto es claro que las reivindicaciones pueden o deben incluir características funcionales, en ninguna parte de la guía se menciona que las características funcionales no se deben tener en cuenta para el estudio de fondo.

2.3 Descripción

Con relación a la solicitud de su Despacho, presentó copia de los certificados de depósitos del material biológico nombrados en la descripción y en las reivindicaciones.

2.4 Novedad

Su Despacho reconoce la novedad de la solicitud en estudio. Por lo tanto, el requisito a sustentar es el nivel inventivo.

2.5 Nivel inventivo

El nivel inventivo de una solicitud se encuentra definido en el Artículo 18 de la Decisión 486 y se establece cuando "*si para una persona del oficio normalmente versada en la*

materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica”.

Contrario a lo que plantea el Examinador, los documentos del arte previo no afectan el nivel inventivo de la presente solicitud por cuanto dichas documentos no son relevantes para la solicitud en estudio debido a lo siguiente:

El documento D1 describe la recuperación mejorada del petróleo mediante *Pseudomonas stutzeri*. Mientras que la solicitud en estudio describe un método para prevenir el biotaponamiento en inglés "bio-plugging" en el sitio de inyección y describe la alimentación de diferentes medios- primer medio para mejorar el crecimiento microbiano mientras se mueve hacia el sitio objetivo y el segundo medio para mejorar el bio-taponamiento en el sitio objetivo y fuera de la inyección.

Por lo que respetuosamente mi representada no encuentra ninguna relevancia entre el documento D1 y la presente solicitud de patente.

Por otro lado, el documento D2 describe la producción de un biosurfactante mediante cepas *Bacillus* no revela la adición gradual de dos formulaciones de medio de crecimiento diferentes para evitar el bio-taponamiento.

Por lo que no se entiende cómo el examinador puede sostener que los documentos D1 y D2 afectan el nivel inventivo de la solicitud en estudio.

En consecuencia, tenemos que la invención propuesta por el solicitante si cumple con los requisitos de patentabilidad y de esta manera es susceptible de ostentar el título de patente de invención.

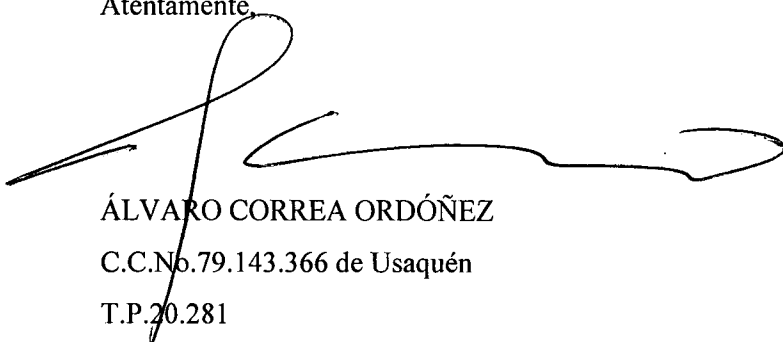
3. Solicitudes concedidas en otros países para esta misma invención.

A manera informativa, pongo en conocimiento del Examinador que la patente US 8,720,546 equivalente a la presente solicitud colombiana ha sido otorgada. Aún cuando entiendo que esta decisión de ninguna manera obligan al Despacho para decidir de igual forma, considero que por tratarse de una pregunta fáctica la determinación de la existencia de novedad, nivel

inventivo y aplicación industrial, las decisiones de otras oficinas de patentes constituyen un antecedente persuasivo en la materia.

En virtud de lo anterior, solicito que se acepten las razones expuestas en el presente documento y en consecuencia, se otorgue el privilegio de patente de invención para el invento que se tramita en este expediente.

Atentamente,



ÁLVARO CORREA ORDÓÑEZ

C.C.No.79.143.366 de Usaquén

T.P.20.281

Anexos: - Capítulo reivindicatorio modificado conformado por 16 reivindicaciones
 - Copia en inglés y en español de los certificados de material biológico
 - Copia de la carátula y reivindicaciones de la patente US 8,720,546.

BOGMGT/BOGDMS-#2375705-V1-P2013_000013-MEMORIAL_RESPUESTA_A_FONDO.DOC

9

REIVINDICACIONES MODIFICADAS PARA LA SOLICITUD DE PATENTE

NO.13.133.429

1. Un método para la prevención de la agregación de biomasa en el pozo de inyección de un sitio objetivo subterráneo, que comprende las etapas de:

- a) preparar una suspensión de biomasa que comprende una o más especies de *Pseudomonas stutzeri*;
- b) introducir la suspensión de (a) a un pozo de inyección del lugar subterráneo objetivo;
- c) opcionalmente, introducir uno o más fluidos al pozo de inyección;
- d) introducir una primera formulación de solución nutriente al pozo de inyección, en donde la primera solución nutriente sustenta el crecimiento de uno o más microorganismos de (a) en el lugar subterráneo objetivo pero no fomenta la agregación de biomasa ni la producción de biopelículas; y
- e) introducir una segunda formulación de solución nutriente al pozo de inyección, en donde la segunda formulación de solución nutriente fomenta el biotaponamiento de poros y canales en el lugar subterráneo objetivo;

en donde la primera formulación de solución nutriente comprende lactato y no acetato.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde uno o más fluidos de (c) ayuda a mover, la suspensión de uno o más microorganismos de (a) al sitio subterráneo objetivo.

3. El método de conformidad con la reivindicación 1, que comprende, además, introducir uno o más fluidos al pozo de inyección después de la etapa (d).

4. El método de conformidad con la reivindicación 1 o 3, que comprende, además, aplicar un periodo de cierre después de la etapa (d) o después de introducir uno o más fluidos al pozo de inyección después de la etapa (d).

5. El método de conformidad con la reivindicación 1, que comprende, además, introducir uno o más fluidos al pozo de inyección después de la etapa (e).

6. El método de conformidad con la reivindicación 5, que comprende, además, introducir periódicamente una segunda formulación de solución nutriente entre la introducción de fluidos.

7. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde la suspensión de biomasa de (a) se prepara en la primera solución nutriente.

8. El método de conformidad con la reivindicación 7, en donde se omite la etapa (d).

9. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde una o más especies de microorganismos se seleccionan de un grupo que consiste en *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Actinomycetes*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Arcobacter*, *Schizomycetes*,

M

Corynebacteria, *Achromobacteria*, *Enterobacteria*, *Nocardia*,
Saccharomycetes, *Schizosaccharomyces*, *Vibrio*, *Shewanella*,
Thauera, *Petrotoga*, *Microbulbifer*, *Marinobacteria*, *Fusibacteria*
y *Rhodotorula*.

10. El método de conformidad con la reivindicación 4, en donde una o más especies de microorganismos se seleccionan de un grupo que consiste en *Pseudomonas stutzeri* BR5311 (ATCC núm. PTA-11283) y *Pseudomonas stutzeri* LH4:15 (ATCC núm. PTA-8823).

11. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde la concentración de lactato en la primera formulación de solución nutriente es de 25 partes por millón a 10,000 partes por millón.

12. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde la primera y la segunda formulaciones de soluciones nutrientes comprenden nitrato.

13. El método de conformidad con la reivindicación 8, en donde la concentración de nitrato es de 20 partes por millón a 10,000 partes por millón.

14. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde la segunda formulación de solución nutriente comprende acetato.

15. El método de conformidad con la reivindicación 14, en donde la concentración de acetato en la segunda formulación

de solución nutriente es de 100 partes por millón a 10,000 partes por millón.

16. Un método para el tratamiento de un lugar subterráneo objetivo; el método comprende las etapas de, en orden:

- a) preparar una suspensión de biomasa que comprende una o más cepas de *Pseudomonas stutzeri*;
- b) introducir la suspensión de (a) a un pozo de inyección del lugar subterráneo objetivo;
- c) opcionalmente, introducir uno o más fluidos al pozo de inyección;
- d) introducir una primera formulación de solución nutriente al pozo de inyección, en donde la primera solución nutriente comprende lactato y no acetato, y en donde el lactato fomenta el crecimiento de la *Pseudomonas stutzeri* y mantiene la *Pseudomonas stutzeri* en suspensión; y
- e) introducir una segunda formulación de solución nutriente al pozo de inyección, en donde la segunda formulación nutriente comprende acetato, y en donde el acetato fomenta la formación de biotaponos mediante la cepa *Pseudomonas stutzeri* de (a).



US008720546B2

(12) **United States Patent**
Alsop et al.

(10) **Patent No.:** **US 8,720,546 B2**
(45) **Date of Patent:** **May 13, 2014**

(54) **PREVENTION OF BIOMASS AGGREGATION
AT INJECTION WELLS**

(56) **References Cited**

U.S. PATENT DOCUMENTS

(75) Inventors: **Albert W. Alsop**, Wilmington, DE (US);
Sheryl M. Anyzek, Elkton, MD (US);
Robert D. Fallon, Elkton, MD (US);
Edwin R. Hendrickson, Hockessin, DE
(US); **Sharon Jo Keeler**, Bear, DE (US);
Abigail K. Luckring, West Chester, PA
(US); **Michael P. Perry**, Downingtown,
PA (US)

4,799,545	A	1/1989	Silver et al.	
4,905,761	A *	3/1990	Bryant	166/246
4,947,923	A	8/1990	Rikker	
5,083,611	A *	1/1992	Clark et al.	166/246
5,327,967	A	7/1994	Jenneman et al.	
5,360,064	A *	11/1994	Jenneman et al.	166/246
5,363,913	A *	11/1994	Jenneman et al.	166/246
5,368,099	A *	11/1994	Davey et al.	166/246
5,531,895	A *	7/1996	Alford et al.	210/610
6,758,270	B1	7/2004	Sunde et al.	
8,357,526	B2 *	1/2013	Keeler et al.	435/253.3
2009/0029879	A1 *	1/2009	Soni et al.	507/201
2009/0263887	A1	10/2009	Keller et al.	
2010/0081585	A1	4/2010	Fallon	
2011/0244554	A1	10/2011	Alsop	

(73) Assignee: **E I du Pont de Nemours and
Company**, Wilmington, DE (US)

(*) Notice: Subject to any disclaimer, the term of this
patent is extended or adjusted under 35
U.S.C. 154(b) by 314 days.

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

WO 2009017810 A1 2/2009

OTHER PUBLICATIONS

Ramkrishna, Biotechnology in petroleum recovery: The microbial
EOR, Prog. Energy Com. Sci., vol. 34, 2008, pp. 714-724.
U.S. Appl. No. 61/408,734, filed Nov. 1, 2010, inventors Robert D.
Fallon et al.
International Search Report, PCT/US2001/058754, Mail date May
10, 2012.

* cited by examiner

Primary Examiner — George Suchfield

(57) **ABSTRACT**

Disclosed herein is introduction of different nutrient solution
formulations to a subterranean target site to prevent biofilm
formation and biomass aggregation at the sand face of an
injection well bore during MEOR or bioremediation pro-
cesses. A first nutrient solution formulation supports growth
of introduced microorganisms and a second nutrient solution
formulation is used to promote biofilm formation to allow
plugging of pores and channels in the subterranean target site,
for MEOR or bioremediation.

15 Claims, 1 Drawing Sheet

(21) Appl. No.: **13/280,760**

(22) Filed: **Oct. 25, 2011**

(65) **Prior Publication Data**
US 2012/0273189 A1 Nov. 1, 2012

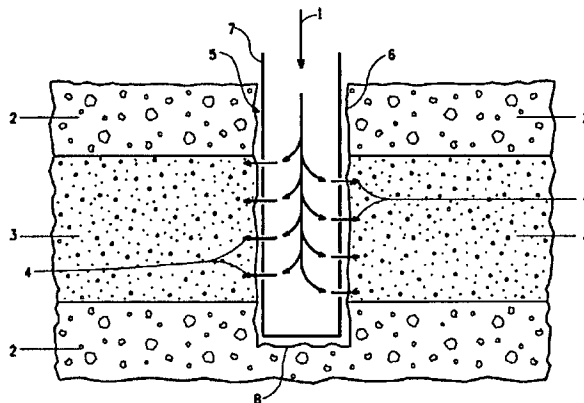
Related U.S. Application Data

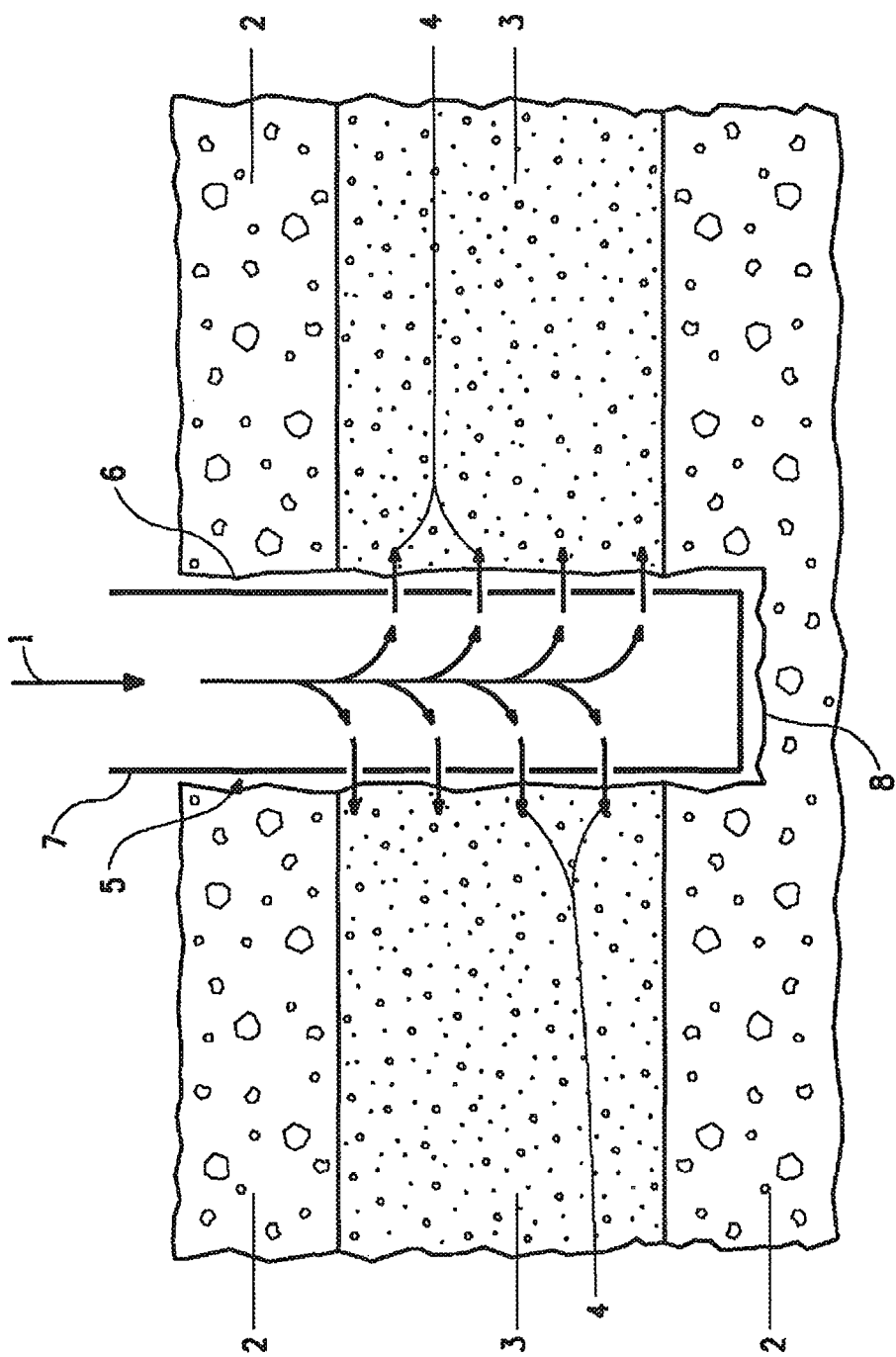
(60) Provisional application No. 61/408,731, filed on Nov.
1, 2010.

(51) **Int. Cl.**
E21B 43/22 (2006.01)
C09K 8/582 (2006.01)

(52) **U.S. Cl.**
USPC **166/246**; **166/263**; **166/270**; **166/305.1**;
166/400; **435/253.3**; **435/262.5**; **435/281**;
507/201

(58) **Field of Classification Search**
None
See application file for complete search history.





1,000 ppm; sodium nitrate: 2,000 ppm; yeast extract: 100 ppm; ammonium chloride: 100 ppm; sodium dihydrogen phosphate: 20 ppm; pH (adjusted with NaOH or HCl as needed) 6.5 to 7.0. The ingredients were mixed by circulating the contents of the tank, producing a first nutrient solution formulation.

A block of frozen stock of *Pseudomonas stutzeri* strain BR5311 biomass was added to the tank. Circulation of the contents of the tank was continued to provide mixing of the first nutrient solution formulation around and over the frozen block to accelerate the thawing process. Completion of the thawing process was determined by either visual observation of the block, if it was floating, or by monitoring turbidity of the suspension by optical density (OD₆₀₀ nanometer, nm).

The tank truck containing the suspension of the *Pseudomonas stutzeri* BR5311 biomass in the first nutrient solution formulation was driven to the injection well. To inoculate the well, the tank was connected through a filtration apparatus designed to stop any large pieces of biomass from passing through, which is a biomass dispersing device described in US Patent Application Publication 20110244554, to a high pressure injection pump. The high pressure pump was then used to transfer the biomass from the tank truck to the injection well for deposition into the subterranean target site. The rate of injection was determined by the maximum allowable injection pressure into the reservoir. The injection pressure remained below the fracture pressure of the rock strata containing the oil while pumping the inoculum. In fact, no increase in injection pressure was observed while pumping the inoculum into the injector well indicating that the microbes did not form a biofilm at the face of the well bore.

Example 8

Triggering Biofilm Formation by *Pseudomonas Stutzeri* (Strain BR5311) Using Acetate

Following injection of the biomass into the injection well as described in Example 7, the biomass was pushed deeper into the subterranean strata by pumping injection brine overnight into the injector well for 16 hours. This was followed by the injecting 6 cubic meters of the first nutrient solution formulation containing lactate as specified in Example 5. During pumping of the brine and the first nutrient solution there was no increase in the injection pressure indicating that the microbes had not formed any biofilms yet in the reservoir. The injector well was shut in for 5 days. Following this shut in 1,000 L of a second nutrient solution formulation was pumped into the injector well. This second nutrient solution contained: sodium acetate: 9 wt %; sodium nitrate: 18 wt %; yeast extract: 4500 ppm; ammonium chloride: 13500 ppm; sodium dihydrogen phosphate: 500 ppm. The addition of this second nutrient solution was repeated every other week for 6 months. At this time, the injection pressure of the well had increased 150 psi. No acetate or lactate was observed in the production water of the producer well that communicated with this injector. These results clearly showed that the *Pseudomonas stutzeri* cells were growing and consuming the acetate in the second nutrient solution formulation, and were producing biofilms and bioplugs in the pores of the subterranean target site thus altering the target site's permeability.

What is claimed is:

- 1. A method for treatment of a subterranean target site comprising the steps of, in order:
 - a) preparing a biomass suspension comprising one or more species of microorganisms;

- b) introducing the suspension of (a) into an injection well bore of the subterranean target site;
- c) optionally introducing one or more fluids into the injection well bore;
- d) introducing a first nutrient solution formulation into the injection well bore wherein said first nutrient solution supports growth of one or more microorganisms of (a) at said subterranean target site but does not promote biomass aggregation and biofilm production; and
- e) introducing a second nutrient solution formulation into the injection well bore wherein said second nutrient solution formulation promotes bioplugging of pores and channels in the subterranean target site.
- 2. A method for treatment of a subterranean target site, comprising the steps of, in order:
 - a) preparing a biomass suspension comprising one or more strains of *Pseudomonas stutzeri*;
 - b) introducing the suspension of (a) into an injection well bore of the subterranean target site;
 - c) optionally introducing one or more fluids into said injection well bore;
 - d) introducing a first nutrient solution formulation into the injection well bore wherein said first nutrient solution comprises lactate and no acetate, and wherein the lactate promotes growth of the *Pseudomonas stutzeri* and maintains the *Pseudomonas stutzeri* in suspension; and
 - e) introducing a second nutrient solution formulation into the injection well bore wherein said second nutrient solution comprises acetate, and wherein the acetate promotes bioplug formation by the *Pseudomonas stutzeri* strain of (a).
- 3. A method for treatment of a subterranean target site comprising the steps of, in order:
 - a) preparing a biomass suspension comprising one or more species of microorganisms;
 - b) introducing the suspension of (a) into an injection well bore of the subterranean target site;
 - c) optionally introducing one or more fluids into the injection well bore;
 - d) introducing a first nutrient solution formulation into the injection well bore wherein said first nutrient formulation comprises lactate and no acetate and wherein said first nutrient formulation supports growth of one or more microorganisms of (a) at said subterranean target site but does not promote biomass aggregation and biofilm production; and
 - e) introducing a second nutrient solution formulation into the injection well bore wherein said second nutrient solution formulation promotes bioplugging of pores and channels in the subterranean target site.
- 4. The method of claim 3 wherein step (c) is not optional and wherein one or more fluids of (c) assists moving the suspension of one or more microorganisms of (a) into the subterranean target site.
- 5. The method of claim 3 further comprising introducing one or more fluids into the injection well bore following step (d).
- 6. The method of claim 3 or 3 further comprising applying a shut-in period following step (d) or following introducing one or more fluids into the injection well bore after step (d).
- 7. The method of claim 6 wherein said one or more species of microorganisms is selected from the group consisting of *Pseudomonas stutzeri* BR5311 (ATCC No. PTA-11283) and *Pseudomonas stutzeri* LH4:15 (ATCC No. PTA-8823).
- 8. The method of claim 3 further comprising introducing one or more fluids into the injection well bore following step (e).

17

18

9. The method of claim 8 further comprising periodically introducing additional second nutrient solution formulation between introducing fluids.

10. The method of claim 3 wherein said one or more species of microorganisms is selected from a group consisting of *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Actinomycetes*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Arcobacter*, *Schizomycetes*, *Corynebacteria*, *Achromobacteria*, *Enterobacteria*, *Nocardia*, *Saccharomycetes*, *Schizosaccharomyces*, *Vibrio*, *Shewanella*, *Thauera*, *Petrotoga*, *Microbulbifer*, *Marinobacteria*, *Fusibacteria* and *Rhodotorula*.

11. The method of claim 3 wherein concentration of lactate in the first nutrient solution formulation is from about 25 parts per million to about 10,000 parts per million.

12. The method of claim 3 wherein the first and the second nutrient solution formulations comprise nitrate.

13. The method of claim 12 wherein concentration of nitrate is from about 20 parts per million to about 10,000 parts per million.

14. The method of claim 3 wherein the second nutrient solution formulation comprises acetate.

15. The method of claim 14 wherein the concentration of acetate in the second nutrient solution formulation is from about 100 parts per million to about 10,000 parts per million.

* * * * *

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN THE APPLICATION OF:

ALBERT W. ALSOP et al.

CASE NO.: CL5123USNA

APPLICATION NO.:

CONFIRMATION NO.:

GROUP ART UNIT:

EXAMINER:

FILED:

FOR: PREVENTION OF BIOMASS AGGREGATION AT INJECTION WELLS

DECLARATION OF BIOLOGICAL CULTURE DEPOSIT

Via EFS-Web

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

I, ROGER W. HERRELL, JR., declare the following:

- a) I am an attorney/agent of record in the above-identified application;
- b) Pursuant to 37 CFR 1.804, cultures of the following biological materials have been deposited with the following international depository(ies):

American Type Culture Collection (ATCC)
10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, U.S.A.

under conditions that satisfy the requirements of the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure ["the Treaty"];

- c) A copy of the receipt issued pursuant to Treaty Rules 7.3 and 10.2 is attached; and

<u>Depositor's Identification of Organism</u>	<u>International Depository Accession Number</u>	<u>Date of Deposit</u>
Pseudomonas stutzeri BR5311	PTA-11283	September 9, 2010
Pseudomonas stutzeri LH4:15	PTA-8823	December 4, 2007
Pseudomonas stutzeri 89AC1-3	PTA-11284	September 9, 2010
Arcobacter sp 97AE3-3	PTA-11410	October 14, 2010
Arcobacter sp 97AE3-12	PTA-11409	October 14, 2010

Serial No.: (AppNo)
Case No.: CL5123USNA
Confirmation No.: (ConfNo)
Declaration of Biological Culture Deposit

Page 2

d) All restrictions on the availability to the public of the culture will be irrevocably removed upon the granting of a U.S. patent on the above-identified application.

Respectfully submitted,

/Roger W. Herrell, Jr./
ROGER W. HERRELL, JR.
ATTORNEY/AGENT FOR APPLICANTS
Registration No.: 62,228
Telephone: (302) 992-5463
Facsimile: (302) 355-3982

Dated: October 25, 2011
Attachment: Deposit Receipt

PATENT

EN LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS

EN LA SOLICITUD DE:

ALBERT W. ALSOP et al.

CASO NO.: CL5123USNA

SOLICITUD NO.:

CONFIRMACIÓN NO.:

GRUPO UNIDAD TECNICA:

EXAMINADOR:

PRESENTADA:

PARA: IMPEDIMENTO DE AGREGACION DE BIOMASA EN POZOS DE INYECCIÓN

DECLARACIÓN DEL DEPÓSITO DE CULTIVO BIOLÓGICO

Via EFS-Red

Comisionado de Patentes

P.O. Box 1450

Alexandria, VA 22313-1450

Señor:

Yo, ROGER W. HERRELL, JR., declaro lo siguiente:

- a) Yo soy abogado/agente de registro de la solicitud antes identificada;
- b) De acuerdo con la 37 CFR 1.804, los cultivos de los siguientes materiales biológicos has sido depositados con el siguiente depositario internacional:

American Type Culture Collection (ATCC)

10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, U.S.A.

Bajo condiciones que satisfacen los requerimientos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para Propósitos de procedimientos de Patentes ["El Tratado"];

- c) Una copia del recibo otorgado de acuerdo con las Reglas del Tratado 7.3 y 10.2 se adjunta; y

Identificación del organismo	Número de Acceso al	Fecha del Depósito
------------------------------	---------------------	--------------------

Del Depositante	Depósito Internacional	
Pseudomonas stutzeri BR5311	PTA-11283	Septiembre 9, 2010
Pseudomonas stutzeri LH4:15	PTA-8823	Diciembre 4, 2007
Pseudomonas stutzeri 89AC1-3	PTA-11284	Septiembre 9, 2010
Arcobacter sp 97AE3-3	PTA-11410	Octubre 14, 2010
Arcobacter sp 97AE3-12	PTA-11409	Octubre 14, 2010

No. De Serie.: (No. De Sol.)

Caso No.: CL5123USNA

No. De Confirmación: (NoConf)

Declaración de Depósito de Cultivo Biológico

Página 2

- d) Todas las restricciones sobre la disponibilidad al público del cultivo serán irrevocablemente eliminadas al otorgamiento de una patente Estadounidense para la solicitud antes identificada.

Presento respetuosamente

/Roger W. Herrell, Jr/

ROGER W. HERRELL, JR.

ABOGADO/AGENTE DE LOS SOLICITANTES

No. De Registro: 62.228

Teléfono: (302) 992-5463

Fax: (302) 355-3982

Fechado: Octubre 25, 2011

Anexos: Recibo del Depósito