

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-133429- -00000-0000

Fecha: 2013-05-31 11:11:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 8

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO Prevención de la agregación
de biomasa en pozos de inyección

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE E.I. du Pont de Nemours
and Company

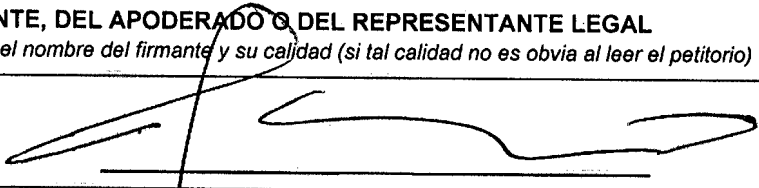
DOMICILIO Wilmington, Delaware. E.U.A.

74. APODERADO Alvaro Correa

22. BOGOTÁ, D.C., _____

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2011/058754	Fecha 01/11/2011
Publicación Internacional No.		WO/2012/061364	Fecha 10/05/2012
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
PREVENCIÓN DE LA AGREGACIÓN DE BIOMASA EN POZOS DE INYECCIÓN			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
E21B 43/22 (2006.01), C09K 8/58 (2006.01)			
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
1. E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN 1007 Market Street Wilmington, Delaware 19898		No. TELÉFONO 6341500	
CIUDAD Wilmington		CORREO ELECTRÓNICO alvaro.correa@bakermckenzie.com	
DEPARTAMENTO/ESTADO Delaware		NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN Estados Unidos de América	
PAÍS DE RESIDENCIA Estados Unidos de América			
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. ALSOP		Albert, W.	Estados Unidos
2. ANYZEK		Sheryl, M.	Estados Unidos
3. FALLON		Robert, D.	Estados Unidos
4. HENDRICKSON		Edwin, R.	Estados Unidos
5. KEELER		Sharon, Jo	Estados Unidos
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1.Estados Unidos	Delaware	Wilmington	2 Bradley Drive, Wilmington, Delaware 19803
2. Estados Unidos	Maryland	Elkton	145 Green Haven Drive, Elkton, Maryland 21921
3. Estados Unidos	Maryland	Elkton	104 Black Oak Drive, Elkton, Maryland 21921
4. Estados Unidos	Delaware	Hockessin	49 Kings Grant Road, Hockessin, Delaware 19707
5. Estados Unidos	Delaware	Bear	8 Donna Drive, Bear, Delaware 19701
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
Correa Ordoñez		Alvaro	C.C. 79.143.366 T.P. 20.281
DIRECCIÓN Av. 82 No. 10-62, Piso 5		No. TELÉFONO 6341500	
CIUDAD Bogotá		CORREO ELECTRÓNICO alvaro.correa@bakermckenzie.com	
PAÍS Colombia		No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL	

10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO			
(33) PAÍS DE ORIGEN 1.Estados Unidos de América 2. 3.		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO 61/408,731	(32) FECHA (AAAA/MM/DD) 01/11/2010
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS			
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.				
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES			
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.				
13	REDUCCIÓN DE TASAS			
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐				
Universidades públicas o privadas ☐				
Entidades sin ánimo de lucro ☐				
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos				
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO			
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.				
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N°	Fecha	
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL <i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>			
				
17	ANEXOS			
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica		
1. ☒ Descripción N° de folios: 53 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 17 3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 1 4. ☒ Resumen. 5. ☒ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☐ Arte final 12 x 12. 8. ☒ Anexo formato digital.		9. ☒ Poderes, si fuera el caso. 10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.		

☐ Patente de Modelo de Utilidad		FECHA DE PRESENTACIÓN	
4	(71) SOLICITANTE (S)		
2. 3. 4.	APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
5	DATOS DEL SOLICITANTE		
2. 3. 4.	PAÍS DE RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD DIRECCIÓN
2. 3. 4.	TELÉFONO	FAX	E-MAIL NACIONALIDAD
6	(72) INVENTOR (ES)		
6. 7. 8. 9. 10. 11. 12.	APELLIDOS PERRY	NOMBRE Michael, P.	NACIONALIDAD Estados Unidos
7	DATOS INVENTOR (ES)		
6. 7. 8. 9. 10. 11. 12.	DIRECCIÓN 1413 Carolina Place, Downingtown, Pennsylvania 19335	CIUDAD Downingtown	DEPARTAMENTO/ESTADO Pennsylvania PAÍS RESIDENCIA Estados Unidos
9	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD		
4. 5. 6. 7. 8. 9. 10.	PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	NÚMERO FECHA (AAAA/MM/DD)

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0026585

Bogotá D.C., Marzo 18 de 2013 - 07:55:41

RECIBIDO DE : BAKER

NI 900.532.339

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	557939340	15/03/2013	99.857.200.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-133429-00000-0000

Fecha: 2013-05-31 11:11:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 8

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.slc.gov.co e-mail: Info@slc.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 18 de 2013 - 07:57:27

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0052238

Bogotá D.C., Mayo 29 de 2013 - 16:24:26

RECIBIDO DE : BAKER

NI 900.532.339

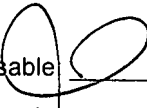
*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	15772	18/02/2013		5.000.00
RECIBO DE CA	999999999	33636	10/04/2013		175.000.00
RECIBO DE CA	999999999	44636	09/05/2013		30.000.00
RECIBO DE CA	999999999	44637	09/05/2013		30.000.00
RECIBO DE CA	999999999	44638	09/05/2013		30.000.00
RECIBO DE CA	999999999	44639	09/05/2013		30.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
7 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	210.000.00
			\$210.000.00

SON: **DOSCIENTOSDIEZ MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable 
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-133429- -00000-0000
Fecha: 2013-05-31 11:11:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 8



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT

(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl:	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY	
(30) Prioridad	(31) No. 61/408,731	32) Fecha 01/11/2010	(33) País US
		(72) Inventor(es) ALSOP, Albert, W. ANYZEK, Sheryl, M. FALLON, Robert, D. HENDRICKSON, Edwin, R. KEELER, Sharon, Jo PERRY, Michael, P.	
		(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ	
(85)	Fecha limite inicio fase nacional: 01/06/2013		(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 10/05/2012
	Fecha de presentación de la solicitud: 01/11/2011		N° publicación: WO/2012/061364
	No. de solicitud: PCT/US2011/058754		
(54) Titulo: PREVENCIÓN DE LA AGREGACIÓN DE BIOMASA EN POZOS DE INYECCIÓN			

Resumen:

Se describe en la presente descripción la introducción de distintas formulaciones de soluciones nutrientes a un lugar subterráneo objetivo para evitar la formación de biopelículas y agregación de biomasa en la superficie de arena de un pozo de inyección durante los procesos de MEOR o bioremediación. Una primera formulación de solución nutriente sustenta el crecimiento de los microorganismos introducidos y una segunda formulación de solución nutriente se usa para fomentar la formación de biopelículas para permitir el taponamiento de poros y canales en el lugar subterráneo objetivo, para MEOR o bioremediación.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO			
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES			
TARJETA ARCHIVO TEMATICO			
PATENTE DE INVENCION		PCT	MODELO DE UTILIDAD
		X	DISEÑO INDUSTRIAL
(21) N° de solicitud:		(22) Fecha de solicitud:	
(51) Clasificación Internacional :			
(71) Solicitante(s)			
E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY			
(72) Inventor(es) : ALSOP, Albert, W.; ANYZEK, Sheryl, M.; FALLON, Robert, D.; HENDRICKSON, Edwin, R.; KEELER, Sharon, Jo; PERRY, Michael, P.			
(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDÓÑEZ			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	61/408,731	01/11/2010	US
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 01/06/2013		(87) Publicación internacional:	
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT		Fecha: 10/05/2012	
Fecha de presentación de la solicitud : 01/11/2011		No. Publicación: WO/2012/061364	
No. de solicitud : PCT/US2011/058754			
(54) Título: PREVENCIÓN DE LA AGREGACIÓN DE BIOMASA EN POZOS DE INYECCIÓN			
(57) Resumen:			
Se describe en la presente descripción la introducción de distintas formulaciones de soluciones nutrientes a un lugar subterráneo objetivo para evitar la formación de biopelículas y agregación de biomasa en la superficie de arena de un pozo de inyección durante los procesos de MEOR o bioremediación. Una primera formulación de solución nutriente sustenta el crecimiento de los microorganismos introducidos y una segunda formulación de solución nutriente se usa para fomentar la formación de biopelículas para permitir el taponamiento de poros y canales en el lugar subterráneo objetivo, para MEOR o bioremediación.			

8

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION _____ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD _____ DISEÑO INDUSTRIAL _____

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud:

(51) Clasificación Internacional :

(71) Solicitante(s)

E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY

(72) Inventor(es) : ALSOP, Albert, W.; ANYZEK, Sheryl, M.; FALLON, Robert, D.; HENDRICKSON, Edwin, R.; KEELER, Sharon, Jo; PERRY, Michael, P.

(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDÓÑEZ

(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	32) Fecha	(33) País
	61/408,731	01/11/2010	US

(85) Fecha inicio fase nacional : 01/06/2013

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha : 10/05/2012

Fecha de presentación de la solicitud : 01/11/2011

N° publicación : WO/2012/061364

No. de solicitud : PCT/US2011/058754

(54) Título : PREVENCIÓN DE LA AGREGACIÓN DE BIOMASA EN POZOS DE INYECCIÓN



No. 13-133429- -00000-0000

Fecha: 2013-05-31 11:11:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI 10
Act. 411 PRESENTACION Folios: 8

PATENTE DE INVENCION ☐

MODEL

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

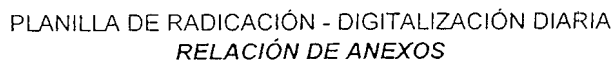
(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐



Fecha: 2013 05 31
AAAA MM DD

Recorrido:

2020

Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐

Radicador:

Planilla:

<i>Item</i>	<i>Unidad de Conservación</i>
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
<i>Item</i>	<i>Soporte Documental</i>
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones:

Anaxan CB

Partly



**BUDAPEST RESTRICTED CERTIFICATE OF DEPOSIT
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF
THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE
INTERNATIONAL FORM
RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3
AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.2**

The American Type Culture Collection (ATCC®) has received your deposit of seeds/strain(s)/strain(s) in connection with the filing of an application for patent. The following information is provided to fulfill Patent Office requirements.

Mr. Robert S. Scott
E.I. duPont de Nemours & Co
DuPont Experimental Station
200 Powder Mill Rd
Wilmington, DE 19880-0301

Deposited on Behalf of: **E.I. duPont de Nemours & Co**

Date of Receipt of seeds/strain(s) by the ATCC®: **September 08, 2010**

<u>Identification Reference by Depositor:</u>	<u>ATCC ®Patent Deposit Designation:</u>	<u>Quantity Received:</u>
Pseudonomas stutzeri BR5311	PTA-11283	25 vials
Pseudomonas stutzeri 89AC1-3	PTA-11284	25 vials

The ATCC® understands that:

1. The deposit of these seeds/strain(s) does not grant ATCC® a license, either express or implied, to infringe the patent, and our release of these seeds/strain(s) to others does not grant them a license, either express or implied, to infringe the patent.
2. If the deposit should die or be destroyed during the effective term of the patent, it shall be your responsibility to replace it with viable material. It is also your responsibility to supply a sufficient quantity for distribution for the deposit term. ATCC® will distribute and maintain the material for 30 years or 5 years following the most recent request for the deposit, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

Prior to the issuance of a U.S. Patent, the ATCC® agrees in consideration for a one-time service charge, not to distribute these seeds/strain(s) or any information relating thereto or to their deposit except as instructed by the depositor or relevant patent office. After relevant patent issues we are responsible to release the seeds/strain(s) and they will be made available for distribution to the public without any restrictions. We will inform you of requests for the seeds/strain(s) for 30 years from date of deposit.



The deposit was tested **October 07, 2010** and on that date, the seeds/strain(s) were viable
International Depository Authority: American Type Culture Collection (ATCC®), Manassas, VA, USA

Signature of person having authority to represent ATCC®:

Latha Ramakrishnan

Digitally signed by Latha
Ramakrishnan
DN: cn=Latha Ramakrishnan,
o=ATCC, ou=PLS Department,
email=lramakrishnan@atcc.org, c=US
Date: 2010.10.08 14:30:29 -04'00'

October 08, 2010

ATCC® Patent Depository

Date

Ref: Docket or Case No: **CL5094**



10801 University Boulevard • Manassas, VA 20110-2209 USA • Telephone: 703-365-2700 • FAX: 703-334-2932

**BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF
THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE**

INTERNATIONAL FORM

**RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3
AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.2**

To: (Name and Address if Depositor or Attorney)

E.I. du Pont de Nemours and Company
ATTN: Robert S. Scott
DuPont Experimental Station
E-301/317, 200 Powder Mill Road
P.O. Box 80301
Wilmington, DE 19880-0301

Deposited on Behalf of: E.I. du Pont de Nemours and Company

Date of Receipt of Culture by the ATCC®: December 04, 2007

Identification Reference by Depositor:

Shewanella putrefaciens
Pseudomonas stutzeri

LH4:18
LH4:15

ATCC® Patent Deposit Designation:

PTA-8822
PTA-8823

The deposit was received by this International Depository Authority and has been accepted.

The strain will be made available if a patent office signatory to the Budapest Treaty certifies one's right to receive, or if a U.S. Patent is issued citing the strain, and ATCC® is instructed by the United States Patent & Trademark Office or the depositor to release said strain.

If the deposit should die or be destroyed during the effective term of the patent, it shall be your responsibility to replace it with viable material. It is also your responsibility to supply a sufficient quantity for distribution for the deposit term. ATCC® will distribute the material for 30 years or 5 years following the most recent request for the deposit, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

We will inform you of requests for the strain for 30 years from date of deposit.

The deposit was tested December 18, 2007 and on that date, the culture was viable.

International Depository Authority: American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA

Signature of person having authority to represent ATCC®:

Roxane Collins

Digitally signed by Roxane Collins
DN: cn=Roxane Collins, o=ATCC, ou=IP, Licensing and
Services, email=rcollins@atcc.org, c=US
Date: 2007.12.20 12:00:56 -05'00'

ATCC Patent Depository

Date: December 19, 2007

**cc: Chris Lhulier
Case or Docket No. CL4043: CL4096**



**BUDAPEST RESTRICTED CERTIFICATE OF DEPOSIT
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF
THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE
INTERNATIONAL FORM
RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3
AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.2**

The American Type Culture Collection (ATCC®) has received your deposit of seeds/strain(s)/strain(s) in connection with the filing of an application for patent. The following information is provided to fulfill Patent Office requirements.

Robert S. Scott
E. I. duPont de Nemours and Company, Inc
200 Powder Mill Road
Experimental Station E301/317
Wilmington, DE 19880-0301

Deposited on Behalf of: **E. I. duPont de Nemours and Company, Inc**

Date of Receipt of seeds/strain(s) by the ATCC®: **October 14, 2010**

<u>Identification Reference by Depositor:</u>	<u>ATCC ®Patent Deposit Designation:</u>	<u>Quantity Received:</u>
Arcobacter sp: 97AE3-12	PTA-11409	25 vials
Arcobacter sp: 97AE3-3	PTA-11410	25 vials

The ATCC® understands that:

1. The deposit of these seeds/strain(s) does not grant ATCC® a license, either express or implied, to infringe the patent, and our release of these seeds/strain(s) to others does not grant them a license, either express or implied, to infringe the patent.
2. If the deposit should die or be destroyed during the effective term of the patent, it shall be your responsibility to replace it with viable material. It is also your responsibility to supply a sufficient quantity for distribution for the deposit term. ATCC® will distribute and maintain the material for 30 years or 5 years following the most recent request for the deposit, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

Prior to the issuance of a U.S. Patent, the ATCC® agrees in consideration for a one-time service charge, not to distribute these seeds/strain(s) or any information relating thereto or to their deposit except as instructed by the depositor or relevant patent office. After relevant patent issues we are responsible to release the seeds/strain(s) and they will be made available for distribution to the public without any restrictions. We will inform you of requests for the seeds/strain(s) for 30 years from date of deposit.



The deposit was tested **November 5, 2010** and on that date, the seeds/strain(s) were viable
International Depository Authority: American Type Culture Collection (ATCC®), Manassas, VA, USA

Signature of person having authority to represent ATCC®:

Rochelle
Harrington

Digitally signed by Rochelle
Harrington
DN: cn=Rochelle Harrington,
o=ATCC, ou=IPLS,
email=rharrington@atcc.org, c=US
Location: Manassas, VA 20110
Date: 2010.11.09 10:56:32 -0500

ATCC® Patent Depository

November 9, 2010

cc: Neil Feltham

Date

Ref: Docket or Case No: CL5181



10801 University Boulevard • Manassas, VA 20110-2209 USA • Telephone: 703-365-2700 • FAX: 703-334-2932

**BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF
THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE**

INTERNATIONAL FORM

**RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3
AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.2**

To: (Name and Address if Depositor or Attorney)

E.I. du Pont de Nemours and Company
ATTN: Robert S. Scott
DuPont Experimental Station
E-301/317, 200 Powder Mill Road
P.O. Box 80301
Wilmington, DE 19880-0301

Deposited on Behalf of: E.I. du Pont de Nemours and Company

Date of Receipt of Culture by the ATCC®: December 04, 2007

Identification Reference by Depositor:

Shewanella putrefaciens
Pseudomonas stutzeri

LH4:18
LH4:15

ATCC® Patent Deposit Designation:

PTA-8822
PTA-8823

The deposit was received by this International Depository Authority and has been accepted.

The strain will be made available if a patent office signatory to the Budapest Treaty certifies one's right to receive, or if a U.S. Patent is issued citing the strain, and ATCC® is instructed by the United States Patent & Trademark Office or the depositor to release said strain.

If the deposit should die or be destroyed during the effective term of the patent, it shall be your responsibility to replace it with viable material. It is also your responsibility to supply a sufficient quantity for distribution for the deposit term. ATCC® will distribute the material for 30 years or 5 years following the most recent request for the deposit, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

We will inform you of requests for the strain for 30 years from date of deposit.

The deposit was tested December 18, 2007 and on that date, the culture was viable.

International Depository Authority: American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA

Signature of person having authority to represent ATCC®:

Roxane Collins

Digitally signed by Roxane Collins
DN: cn=Roxane Collins, o=ATCC, ou=IP, Licensing and
Services, email=rcollins@atcc.org, c=US
Date: 2007.12.20 12:00:56 -05'00'

ATCC Patent Depository

Date: December 19, 2007

cc: Chris Lhulier
Case or Docket No. CL4043: CL4096



**BUDAPEST RESTRICTED CERTIFICATE OF DEPOSIT
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF
THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE
INTERNATIONAL FORM
RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3
AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.2**

The American Type Culture Collection (ATCC®) has received your deposit of seeds/strain(s)/strain(s) in connection with the filing of an application for patent. The following information is provided to fulfill Patent Office requirements.

Mr. Robert S. Scott
E.I. duPont de Nemours & Co
DuPont Experimental Station
200 Powder Mill Rd
Wilmington, DE 19880-0301

Deposited on Behalf of: **E.I. duPont de Nemours & Co**

Date of Receipt of seeds/strain(s) by the ATCC®: **September 08, 2010**

<u>Identification Reference by Depositor:</u>	<u>ATCC ®Patent Deposit Designation:</u>	<u>Quantity Received:</u>
Pseudomonas stutzeri BR5311	PTA-11283	25 vials
Pseudomonas stutzeri 89AC1-3	PTA-11284	25 vials

The ATCC® understands that:

1. The deposit of these seeds/strain(s) does not grant ATCC® a license, either express or implied, to infringe the patent, and our release of these seeds/strain(s) to others does not grant them a license, either express or implied, to infringe the patent.
2. If the deposit should die or be destroyed during the effective term of the patent, it shall be your responsibility to replace it with viable material. It is also your responsibility to supply a sufficient quantity for distribution for the deposit term. ATCC® will distribute and maintain the material for 30 years or 5 years following the most recent request for the deposit, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

Prior to the issuance of a U.S. Patent, the ATCC® agrees in consideration for a one-time service charge, not to distribute these seeds/strain(s) or any information relating thereto or to their deposit except as instructed by the depositor or relevant patent office. After relevant patent issues we are responsible to release the seeds/strain(s) and they will be made available for distribution to the public without any restrictions. We will inform you of requests for the seeds/strain(s) for 30 years from date of deposit.



The deposit was tested **October 07, 2010** and on that date, the seeds/strain(s) were viable
International Depository Authority: American Type Culture Collection (ATCC®), Manassas, VA, USA

Signature of person having authority to represent ATCC®:

Latha Ramakrishnan

Digitally signed by Latha
Ramakrishnan
DN: cn=Latha Ramakrishnan,
o=ATCC, ou=IPLS Department,
email=lramakrishnan@atcc.org, c=US
Date: 2010.10.08 14:30:29 -04'00'

October 08, 2010

ATCC® Patent Depository

Date

Ref: Docket or Case No: CL5094



**BUDAPEST RESTRICTED CERTIFICATE OF DEPOSIT
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF
THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE
INTERNATIONAL FORM
RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3
AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.2**

The American Type Culture Collection (ATCC®) has received your deposit of seeds/strain(s)/strain(s) in connection with the filing of an application for patent. The following information is provided to fulfill Patent Office requirements.

**Robert S. Scott
E. I. duPont de Nemours and Company, Inc
200 Powder Mill Road
Experimental Station E301/317
Wilmington, DE 19880-0301**

Deposited on Behalf of: **E. I. duPont de Nemours and Company, Inc**

Date of Receipt of seeds/strain(s) by the ATCC®: **October 14, 2010**

<u>Identification Reference by Depositor:</u>	<u>ATCC ®Patent Deposit Designation:</u>	<u>Quantity Received:</u>
Arcobacter sp: 97AE3-12	PTA-11409	25 vials
Arcobacter sp: 97AE3-3	PTA-11410	25 vials

The ATCC® understands that:

1. The deposit of these seeds/strain(s) does not grant ATCC® a license, either express or implied, to infringe the patent, and our release of these seeds/strain(s) to others does not grant them a license, either express or implied, to infringe the patent.
2. If the deposit should die or be destroyed during the effective term of the patent, it shall be your responsibility to replace it with viable material. It is also your responsibility to supply a sufficient quantity for distribution for the deposit term. ATCC® will distribute and maintain the material for 30 years or 5 years following the most recent request for the deposit, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

Prior to the issuance of a U.S. Patent, the ATCC® agrees in consideration for a one-time service charge, not to distribute these seeds/strain(s) or any information relating thereto or to their deposit except as instructed by the depositor or relevant patent office. After relevant patent issues we are responsible to release the seeds/strain(s) and they will be made available for distribution to the public without any restrictions. We will inform you of requests for the seeds/strain(s) for 30 years from date of deposit.



The deposit was tested **November 5, 2010** and on that date, the seeds/strain(s) were viable
International Depository Authority: American Type Culture Collection (ATCC®), Manassas, VA, USA

Signature of person having authority to represent ATCC®:

Rochelle
Harrington

Digitally signed by Rochelle
Harrington
DN: cn=Rochelle Harrington,
o=ATCC, ou=PLS,
email=rharrington@atcc.org, c=US
Location: Manassas, VA 20110
Date: 2010.11.09 10:56:32 -05'00'

ATCC® Patent Depository

November 9, 2010

cc: Neil Feltham

Date

Ref: Docket or Case No: CL5181

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Colleen A. Taylor

3. acting in the capacity of Notary Public of the State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Colleen A. Taylor, Notary Public, Delaware

Certified

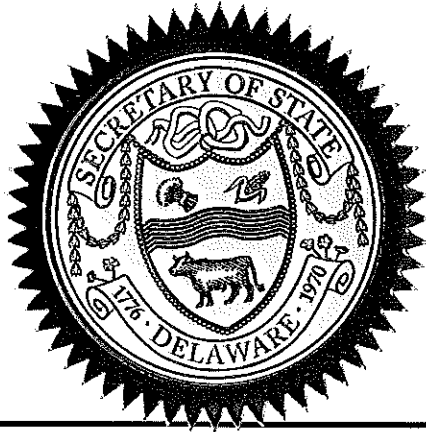
5. at Dover, Delaware

6. the thirtieth day of April, A.D. 2013

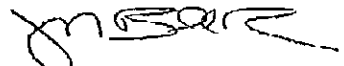
7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0493774

9. Seal/Stamp:



10. Signature:


Secretary of State

ASSIGNMENT

Albert W. ALSOP; Sheryl M. ANYZEK; Robert D. FALLON; Edwin R. HENDRICKSON; Sharon Jo KEELER; Michael P. PERRY

by means of this document assign to

E. I. du Pont de Nemours and Company

a corporation organized under the laws of

Delaware

domiciled in

1007 Market Street
Wilmington, Delaware 19898
United States of America

(hereinafter referred to as the "ASSIGNEE"),
all my (our) rights, title and interest in and to my
(our) invention for a new and useful
improvement entitled and as fully set forth and
described in:

PREVENTION OF BIOMASS AGGREGATION AT
INJECTION WELLS

so far as the Republic of Colombia is concerned.

Place: Wilmington DE USA

Date: 12 April 2013

Albert W. Alsop
Albert W. ALSOP

Robert D. Fallon
Robert D. FALLON

Sharon Jo Keeler
Sharon Jo KEELER

CESION

por medio de la presente cedo (cedemos) a

E. I. du Pont de Nemours and Company
una corporación organizada bajo las leyes de

Delaware

domiciliada en

1007 Market Street
Wilmington, Delaware 19898
Estados Unidos de América

(de ahora en adelante el "CESIONARIO"),
todos mis (nuestros) derechos, título e interés
sobre mi (nuestra) invención tal como describe
en:

Prevención de la agregación de
Biomasa en Pozos de Inyección

en lo que concierne a la República de Colombia.

Lugar y fecha: Wilmington DE Estados
Unidos de América, 12 de Abril de 2013

Sheryl M. Anyzek
Sheryl M. ANYZEK

Edwin R. Hendrickson
Edwin R. HENDRICKSON

Michael P. PERRY

United States of America)
)
State of Wilmington DE) ss.
)
County of New Castle)

On this 12th day of April, 2013, personally appeared
before me Albert W. Aksop; Robert D. Fallon;
Sheryl M. Anzyk; Edwin R. Hendrickson;
Sharon Jo Keeler

to me known and known to me to be the individual__ described in and who executed the
foregoing instrument, and who acknowledged to me that __he__ executed the same.

Colleen A. Taylor
Notary Public

COLLEEN A. TAYLOR
NOTARY PUBLIC
STATE OF DELAWARE
My Commission Expires on January 25, 2014

ASSIGNMENT

Albert W. ALSOP; Sheryl M. ANYZEK; Robert D. FALLON; Edwin R. HENDRICKSON; Sharon Jo KEELER; Michael P. PERRY

by means of this document assign to

E. I. du Pont de Nemours and Company

a corporation organized under the laws of

Delaware

domiciled in

1007 Market Street
Wilmington, Delaware 19898
United States of America

(hereinafter referred to as the "ASSIGNEE"),
all my (our) rights, title and interest in and to my
(our) invention for a new and useful
improvement entitled and as fully set forth and
described in:

PREVENTION OF BIOMASS AGGREGATION AT
INJECTION WELLS

so far as the Republic of Colombia is concerned.

Place: Wilmington DE USA

Date: 15 April 2013

Albert W. ALSOP

Robert D. FALLON

Sharon Jo KEELER

CESION

por medio de la presente cedo (cedemos) a

E. I. du Pont de Nemours and Company
una corporación organizada bajo las leyes de

Delaware

domiciliada en

1007 Market Street
Wilmington, Delaware 19898
Estados Unidos de América

(de ahora en adelante el "CESIONARIO"),
todos mis (nuestros) derechos, título e interés
sobre mi (nuestra) invención tal como describe
en:

*Prevención de la agregación de
biomasa en pozos de inyección*

en lo que concierne a la República de Colombia.

Lugar y fecha: _____

Sheryl M. ANYZEK

Edwin R. HENDRICKSON

Michael P. Perry

Michael P. PERRY

United States of America)
)
State of Delaware) SS.
)
County of New Castle)

On this 15th day of April, 2013, personally appeared
before me Michael P. Perry

to me known and known to me to be the individual__ described in and who executed the
foregoing instrument, and who acknowledged to me that __he__ executed the same.

Colleen A Taylor
Notary Public
COLLEEN A. TAYLOR
NOTARY PUBLIC
STATE OF DELAWARE
My Commission Expires on January 25, 2014



(51) International Patent Classification:
E21B 43/22 (2006.01) *C09K 8/58* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2011/058754

(22) International Filing Date:
1 November 2011 (01.11.2011)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/408,731 1 November 2010 (01.11.2010) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **E. I. du Pont de Nemours and Company** [US/US]; 1007 Market Street, Wilmington, Delaware 19898 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **ALSOP, Albert, W.** [US/US]; 2 Bradley Drive, Wilmington, Delaware 19803 (US). **ANYZEK, Sheryl M.** [US/US]; 145 Green Haven Drive, Elkton, Maryland 21921 (US). **FALLON, Robert, D.** [US/US]; 104 Black Oak Drive, Elkton, Maryland 21921 (US). **HENDRICKSON, Edwin, R.** [US/US]; 49 Kings Grant Road, Hockessin, Delaware 19707 (US).

KEELER, Sharon, Jo [US/US]; 8 Donna Drive, Bear, Delaware 19701 (US). **PERRY, Michael, P.** [US/US]; 1413 Carolina Place, Downingtown, Pennsylvania 19335 (US).

(74) Agent: **HERRELL, Roger W.**; E. I. du Pont de Nemours and Company, Legal Patent Records Center, 4417 Lancaster Pike, Wilmington, Delaware 19805 (US).

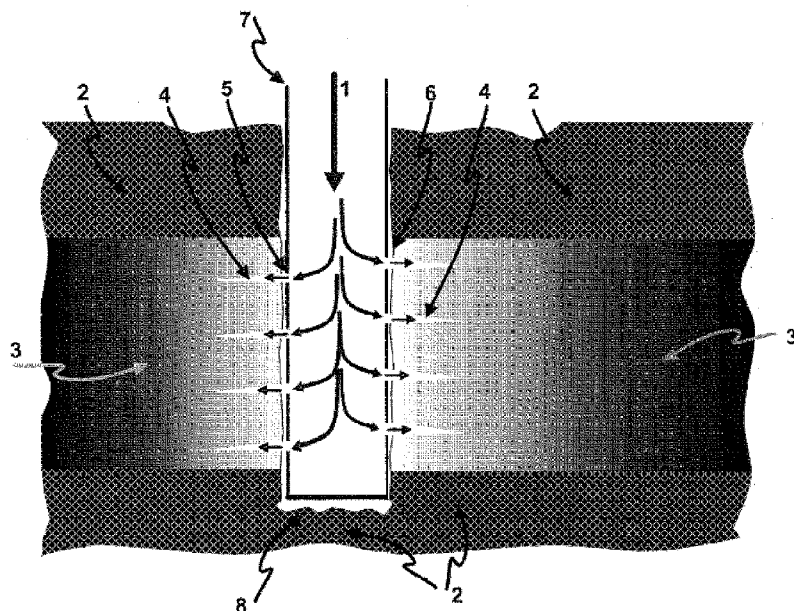
(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,

[Continued on next page]

(54) Title: PREVENTION OF BIOMASS AGGREGATION AT INJECTION WELLS

Figure 1



(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 processes. 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.



RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- *without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))*
- *with (an) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description (Rules 13bis.4(d)(i) and 48.2(a)(viii))*

TITLEPREVENTION OF BIOMASS AGGREGATION AT INJECTION WELLS

This application claims the benefit of United States Provisional
5 Application 61/408731, filed November 1, 2010, and is incorporated by
reference in its entirety.

FIELD OF INVENTION

This disclosure relates to the field of environmental microbiology.
10 Specifically, it relates to the field of microbial enhanced oil recovery and
bioremediation. More specifically it relates to prevention of microbial
aggregation and biofilm formation at the injection well bore during
microbial enhanced oil recovery or bioremediation.

15 BACKGROUND OF THE INVENTION

During recovery of oil from oil reservoirs, typically only minor
portions of the original oil in the oil-bearing subterranean strata is
recovered by primary recovery methods which use only the natural forces
present in the oil reservoir. Secondary oil recovery methods such as water
20 flooding, that is, the injection of water through injection wells into the oil
reservoir, have been used to force oil through the subterranean strata
toward production wells and thus improve oil recovery (Hyne, N.J., 2001,
"Non-technical guide to petroleum geology, exploration, drilling, and
production", 2nd edition, Pen Well Corp., Tulsa, OK, USA). One problem
25 commonly encountered with water flooding operations is that the
heterogeneity of the subterranean strata can lead to reduced sweep
efficiency during water flooding. In other words, water preferentially
channels through the more porous strata of the oil reservoir as it travels
from the injection well to the production wells and creates watered-out
30 strata, and bypasses other subterranean oil-bearing subterranean strata
that are not watered-out, thereby reducing the efficiency of oil recovery
from the strata that is not watered-out.

It is known to use Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR) to assist oil recovery (Brown, L. R., Vadie, A. A., Stephen, O. J. SPE 59306, SPE/DOE Improved Oil Recovery Symposium, Oklahoma, 3-5 – April, 2000). Viable microorganisms can be injected into an oil reservoir where
5 they can adhere to the surfaces of pores and channels in the rock or sand matrices in the watered-out zones and plug them to prevent water channeling towards watered-out zones during water flooding, which targets the water flow towards a larger area of the oil-bearing subterranean strata that has not been watered-out (Ramkrishna, S., Prog.
10 Energy Com. Sci., 34: 714-724, 2008).

One of the problems associated with MEOR is premature activity of exogenously introduced microorganisms, or native microorganisms, as soon as nutrient solutions are added to an injection well which results in premature bioplug formation and blocking of the pores close to the
15 injection well bore. In this situation components introduced into the injection well cannot move into the oil-bearing subterranean strata to promote MEOR.

WO2009017810A1 describes a method of enhanced oil recovery from an oil-bearing rock formation. The method involves introducing a
20 consortium of microorganisms and a nutrient solution into an injection well. The consortium is maintained for an amount of time sufficient for the growth and colonization of the microbes in the reservoir to displace oil.

The commonly owned and co-pending U.S. Patent Application Publication US 20100081585A1, which is herein incorporated by reference
25 in its entirety, describes controlling activation of microorganisms in MEOR and bioremediation processes and relies on formulations that are inhibitory, at applied concentrations, to both native and introduced microbes when applied to the site. These formulations prevent microbial growth and activation until the inhibitory agent has dissipated.

30 U.S. Patent No. 4,947,923 discloses a process for MEOR comprising injecting bacteria into a well bore and injecting a nutrient source to cause bacteria to grow and selectively plug the formation. The nutrient used is capable of flowing downhole and providing a nutrient

source of phosphate, e.g., tripolyphosphate, without precipitation on contact with connate water.

For successful MEOR and bioremediation operations, prevention of premature bioplug formation and blocking of the pores close to the injection well bore remains a problem to be solved.

SUMMARY OF THE INVENTION

In one aspect, the present invention is a method for treatment of a subterranean target site, comprising the steps of, in order:

- 10 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
- 15 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
- 20 e) introducing a second nutrient solution formulation into the injection well bore wherein said second nutrient solution formulation promotes bioplagging of pores and channels in the subterranean target site.

In another aspect of the invention is a method for treatment of a subterranean target site, comprising the steps of, in order:

- 25 a) preparing a biomass suspension comprising one or more strains of *Pseudomonas stutzeri*;
- b) introducing the suspension of (a) into the injection well bore of the subterranean target site;
- 30 c) 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, 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).

BRIEF DESCRIPTION OF FIGURES OF THE INVENTION

Figure 1 is a schematic of a well bore and the subterranean sites adjacent to it. All numbers below in bold refer to Figure 1. (1) is the flow of injection water into the well casing (7), (2 and 3) are rock layers, (4) is the perforations in the casing, (5) is the well bore, (6) is the sand face of the injection well bore, (8) is the bottom of the well bore in rock layer (2).

Applicants made the following biological deposit under the terms of the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure:

Information on deposited strain

Depositor Identification Reference	International Depository Designation	Date of Deposit
<i>Pseudomonas stutzeri</i> BR5311	ATCC No. PTA-11283	9/9/2010
<i>Pseudomonas stutzeri</i> LH4:15	ATCC No. PTA-8823	12/4/2007
<i>Pseudomonas stutzeri</i> 89AC1-3	ATCC No. PTA-11284	9/9/2010
<i>Arcobacter sp</i> 97AE3-3	ATCC No. PTA-11410	10-14-10
<i>Arcobacter sp</i> 97AE3-12	ATCC No. PTA-11409	10-14-10

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Applicants specifically incorporate the entire content of all cited references in this disclosure. Unless stated otherwise, all percentages,

parts, ratios, etc., are by weight. Trademarks are shown in upper case. Further, when an amount, concentration, or other value or parameter is given as either a range, preferred range or a list of upper preferable values and lower preferable values, this is to be understood as specifically

5 disclosing all ranges formed from any pair of any upper range limit or preferred value and any lower range limit or preferred value, regardless of whether ranges are separately disclosed. Where a range of numerical values is recited herein, unless otherwise stated, the range is intended to include the endpoints thereof, and all integers and fractions within the

10 range. It is not intended that the scope of the invention be limited to the specific values recited when defining a range.

The following definitions are provided for the special terms and abbreviations used in this application:

The abbreviation "ATCC" refers to American Type Culture

15 Collection International Depository, Manassas, VA, USA. "ATCC No." refers to the accession number to cultures on deposit with ATCC.

The term "biofilm" means a film or "biomass layer" of microorganisms. Biofilms are often embedded in extracellular polymers, which adhere to surfaces submerged in, or subjected to, aquatic

20 environments. Biofilms consist of a matrix of a compact mass of microorganisms with structural heterogeneity, which may have genetic diversity, complex community interactions, and an extracellular matrix of polymeric substances.

The term "plugging biofilm" or "bioplug" means a biofilm that is able

25 to alter the permeability of a porous material, and thus retard the movement of a fluid through a porous material that is associated with the biofilm or bioplug.

The invention relates to a method for prevention of plugging of the sand face of an injection well bore, and pores close to the injection well

30 bore, during MEOR or bioremediation applications by introducing fluids and selected nutrient formulations. In the disclosed method, following microbial biomass suspension introduction into an injection well, optionally fluid is added to move the biomass away from the introduction site. This is

then followed by introducing a first nutrient solution formulation to the injection well that provides nutrients for growth of microorganisms in the subterranean target site without promoting biomass aggregation and biofilm formation. This is followed by introducing a second nutrient solution
5 formulation that promotes adhering of microorganisms to pores and channels in the subterranean target site, and production of biofilms for bioplug formation.

In one embodiment the microbial biomass suspension is prepared in the first nutrient solution formulation, and this suspension preparation is
10 introduced into the injection well bore. When using the biomass suspension prepared in the first nutrient solution, additional first nutrient solution formulation may be introduced following optional fluid introduction, or this step may be omitted.

The "injection well bore sand face" faces the rock layers (Figure 1:
15 2, 3) of the subterranean strata that are in communication with the injection well through perforations in the well casing (Figure 1: 4). The current method alters the subterranean target site's permeability and thus assists in oil recovery or bioremediation. The phrase "subterranean target site", as used herein, refers to zones below the earth surface made up of
20 sand stone, unconsolidated sand, or limestone wherein MEOR or bioremediation is applied. The phrase "altering the target site permeability" as used herein refers to processes that result in plugging the watered-out zones, and thus redirecting the flow of water flood towards zones that have not been watered-out. These processes include
25 biofilm formation and plugging of the pores of the sand and rocks in the subterranean target site by microorganisms.

In additional embodiments, additional steps may be included in the method. For example in one embodiment, following step (d), the injection well is shut-in for a period of time. During this time the well is closed off so
30 that nothing is introduced into the well, and the microorganisms will grow in their new environment. In another embodiment, following step (d) one or more fluids are introduced into the injection well bore. This fluid is used to move the microorganisms further into the subterranean target site. In

another embodiment the injection well is shut-in for a period of time after introducing one or more fluids following step (d). In another embodiment, following step (e), one or more fluids is introduced into the injection well bore. The fluid floods move through unblocked pores and channels removing oil for oil recovery, or other substances for bioremediation. In another embodiment, additional second nutrient solution formulation is introduced into the injection well bore after step (e) to promote further biofilm formation. The additional second nutrient solution formulation is typically added periodically in batches between introducing the fluids. Any combination of these further steps may be used in the present method.

A schematic of an injection well bore and the subterranean site adjacent to it is depicted in Figure 1. When a fluid (1) is introduced into the injection well, it flows into the well casing (7) which is inside the well bore (5) drilled through rock layers (2, 3). A gap exists between the well casing (7) and the injection well bore sand face (6) of the rock layer made by the well bore (5). Rock layer (2) represents impermeable rock above and below a permeable rock layer (3) that holds or traps oil. Any fluid (1) introduced into the well bore flows down the well casing (7) and passes through perforations in the casing (5) and into perforations (4) in the rock matrix of the oil-bearing subterranean strata (3). This fluid then flows through the oil-bearing subterranean strata (3) and displaces oil from these strata. This zone extends radially out from the well bore (5) in all directions in the oil-bearing strata (3).

In the present method, when microbial biomass is introduced into an injection well bore, it is optionally followed by addition of one or more fluids to assist moving the microorganisms into the adjacent subterranean target site. Fluids suitable for use herein can include, for example, injection and production waters used during MEOR operations. A fluid useful in the current method comprises water. Water can be supplied from any suitable source, and can include, for example: sea water, brine, production water, water recovered from an underground aquifer, including those aquifers in contact with the oil in a subterranean site, or surface water from a stream, river, pond or lake. As is known in the art, it may be

necessary to remove particulate matters including dust, bits of rock or sand and corrosion by-products such as rust from the water prior to injection into the one or more well bores. Methods to remove such particulate matters, e.g., filtration, sedimentation and centrifugation, are well known in the art.

In an embodiment of the disclosed method, injection or production waters from oil reservoirs are introduced into an injection well bore following introduction of a microbial biomass suspension to move the microorganisms introduced into the injection well further into the adjacent subterranean target site.

The injection water or production water from such wells can contain various concentrations of mixed salts containing for example chloride, sodium, potassium, bromine, magnesium, barium and calcium (hereafter "salt"). The salinity of the injection or production well water can be from about 0 to about 100 parts per thousand (ppt).

Even when a well-dispersed biomass suspension is prepared, it can aggregate and cause plugging of the sand face of the injection well bore after its introduction into the well bore, thus reducing the amount of biomass that reaches the subterranean target site where oil recovery or bioremediation is to take place or increasing the pressure needed to pump fluid into the well bore in the worse case effectively plugging off the well bore. The present method reduces microbial biomass aggregation and biofilm and bioplug formation at the sand face of the injection well bore by introducing fluids and nutrient solution formulations disclosed herein which allow deeper penetration of the biomass into the subterranean target site.

Nutrient solution formulation

Nutrient solution formulations useful in the present invention may include growth substrates (compounds that supply mass and energy for cell growth); electron acceptors; nitrogen and phosphorus sources, as well as various trace elements such as vitamins and metals that are usually required for microbial growth and activity in addition to the growth substrate and nitrogen sources,.

Nutrient solution formulations useful in the present invention comprise the following substances, alone or in combination: carbon sources, added at greater than 0.01% w/v; an electron acceptor for microbial growth (for anaerobic growth conditions), added at greater than 0.01% w/v; a source of nitrogen, added at greater than 0.001% w/v; a source of phosphorous, added at greater than 0.001% w/v; a source of trace nutrients, such as vitamins and metals, added at greater than 0.0001% w/v.

Useful nutrient solution formulations contemplated herein include those containing at least one of the following elements: C, H, O, P, N, S, Mg, Fe, or Ca. Non-limiting examples of useful inorganic radicals comprising at least one of the above elements include, for example: PO_4^{2-} , NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- , and SO_4^{2-} . Growth substrates can include sugars, organic acids, alcohols, proteins, polysaccharides, fats, hydrocarbons or other organic materials known in the art of microbiology to be subject to microbial decomposition. Major nutrients containing nitrogen and phosphorus (non-limiting examples can include NaNO_3 , KNO_3 , NH_4NO_3 , Na_2HPO_4 , K_2HPO_4 , NH_4Cl); vitamins (non-limiting examples may include folic acid, ascorbic acid, and riboflavin); trace elements (non-limiting examples may include B, Zn, Cu, Co, Mg, Mn, Fe, Mo, W, Ni, and Se); buffers for environmental controls; catalysts, including enzymes; and both natural and artificial electron acceptors (non-limiting examples may include SO_4^{2-} , NO_3^- , Fe^{+3} , humic acid, mineral oxides, quinone compounds, CO_2 , O_2 , and combinations thereof) may be included. Complex ingredients such as yeast extract may be used to provide multiple nutrients such as vitamins and amino acids.

In the current method, separate nutrient solution formulations having different effects on one or more introduced microorganism are used during treatment of a subterranean target site. The nutrient solution formulations are introduced into the injection well bore in a subterranean target site following introduction of a biomass suspension and optionally one or more fluids. The first nutrient solution provides nutrients that support growth of one or more introduced microorganism, but it does not

promote biomass aggregation and biofilm formation. With the first nutrient solution formulation there may be some biofilm formation, but it is reduced in comparison to the amount of biofilm formation produced by the microorganism(s) in the presence of the second nutrient solution formulation. Thus biofilm formation is not promoted by the first nutrient solution formulation. The first nutrient solution may also maintain the microorganisms in suspension, rather than promoting aggregation. Thus with introduction of the first nutrient solution, introduced microorganisms can spread and grow throughout the subterranean target site without blocking the sand face of the injection well bore, and pores close to the well bore.

The second nutrient solution, which is introduced after the first nutrient solution, promotes effects in microorganisms that lead to bioplugging of pores and channels in the subterranean target site. The effects may include aggregation, adhesion, and biofilm production. Thus with introduction of the second nutrient solution, pores and channels in the subterranean target site are blocked leading to improved oil recovery or bioremediation.

Differences in the composition of the first and second nutrient solution formulations may be in any component or components that promote the differing effects described above. For example, there may be differences in growth substrates. In an embodiment of the present method, the first nutrient solution formulation introduced following introduction of the biomass suspension, and optionally at least one fluid, contains lactate and does not contain acetate. Lactate concentration in the first nutrient solution formulation is from 25 parts per million to about 10,000 parts per million. This is followed by introduction of the second nutrient solution formulation which contains acetate. The acetate concentration in the second nutrient solution formulation can be up to 30 weight percent. The first and second nutrient solution formulations comprise nitrate up to 30 weight percent.

Effects of different nutrient solution formulations on different microorganisms may also vary in the presence of different salt

concentrations. For example, a greater differential in biofilm formation may occur between nutrient solution formulations containing lactate or acetate in the presence of high salt as compared to low salt. High salt concentration may be at least about 30 ppt, 35 ppt, 40 ppt, 45 ppt, 50 ppt, 55 ppt, 60 ppt, 65 ppt, 70 ppt, or 75 ppt, or higher.

In the current method, following introduction of a biomass suspension containing microorganisms the combination of the first and second nutrient solutions with lactate and acetate, respectively, can be used with any microorganisms that have increased bioplugging in acetate containing medium as opposed to in lactate containing medium.

Microorganisms can be identified as having different properties in different nutrient solution formulations by testing in biofilm assays as described in General Methods herein. For example *Pseudomonas stutzeri* strains BR5311 (ATCC No. PTA-11283) and LH4:15 (ATCC No. PTA-8823) were shown herein to form more effective bioplugs in acetate containing nutrient solution than in lactate containing nutrient solution. Bioplug response may vary with salinity of the nutrient solution used and can be readily assessed by one skilled in the art using assays described herein.

In another embodiment, other microorganisms may be used for plugging that may require other specific nutrients for biofilm formation and plugging. The compositions needed for the first and second nutrient solutions can be readily determined by one skilled in the art based on plugging responses of the microorganism(s) to be introduced in the biomass suspension using assays described under General Methods herein.

Biomass

The biomass suspension useful for the method disclosed herein, to form biofilms and plug pores of the subterranean target site, can comprise classes of facultative anaerobes, obligate anaerobes and denitrifiers. Various species of microorganisms (bacteria and fungi) used for biofilm formation and aggregation to improve sweep efficiency and enhance oil

recovery may include, but are not limited to, the genera: *Pseudomonas*,
Bacillus, *Actinomycetes*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Schizomycetes*,
Corynebacteria, *Achromobacteria*, *Arcobacter*, *Enterobacteria*, *Nocardia*,
Saccharomycetes, *Schizosaccharomyces*, *Vibrio*, *Shewanella*, *Thauera*,
5 *Petrotoga*, *Microbulbifer*, *Marinobacteria*, *Fusibacteria*, and *Rhodotorula*.
The terms "genus" and "genera", as used herein, refer to the category of
microorganisms ranking below a "family" and above a species in the
hierarchy of taxonomic classification of microorganisms. "Species", as
used herein, refers to a group of microorganisms that share a high degree
10 of phenotypic, biochemical and genotypic similarities.

The biomass suspension can comprise only one particular species,
two or more species of the same genera, a combination of different
genera, or a combination of multiple species of multiple genera of
microorganisms. In one embodiment the biomass suspension for the
15 practice of the current method is obtained using *Pseudomonas stutzeri*
LH4:15 (ATCC NO: PTA-8823) described in commonly owned and co-
pending U.S. Patent Application Publication No: 20090263887, the
contents of which is herein incorporated on its entirety by reference. In
another embodiment the biomass suspension for the practice of the
20 current method is obtained using *Pseudomonas stutzeri* strain BR5311
(ATCC # PTA-11283), which is disclosed in commonly owned and co-
pending US Patent Application # 61/408734, which is incorporated herein
by reference. In yet another embodiment the biomass suspension contains
both of these strains.

25 The biomass suspension, fluids, and nutrient solutions can be
introduced into the well bore by various means such as a centrifugal
pump, a piston pump, gear pump or any other device or by any other
method well known in the art.

30

Biomass preparation

The biomass suspension useful for the current method is prepared by growing the one or more microorganism of choice in an appropriate medium. One skilled in the art would be familiar with suitable media that can be used for biomass preparation of the desired microorganisms. When *Pseudomonas stutzeri* is used, the suitable medium can contain lactate that will not support bioplug formation. The biomass may be concentrated such as by filtration or centrifugation. The biomass can be prepared as required for immediate introduction into the injection well without storage. Alternatively, the biomass can be prepared ahead of time and can be stored frozen as a paste. Biomass preparation from a frozen biomass requires special attention and probably application of one or more type of mixers to insure complete resuspension of biomass and absence of any cell aggregates. For example, a method for delivering a biomass population including flowing through a biomass dispersing device is disclosed in US Patent Application Publication 20110244554, which is incorporated herein by reference.

The disclosed method can also be used for bioremediation of contaminated sites.

EXAMPLES

The present invention is further defined in the following Examples. It should be understood that these Examples, while indicating preferred embodiments of the invention, are given by way of illustration only. From the above discussion and these Examples, one skilled in the art can ascertain the essential characteristics of this invention, and without departing from the scope thereof, can make various changes and modifications of the invention to adapt it to various usages and conditions.

GENERAL METHODS

Growth of biomass

Techniques for growth and maintenance of anaerobic microorganisms are well known in the art. Anaerobic growth is measured

by nitrate depletion from the growth nutrient solution over time and accumulation of nitrite.

Biomass can be grown and stored as described in the co-pending U.S. Patent Application Publication No: 20090263887 the contents of which is herein incorporated on its entirety by reference.

PPGAS medium contained: 20 millimolar (mM) NH_4Cl , 20 mM KCl, 120 mM Tris-Cl, 1.6 mM MgSO_4 , 1% peptone, 0.5% glucose, pH 7.5.

The composition of the minimal salts nutrient solution formulation used in examples below is shown in Table 1.

Table 1

Composition of the minimal salts nutrient solution formulation

g/L	Chemical
1.0	NH ₄ Cl
0.5	KH ₂ PO ₄
0.4	MgCl ₂ ·6H ₂ O
0.2	CaCl ₂ ·2H ₂ O
10	NaCl
0.69	NaH ₂ PO ₄
2.5	NaHCO ₃
0.073	KSO ₄
1000X g/L	Trace elements
1.5	FeCl ₂ ·4H ₂ O
0.002	CuCl ₂ ·2H ₂ O
0.1	MnCl ₂ ·4H ₂ O
0.19	CoCl ₂ ·6H ₂ O
0.07	ZnCl ₂
0.006	H ₃ BO ₃
0.036	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O
0.024	NiCl ₂ ·6H ₂ O
0.277	HCl
1000X g/L	Selenium/ tungstate
0.006	Na ₂ SeO ₃ ·5H ₂ O
0.008	Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O
0.5	NaOH
1000X mg/L	Vitamin mix
100	vitamin B12
80	p-aminobenzoic acid
20	D(+)-Biotin
200	nicotinic acid
100	calcium pantothenate
300	pyridoxine hydrochloride
200	thiamine-HCL·2H ₂ O
50	Alpha-lipoic acid
The pH of the medium was adjusted to 7.3.	

Purchased nutrient solution formulation

- 5 Millers LB growth medium was purchased (MediTech, Inc, Manassas, VA).

Injection water samples

Injection water was sampled from two separate fields each located in two different petroleum production fields. Well #1 is located in the Senlac field on the border of Saskatchewan and Alberta provinces, Canada. This well has a salinity between 30-35 parts per thousand (ppt) in both production and injection waters. Well #2 is in the Wainwright field in the province of Alberta, Canada. This well has a salinity of about twice seawater, which is in the range of 65 ppt.

10 Samples from oil reservoir production and injection waters.

Water samples were obtained from production and injection wells (well #1 and well #2) as mixed oil/water liquids in glass 1.0 liter (L) brown bottles, filled to the top, capped and sealed with tape to prevent gas leakage. Gas produced during inherent anaerobic processes sufficed to maintain anaerobic conditions during shipment. The bottles were shipped in large plastic coolers filled with ice blocks to the testing facilities within 48 hours of sampling.

Measurement of total dissolved salts (salinity)

20 The total dissolved salt was measured using a hand-held refractometer (Model RHS 10ATC, Huake Instrument Co., Ltd, Shenzhen, China).

Biofilm formation on sintered glass filters

25 An assay to evaluate microorganisms for their ability to form biofilms on silica surfaces and prevent water flow through ~10 micron pore spaces (plugging) was developed using sintered glass filters. 25 millimeter (mm) medium coarseness sintered glass filters (stock # 15254, Adams and Chittenden Scientific Glass, Berkeley CA) were glued into the base of plastic holders designed for membrane filtration. After curing, the filter assemblies were sterilized by autoclaving. Individual filters, in holders, were placed in sterile petri plates and nutrient solution formulation, which contained inoculum from overnight cultures of various

strains, was added on top of the glass filters. Nutrient solution formulation in this biofilm formation/plugging assay was either a minimal salts medium (Table 1) or injection or production water samples, supplemented with nitrogen, phosphate, trace elements, vitamins, carbon source and nitrate as electron acceptor. The Petri plates were covered and incubated at room temperature under anaerobic conditions for one to 2 weeks. The filters were then removed from the nutrient solution formulation and the top piece of the plastic holder was tightened in place. A ten centimeter length of tubing was attached to the inlet port of the filter holder and was filled with water. The time (in seconds) to drain the water in the tube was measured. Control filters without any microorganisms took around 10 seconds to drain. Filters that took longer than 10 seconds to drain were considered "plugged".

In an alternate plugging assay, the sintered glass filters were infiltrated with fluid before use, prescreened for flow rate before addition of microorganisms, and the percent change in the flow rate post incubation was determined at the end of the experiment.

EXAMPLE 1

20 ABILITY OF *PSEUDOMONAS STUTZERI* (LH4:15) TO FORM BIOFILMS ON SILICA SURFACES

To assess the ability of *Pseudomonas stutzeri* strain LH4:15 (ATCC # PTA-8823) to produce stable biofilms on silica surfaces, sterile glass beads (3 mm, #11-312A, Fisher Scientific, Hampton, NH) were placed into the wells of a 24-well microtiterplate (#353047, BD Biosciences) and an aliquot (1.0 mL) of injection water or the PPGAS medium was added. Then either 0.6% acetate or 0.6% lactate was added to each well followed by 10 µl of an overnight culture of strain LH4:15 that had grown aerobically in PPGAS medium while shaking at 200 revolutions per minute (rpm) and at room temperature. The plates were then incubated at room temperature for up to one week. Biofilm formation was assessed by visual inspection.

Results indicated that different types of biofilms were formed on the glass beads. In the wells containing the injection water, most of the biofilm

was formed on the glass beads while only small amounts of biofilm was observed on the sides and bottom of the well. However, when PPGAS medium was used as the nutrient solution formulation, biofilm was formed throughout the entire well. In wells that contained acetate as the additional carbon source, the biofilm formed was more granular whereas in wells containing lactate, the biofilm formed was smoother. These results indicated that *Pseudomonas stutzeri* strain LH4:15 had the ability to readily form biofilms on silica surfaces and to produce different types of biofilms depending on the available carbon source.

10

EXAMPLE 2

EFFECT OF CARBON SOURCE ON THE ABILITY OF *PSEUDOMONAS STUTZERI* STRAIN BR5311 TO FORM BIOFILMS

The effect of the carbon source in the nutrient solution formulation on biofilm formation by *Pseudomonas stutzeri* strain BR5311 (ATCC # PTA-11283) was examined in this example. Strain BR5311 was isolated as a microorganism capable of growth at water/oil interfaces under denitrifying conditions from injection water of Well #1 that is located in the Senlac field on the border of Saskatchewan and Alberta provinces in central Canada. It was identified as a strain of *Pseudomonas stutzeri* by 16S rDNA analysis, which is described in commonly owned and co-pending US Patent Application # 61/408734.

The biofilm formation assay was performed as described in General Methods. The medium used was the minimal salts medium indicated in Table 1 and was supplemented with acetate or lactate as the sole carbon source and nitrate as the electron acceptor, as listed in Table 2. The mixture was made anaerobic by placing it into a plastic chamber containing ascorbate oxygen scrubbing system (Becton, Dickinson Co, Sparks, Maryland). The nutrient solution formulation used in the assay contained either acetate or lactate as the sole carbon source and nitrate as the electron acceptor as shown in Table 2.

High salt injection water from Well #2 (67ppt) was filter-sterilized and the following additional nutrients were added to it: 0.5 g/LNH₄Cl; 0.69

g/L NaH_2PO_4 ; 1.4 g/L KH_2PO_4 ; vitamins and trace metals as in Table 1. Sodium nitrate and either sodium acetate or sodium lactate were added to test samples to give the available donor/acceptor electron ratios shown in the e- column of Table 2. 25 mL of the above nutrient solution formulation and 1.0 mL of overnight grown microorganisms (prepared as described in example 1) were added to each glass filter holder. After 1 week incubation in an incubator/shaker at 28 °C and 100 rpm in anaerobic boxes, filters were removed and tested for plugging as described in General Methods. Each filter was measured 3 times. Results of flow times for each test sample are given in Table 2.

TABLE 2

Carbon sources added to the nutrient solution formulation for *Pseudomonas stutzeri* strain BR5311 for biofilm formation and related flow times

Test	Sodium acetate	Sodium nitrate	Sodium lactate	e-	Water flow, sec
#1	1g/L	2.66g/L		1:2	16.7 +/- 3.5
#2		2.66g/L	0.66g/L	1:2	8.7 +/- 1.0
#3	2.07g/L	0.66g/L		4:1	17.7 +/- 2.8
#4		0.66g/L	1.33g/L	4:1	11.7 +/- 2.0

As can be seen Table 2, significant plugging was observed when acetate was used as a carbon source (tests #1 and #3) regardless of carbon to nitrate ratio. Minimal plugging was observed in this high salt (67 ppt) medium of Well # 2 waters with lactate with a donor/acceptor electron ratio of 4:1.

EXAMPLE 3

BIOFILM FORMATION IN LOW SALT WITH ACETATE OR LACTATE

WITH *PSEUDOMONAS STUTZERI* BR5311

Pseudomonas stutzeri strain BR5311 was tested for its ability to form biofilms of sintered glass filters in low salt as described in General Methods. Strain BR5311 was grown overnight in Millers LB growth medium at 30°C with shaking at 200 rpm. To initiate the experiment 1.0

mL of overnight grown microorganisms was added to 25 mL of the nutrient solution formulation described below in triplicate and added to a glass filter holder. These cultures were grown anaerobically in an incubator/shaker at 28°C/100 rpm for 2 weeks. In addition triplicate uninoculated controls with the same nutrient solution formulation, but without the strain inoculum, were performed in parallel with the inoculated test treatments.

Low salt nutrient solution formulation composition: NaCl, 10 g/L, NaHCO₃, 0.25 g/L, NaNO₃, 2 g/L, vitamin solution, 1 mL/L B12, 100 mg/L, p-aminobenzoic acid, 80 mg/L, D(+)-Biotin, 20 mg/L, nicotinic acid, 200 mg/L, Calcium pantothenate, 100 mg/L, pyridoxine hydrochloride, 300 mg/L, thiamine-HCl . 2 H₂O, 200 mg/L, alpha-lipoic acid, 50 mg/L, selenite/tungstate solution, 1 mL/L [NaOH, 0.5 g/L, Na₂SeO₃.5H₂O, 6.0 mg/L, Na₂WO₄.2H₂O, 8.0 mg/L], SL-10 trace metals, 1 mL/L [25 % HCl, 10 mL/L, FeCl₂.4 H₂O, 1.5 g/L, ZnCl₂, 70 mg/L, MnCl₂.4 H₂O, 100 mg/L, H₃BO₃, 6 mg/L, CoCl₂.6 H₂O, 190 mg/L, CuCl₂.2 H₂O, 2 mg/L, NiCl₂.6 H₂O, 24 mg/L, Na₂MoO₄.2 H₂O, 36 mg/L], KH₂PO₄, 0.02 g/L, NH₄Cl, 0.1 g/L, MgSO₄.7H₂O, 0.1 g/L, yeast extract 0.1 g/L.

The carbon source in the nutrient solution formulation was either sodium acetate or sodium lactate (at 1.0 g/L). The salinity was 20 ppt.

After two weeks, flow rates were checked as described in General Methods. Time for water passage was noted for each of the test and control filters and each filter was tested 3 times. Flow rates were calculated and post incubation values were compared to pre-incubation values for each filter. Results in Table 3 show that *Pseudomonas stutzeri* strain BR 5311 caused a significant decrease in flow rate versus the control treatments after two weeks of incubation. In both acetate and lactate control treatments the flow rates increased. The increased flow rate resulted from better water saturation of the filter pores after two weeks of submersed incubation. The test treatments containing the *Pseudomonas stutzeri* strain BR 5311 inoculum showed declines in flow rate. In the acetate test treatment, flow rate declined by about 42% and in the lactate test treatment flow rate declined about 27% in low salt conditions.

Table 3

Changes in flow rate through medium porosity glass filters after two week incubation

	flow, ml/sec						
	pre-incubation value	post incubation Values*			mean	% change in flow rate ¹	Mean % change in flow rate
Treatment		#1	#2	#3			
Acetate control 1	0.083	0.100	0.100	0.100	0.100	+ 20	+16
Acetate control 2	0.091	0.125	0.111	0.111	0.116	+ 27	
Acetate control 3	0.091	0.091	0.091	0.091	0.091	0	
Acetate test 1	0.100	0.067	0.067	0.067	0.067	- 33	- 42
Acetate test 2	0.100	0.043	0.042	0.038	0.041	- 59	
Acetate test 3	0.091	0.059	0.059	0.063	0.060	- 34	
Lactate control 1	0.083	0.100	0.100	0.100	0.100	+20	+9
Lactate control 2	0.091	0.100	0.091	0.100	0.097	+7	
Lactate control 3	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0	
Lactate test 1	0.111	0.125	0.111	0.111	0.116	+ 4	- 27
Lactate test 2	0.091	0.048	0.045	0.045	0.046	- 49	
Lactate test 3	0.100	0.067	0.067	0.063	0.065	- 35	

5

*3 successive measurements/replicate.

¹calculated as $((\text{mean post incubation, ml/sec/preincubation, ml/sec})^{-1}) \times 100$

10

EXAMPLE 4PLUGGING ASSAY IN HIGH SALT WITH ACETATE USING
PSEUDOMONAS STUTZERI STRAIN BR5311

Pseudomonas stutzeri strain BR5311 was assayed for its ability to

5 form biofilms on sintered glass filters as described in General Methods using a high salt medium. Salinity of the nutrient solution formulation was 70 ppt. Strain BR5311 was grown anaerobically in a nutrient solution formulation of the following composition: NaCl, 40.5 g/L, NH₄Cl, 0.1 g/L, KH₂PO₄, 0.02 g/L, Na₂SO₄, 0.1 g/L, selenite-tungstate solution [NaOH, 0.5

10 g/L, Na₂SeO₃.5H₂O, 6.0 mg/L, Na₂WO₄.2H₂O, 8.0 mg/L], 1 mL/L, NaHCO₃, 0.2 g/L, vitamin solution [Vitamin B12, 100 mg/L, p-aminobenzoic acid, 80 mg/L, D(+)-Biotin, 20 mg/L, Nicotinic acid, 200 mg/L, Calcium pantothenate, 100 mg/L, Pyridoxine hydrochloride, 300 mg/L, Thiamine-HCl . 2 H₂O, 200 mg/L, Alpha-lipoic acid, 50 mg/L], 1

15 mL/L, SL-10 trace metal solution [25 % HCl, 10 mL/L, FeCl₂.4 H₂O, 1.50 g/L, ZnCl₂, 70 mg/L, MnCl₂.4 H₂O, 100 mg/L, H₃BO₃, 6 mg/L, CoCl₂.6 H₂O, 190 mg/L, CuCl₂.2 H₂O, 2 mg/L, NiCl₂.6 H₂O, 24 mg/L, Na₂MoO₄.2 H₂O, 36 mg/L], 1 mL/L, CaCl₂.2H₂O, 8.8 g/L, yeast extract, 0.025 g/L, NaNO₃, 2.4 g/L, Sodium acetate, 1.2 g/L, KCl, 0.86 g/L, MgCl₂.6H₂O, 6.4

20 g/L, Bromothymol blue solution, 0.4%, 3 mL.

The experiment and flow rate tests after 2 weeks of incubation were performed as described in Example 3. While the flow rate increased in the controls as in Example 3, strain BR5311 caused a significant decrease in flow rate (Table 4). The flow rates in the control treatments

25 increased by an average of 20%. The test treatments containing the strain BR5311 inoculum showed a mean decline of 55% in flow rate underlining the ability of *Pseudomonas stutzeri* strain BR5311 to plug pores in a high salt nutrient solution formulation containing acetate.

Table 4

Changes in flow rate through medium porosity glass filters after two weeks incubation.

treatment	flow, mL/sec						
	pre incubation value	post incubation values*			mean	% change in flow rate ¹	Mean % change in flow rate
		#1	#2	#3			
control 1	0.083	0.091	0.091	0.091	0.091	+10	+20
control 2	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0	
control 3	0.111	0.167	0.167	0.167	0.167	+50	
test 1	0.125	0.071	0.071	0.071	0.071	- 43	- 55
test 2	0.083	0.048	0.048	0.048	0.048	- 42	
test 3	0.083	0.015	0.016	0.017	0.016	- 81	

* 3 successive measurements

5 ¹ calculated as ((mean post incubation, mL/sec / preincubation, mL/sec)-1) x 100.

EXAMPLE 5 (Prophetic)

10 PREPARATION OF A NON BIOFILM FORMING INOCULUM OF *PSEUDOMONAS STUTZERI* (STRAIN LH4:15) USING LACTATE

Biomass of *Pseudomonas stutzeri* (strain LH4:15), grown overnight, is prepared as described above. This biomass is then added to a 200 liter capacity fermentor to prepare larger amounts of biomass. Grown biomass is filtered and stored at -80 °C until required for use.

15 A 9,000 liter (L) capacity tank truck containing 6,000 L of a first nutrient solution formulation with lactate, is used containing: sodium chloride: 10,000 ppm; sodium lactate: 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
20 needed) to 6.5 to 7.0. The first nutrient solution formulation ingredients are mixed through circulating the contents of the tank. The truck can be parked in a heated garage while the contents of the tank are circulating to assist in warming the tank to the desired temperature if needed.

25 A block of frozen stock of *Pseudomonas stutzeri* (strain LH4:15) is added to the tank. Circulation of the contents of the tank is 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 is determined by either visual observation of the block, if it is floating, or by monitoring turbidity of the suspension at optical density (OD₆₀₀ nanometer, nm). The suspension of *Pseudomonas stutzeri* (strain LH4:15) thus obtained is used either immediately or stored for a time.

The tank truck containing the suspension of the *Pseudomonas stutzeri* (strain LH4:15) in the first nutrient solution formulation is driven to the injection well. To inoculate the well, the tank is then connected either directly or through a filtration apparatus, designed to stop any large pieces of biomass from passing through (such as a biomass dispersing device described in US Patent Application Publication 20110244554), to a high pressure injection pump. The high pressure pump is 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 is determined by the maximum allowable injection pressure into the reservoir. This injection pressure must remain below the fracture pressure of the rock strata containing the oil.

EXAMPLE 6 (Prophetic)

20 TRIGGERING BIOFILM FORMATION BY PSEUDOMONAS STUTZERI (STRAIN LH4:15) USING ACETATE

Following injection of the biomass into the injection well as described in Example 5, the biomass is pushed deeper into the subterranean strata by injecting either water or the first nutrient solution formulation containing lactate as specified in Example 5. This step is followed by injection of 1,000 to 6,000 L of a second nutrient solution formulation containing 1,000 ppm acetate and including: sodium chloride: 10,000 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) to 6.5 to 7.0. When the added second nutrient solution formulation reaches the subterranean location where *Pseudomonas stutzeri* are deposited, the *Pseudomonas* cells start growing and consuming the acetate in the second nutrient solution

formulation, and produce the biofilms and bioplugs in the pores of the subterranean target site thus altering the target site's permeability.

EXAMPLE 7

5 PREPARATION OF A NON BIOFILM FORMING INOCULUM OF *PSEUDOMONAS STUTZERI* (STRAIN BR5311) USING LACTATE

Biomass of *Pseudomonas stutzeri* strain BR5311 (ATCC No. PTA-11283) was grown overnight and prepared as described above. This biomass was then added to a 200 liter capacity fermentor to prepare a
10 larger amount of biomass. Grown biomass was filtered and concentrated by ~5X and stored at -80 °C until required for use.

A 9,000 liter (L) capacity tank truck containing 6,000 L of a nutrient solution formulation with lactate was prepared containing: sodium chloride: 10,000 ppm; sodium lactate: 1,000 ppm; sodium nitrate: 2,000 ppm; yeast
15 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
20 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
25 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
30 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

10 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.

CLAIMSWhat is claimed is:

- 5 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;
- 10 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
- 15 e) introducing a second nutrient solution formulation into the injection well bore wherein said second nutrient solution formulation promotes bioplagging of pores and channels in the subterranean target site.
- 20
2. The method of claim 1 wherein one or more fluids of (c) assists moving the suspension of one or more microorganisms of (a) into the
- 25 subterranean target site.
3. The method of claim 1 further comprising introducing one or more fluids into the injection well bore following step (d).
- 30 4. The method of claim 1 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).
5. The method of claim 1 further comprising introducing one or more fluids
- 35 into the injection well bore following step (e).

6. The method of claim 5 further comprising periodically introducing additional second nutrient solution formulation between introducing fluids.
- 5 7. The method of claim 1 wherein the biomass suspension of (a) is prepared in the first nutrient solution.
8. The method of claim 7 wherein step (d) is omitted.
- 10 9. The method of claim 1 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*,
15 *Thauera*, *Petrotoga*, *Microbulbifer*, *Marinobacteria*, *Fusibacteria* and *Rhodotorula*.
10. The method of claim 4 wherein said one or more species of microorganisms is selected from the group consisting of *Pseudomonas*
20 *stutzeri* BR5311 (ATCC No. PTA-11283) and *Pseudomonas stutzeri* LH4:15 (ATCC No. PTA-8823).
11. The method of claim 1 wherein the first nutrient solution formulation comprises lactate and no acetate.
- 25 12. The method of claim 11 wherein concentration of lactate in the first nutrient solution formulation is from about 25 parts per million to about 10,000 parts per million.
- 30 13. The method of claim 1 wherein the first and the second nutrient solution formulations comprise nitrate.

14. The method of claim 8 wherein concentration of nitrate is from about 20 parts per million to about 10,000 parts per million.

15. The method of claim 1 wherein the second nutrient solution
5 formulation comprises acetate.

16. The method of claim 15 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.

10

17. 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*;

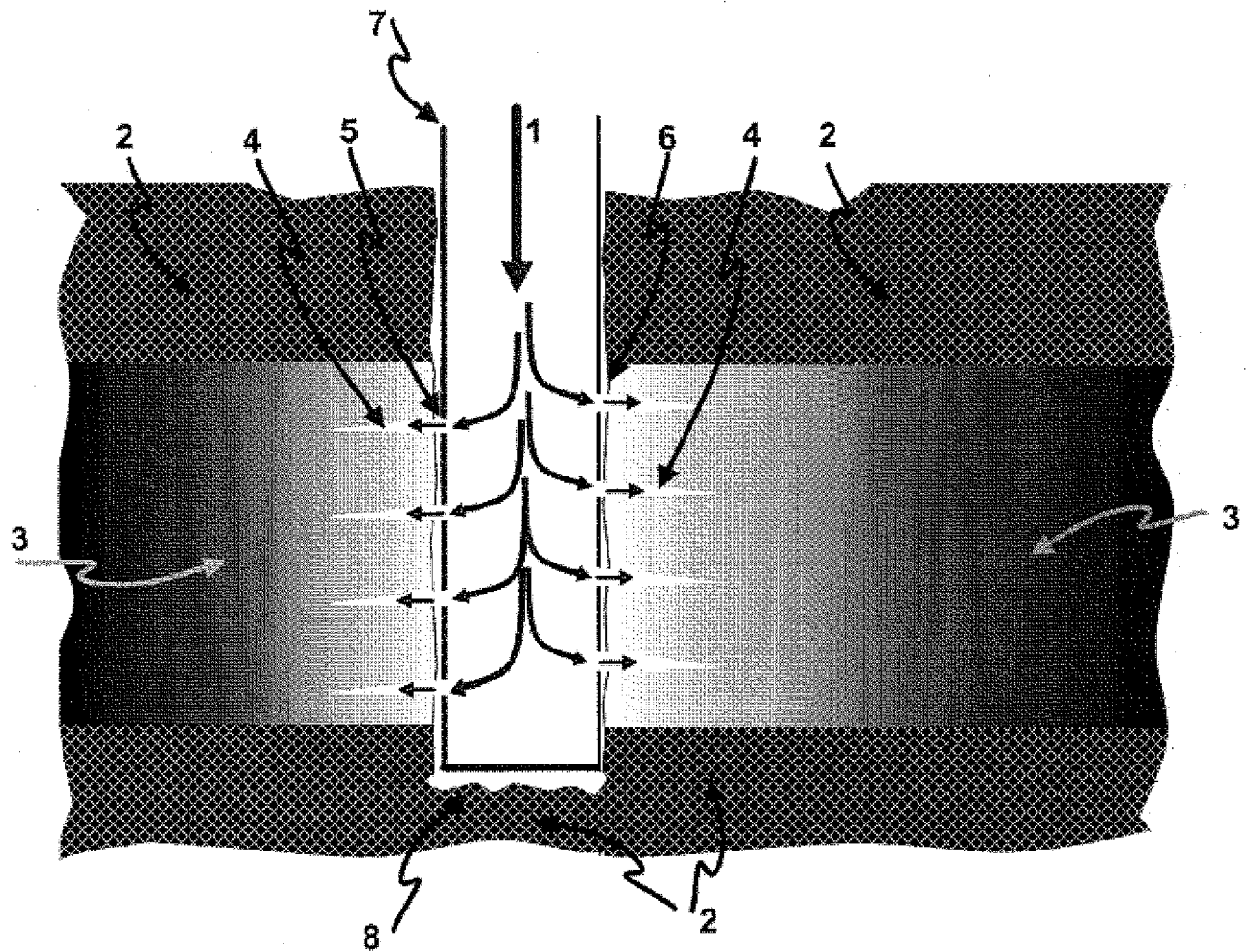
15 b) introducing the suspension of (a) into an injection well bore of the subterranean target site;

c) optionally introducing one or more fluids into said injection well bore;

20 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

25 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).

Figure 1





- (51) International Patent Classification:
E21B 43/22 (2006.01) *C09K 8/58* (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2011/058754
- (22) International Filing Date:
1 November 2011 (01.11.2011)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/408,731 1 November 2010 (01.11.2010) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **E. I. du Pont de Nemours and Company** [US/US]; 1007 Market Street, Wilmington, DE 19898 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **ALSOP, Albert, W.** [US/US]; 2 Bradley Drive, Wilmington, DE 19803 (US). **ANYZEK, Sheryl, M.** [US/US]; 145 Green Haven Drive, Elkton, MD 21921 (US). **FALLON, Robert, D.** [US/US]; 104 Black Oak Drive, Elkton, MD 21921 (US). **HENDRICKSON, Edwin, R.** [US/US]; 49 Kings Grant

Road, Hockessin, DE 19707 (US). **KEELER, Sharon, Jo** [US/US]; 8 Donna Drive, Bear, DE 19701 (US). **PERRY, Michael, P.** [US/US]; 1413 Carolina Place, Downingtown, PA 19335 (US).

- (74) Agent: **HERRELL, Roger, W.**; E. I. du Pont de Nemours and Company, Legal Patent Records Center, 4417 Lancaster Pike, Wilmington, DE 19805 (US).

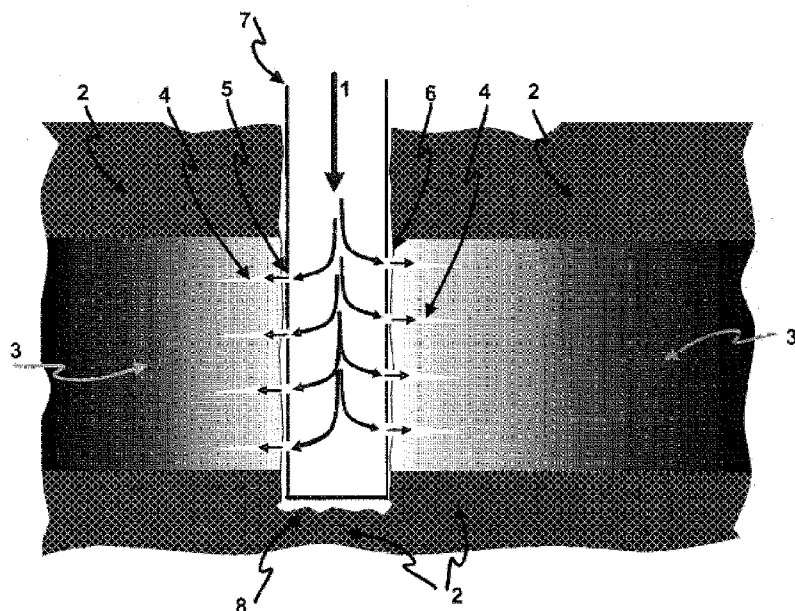
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,

[Continued on next page]

- (54) Title: PREVENTION OF BIOMASS AGGREGATION AT INJECTION WELLS

Figure 1



- (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 processes. 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.



DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— with (an) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description (Rules 13bis.4(d)(i) and 48.2(a)(viii))

Published:

(88) Date of publication of the international search report:

12 July 2012

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2011/058754**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****E21B 43/22(2006.01)i, C09K 8/58(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

E21B 43/22; E21B 33/138

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models

Japanese utility models and applications for utility models

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: microbial enhanced oil recovery, MEOR, nutrient, bioremediation and bioplug.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	US 04799545A A (SILVER; RICHARD S. et al.) 24 January 1989 See abstract, column 3, line 54 - column 4, line 33 and claims 1-9.	1-8, 13, 14 9-12, 15-17
Y A	US 05327967A A (JENNEMAN; GARY E. et al.) 12 July 1994 See abstract, column 2, line 28 - column 4, line 29 and claim 6.	1-8, 13, 14 9-12, 15-17
Y A	US 04905761A A (BRYANT; REBECCA S.) 06 March 1990 See abstract, column 2, line 30 - column 2, line 57 and claim 1.	4 1-3, 5-17
A	US 6758270 B1 (SUNDE; EGIL et al.) 06 July 2004 See abstract, column 3, line 5 - column 4, line 17, figure 1 and claim 1.	1-17



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 MAY 2012 (09.05.2012)

Date of mailing of the international search report

10 MAY 2012 (10.05.2012)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Cheongsa-ro,
Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Kwak Joong Hwan

Telephone No. 82-42-481-8279



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2011/058754

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 04799545A A	24.01.1989	None	
US 05327967A A	12.07.1994	None	
US 04905761A A	06.03.1990	None	
US 6758270 B1	06.07.2004	AU 1160601 A EA 003892 B1 EP 1228288 A1 GB 9926157 D0 NO 20022114 A WO 2001-33040 A1	14.05.2001 30.10.2003 07.08.2002 12.01.2000 18.06.2002 10.05.2001

POD-04104

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 2603081 al español de un documento escrito en inglés, efectuada por Jaime Armando Garavito Burgos, c.c. N° 19.130.702 de Bogotá, Traductor e Intérprete Oficial inglés-español-inglés según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

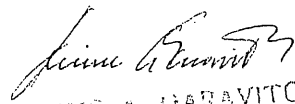
Traducción al español de legalizaciones en poder conferido por E.I. du Pont de Nemours and Company

APOSTILLA

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. Ha sido firmado por Patricia Panariello
3. Quien actúa en calidad de Notario Público del Estado de Delaware
4. Lleva el sello de Patricia Panariello, Notario Público, Delaware

Certificado

5. En Dover, Delaware
6. El séptimo día de marzo 2008 A.D.
7. Por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. N° 0345347
9. Sello (Aparece adherido sello dorado)
10. Firma (firmado) Harriet Smith Windsor, Secretario de Estado


JAIME A. GARAVITO B.
TRADUCTOR E INTÉRPRETE OFICIAL
RES. 034 DE ENERO 11 DE 1983
MINISTERIO DE JUSTICIA

[No se traduce texto del poder por estar en inglés y en español]

Se traduce lo siguiente después del texto del poder:

Dado y suscrito en Wilmington, Delaware, Estados Unidos de América

El 26 de febrero de 2008

Firma de la persona que expide el poder
[Firmado] Miriam A. Mecoxnahey

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

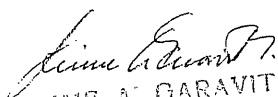
TRADUCCIÓN OFICIAL N° 2603081 al español de un documento escrito en inglés, efectuada por Jaime Armando Garavito Burgos, c.c. N° 19.130.702 de Bogotá, Traductor e Intérprete Oficial inglés-español-inglés según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

El 26 de febrero de 2008 el suscrito Notario

DA FE

1. Que **Miriam D. Meconnahey**, mayor y domiciliada en **1964 Lakeview Road, Wilmington, DE 19805**, suscribió de su puño y letra el documento que antecede.
2. Que conozco personalmente al otorgante y que éste tiene capacidad legal para el otorgamiento.
3. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de **Subsecretario - Junta de Patentes** de la persona jurídica **E.I. du Pont de Nemours and Company**
4. Que la persona jurídica **E.I. du Pont de Nemours and Company** tiene sede en **1007 Market Street, Wilmington, Delaware 19898 Estados Unidos de América**, está legalmente constituida, que tiene existencia legal actual y que el acto para el cual se otorga el poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.
5. Que el otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta y que ésta es legítima.
6. Que he basado las certificaciones 3, 4 y 5 anteriores en los siguientes documentos auténticos que al efecto se me exhibieron y que menciono específicamente con expresión de sus fechas y de su origen o procedencia:

Directrices de la Junta de Patentes de DuPont y Poder fechado junio 12, 2006.

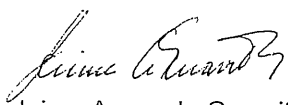

JAIME A. GARAVITO B. 2
TRADUCTOR E INTÉRPRETE OFICIAL
Por Resolución de enero 11 de 1983
MINISTERIO DE JUSTICIA

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 2603081 al español de un documento escrito en inglés, efectuada por Jaime Armando Garavito Burgos, c.c. N° 19.130.702 de Bogotá, Traductor e Intérprete Oficial inglés-español-inglés según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

[Firmado] Patricia Panariello, Notario Público

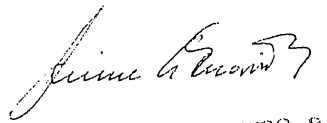
[Aparece adherido sello dorado]

La anterior es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.



Jaime Armando Garavito Burgos
c.c. N° 19.130.702 de Bogotá
Traductor e Intérprete Oficial según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983
expedida por el Ministerio de Justicia

BOGDM5 # 107285



JAIME A. GARAVITO B
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
RES. 034 DE ENERO 11 DE 1983
MINISTERIO DE JUSTICIA

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Patricia Panariello

3. acting in the capacity of Notary Public of the State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Patricia Panariello, Notary Public, Delaware

Certified

5. at Dover, Delaware

6. the seventh day of March, A.D. 2008

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0345347

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State

POWER OF ATTORNEY

The undersigned.

E.I. Du Pont de Nemours and Company
domiciled in

1007 Market Street
Wilmington, Delaware 19898 US

declares that it hereby grants to

ALVARO CORREA-ORDOÑEZ and/or
OLGA GEORGETTE OTERO and/or
RICARDO METKE and/or
JUAN PABLO CONCHA

with domicile at Av. 82 No. 10 – 62, 6Th floor, of Bogotá D. C., Colombia, a full and sufficient power of attorney to obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models, industrial designs, integrated circuits, layout-designs and vegetal varieties; the registration of trademarks, denominations of origin, commercial names, trade emblems, slogans and domain names; its renewal, assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Processes of protection to the consumer, unfair competition, oppositions, cancellations, nullity, precautionary injunctions, infringement, granting of licenses, writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, an administrative processes relating to those rights. And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

I hereby ratify all actions previously taken on behalf of this company by the aforementioned attorneys with respect to the mentioned matters.

Done and subscribed in *Wilmington, DE USA*

On the *26* day of *February* of 2008

Signature of the person issuing the Power

Miriam A. Macenahey

PODER DE ABOGADO

La abajo firmada,

E.I. Du Pont de Nemours and Company
domiciliada en

1007 Market Street
Wilmington, Delaware 19898 US

declara por el presente que otorga a

ALVARO CORREA-ORDOÑEZ y/o
OLGA GEORGETTE OTERO y/o
RICARDO METKE y/o
JUAN PABLO CONCHA

con domicilio en la Av. 82 No. 10 – 62 Piso 6 en Bogotá D. C., Colombia, poder especial amplio y suficiente, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera autoridades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, esquemas de trazado de circuitos integrados y variedades vegetales; el registro de marcas, denominaciones de origen, nombres comerciales, enseñas, lemas comerciales y nombres de dominio; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Los procesos para la protección del consumidor, competencia desleal, oposiciones, cancelaciones, nulidades, medidas cautelares, infracciones, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general procesos civiles, penales, administrativos relacionados con estos derechos. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del caso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

Igualmente, ratifico todo lo actuado hasta el momento en los mismos asuntos, por cualquiera de los mencionados apoderados en representación de ésta sociedad.

Dado y firmado en

A los _____ días del mes de _____ de 2008

Firma de la persona que firma el Poder

NOTARIAL CERTIFICATION

On this 26th day of February 2008, the undersigned Notary

CERTIFIES

1. That Miriam D. Meconnahey of legal age and domiciled in 1964 Lakeview Road, Wilmington, DE 19805 set his hand on the foregoing document.
2. That the grantor is to me personally known and that he/she has legal capacity to execute the instrument.
3. That the grantor has executed the foregoing document as Assistant Secretary – Patent Board of the judicial person E. I. duPont de Nemours and Company
4. That the judicial person E. I. duPont de Nemours and Company having its home office in 1007 Market Street, Wilmington, Delaware 19898 USA is duly organized, has present legal existence and that the purposes for which the power of attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.
5. That the grantor has in fact the referred to authority and that his/her representation is legal.
6. That I have based certifications 3, 4 and 5 above on the following authentic documents for such purpose exhibited to me and which I mention specifically, giving their dates and their origin or source:
DuPont Patent Board Guidelines and Power of Attorney dated June 12, 2006.

CERTIFICACION NOTARIAL

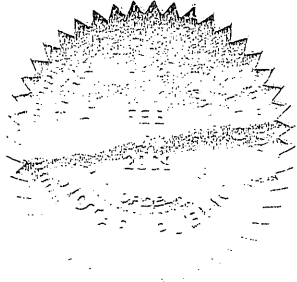
A los días del mes de de 2008, el suscrito Notario

DA FE

1. Que mayor y domiciliado en suscribió de su puño y letra el documento que antecede.
2. Que conozco al otorgante y que éste tiene capacidad legal para el otorgamiento.
3. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de de la persona jurídica E. I. duPont de Nemours and Company
4. Que la persona jurídica E. I. duPont de Nemours and Company con sede en está legalmente constituida, que tiene existencia legal actual y que el acto para el cual se otorga el poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.
5. Que el otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta y que ésta es legítima.
6. Que he basado las certificaciones 3, 4 y 5 anteriores en los siguientes documentos auténticos que al efecto se me exhibieron y que menciono específicamente con expresión de sus fechas y de su origen o procedencia:

Patricia Panariello

Patricia Panariello, Notary Public



El Notario Público

- APOSTILLA –

(Convención de la Haya del 5 de Octubre 1961)

1. **País:** Estado Unidos de América

- Este Documento Público

2. **Ha sido firmado por:** Colleen A. Taylor

3. **Actuando en su calidad de:** Notario Público del Estado de Delaware.

4. **Lleva el sello/timbre de:** Colleen A. Taylor, Notario Público,
Delaware.

Certifica

5. **En:** Dover, Delaware.

6. **El día:** 30 de abril de 2013.

7. **Por:** El Secretario de Estado, Delaware Departamento de Estado.

8. **Numero:** 0493774

9. **Sello:**



10. **Firma:**

Firmado
Secretario de Estado

Estados Unidos de América)
)
Estado de Wilmington DE) ss.
)
Condado de New Castle)

En este día 12 del mes de abril del 2013, personalmente aparecieron ante mí Alberto W. Alsop; Robert D. Fallon; Sheryl M. Anyzek; Edwin R. Hendrickson; Sharon Jo. Keeler; a quienes conozco y para mí son las personas_descritas y quienes ejecutaron el anterior instrumento, y quienes reconocieron ante mí que_ él (ellos)_ejecutó(aron) el mismo.

- firmado -
Notario Público

COLLEEN A. TAYLOR
NOTARIO PÚBLICO
ESTADO DE DELAWARE
Mi cargo expira el 25 de enero de 2014.

Estados Unidos de América)
)
Estado de Delaware) ss.
)
Condado de New Castle)

En este día 15 del mes de abril del 2013, personalmente apareció ante mí Michael P. Perry; a quien conozco y para mí es la persona_descrita y quien ejecutó el anterior instrumento, y quien reconoció ante mí que_él_ejecutó el mismo.

 - firmado -
Notario Público

COLLEEN A. TAYLOR
NOTARIO PÚBLICO
ESTADO DE DELAWARE
Mi cargo expira el 25 de enero de 2014.

- Esta es una traducción fiel copia al documento enviado en pdf que se guarda en los archivos del traductor para futura referencia. Realizado en Bogotá D.C., el 22 de mayo de 2013 -

PREVENCIÓN DE LA AGREGACIÓN DE BIOMASA EN POZOS DE INYECCIÓN

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos núm. 61/408731, presentada el 1 de noviembre de 2010, que se incorpora en su totalidad como referencia.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente descripción se relaciona con el campo de microbiología ambiental. Específicamente, se refiere al campo de recuperación microbiana mejorada de petróleo y bioremediación. Más específicamente, se refiere a la prevención de agregación microbiana y formación de biopelículas en el pozo de inyección durante la recuperación microbiana mejorada de petróleo o bioremediación.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Típicamente, durante la recuperación de petróleo de los reservorios de petróleo, solamente porciones menores del petróleo original en el estrato subterráneo que contiene petróleo se recuperan por medio de métodos de recuperación primaria que usan únicamente las fuerzas naturales presentes en el reservorio de petróleo. Los métodos de recuperación secundaria tales como inyección de agua, es decir, la inyección de agua a través de pozos de inyección al reservorio

de petróleo, se han usado para forzar el petróleo por los estratos subterráneos hacia los pozos de producción y, de este modo, mejorar la recuperación de petróleo (Hyne, N.J., 2001, “Non-technical guide to petroleum geology, exploration, drilling, and producción”, 2.º edición, Pen Well Corp., Tulsa, OK, EE. UU.). Un problema comúnmente encontrado con las operaciones de inyección de agua es que la heterogeneidad de los estratos subterráneos puede conducir a una reducción en la eficiencia de barrido durante la inyección de agua. En otras palabras, preferentemente, el agua encauza por los estratos más porosos del reservorio de petróleo al pasar del pozo de inyección a los pozos de producción y crea estratos invadidos por agua, y se desvía por otros estratos subterráneos que contienen petróleo que no están invadidos por agua para reducir, de ese modo, la eficiencia de recuperación de petróleo del estrato que no está invadido por agua.

Se conoce el uso de recuperación microbiana mejorada de petróleo (MEOR) para ayudar en la recuperación de petróleo (Brown, L. R., Vadie, A. A., Stephen, O. J. SPE 59306, SPE/DOE Improved Oil Recovery Symposium, Oklahoma, 3-5 - abril, 2000). Se pueden inyectar microorganismos viables en un reservorio de petróleo donde pueden adherirse a las superficies de poros y canales en las matrices de las rocas o arena en las zonas invadidas por agua y taponarlas para

evitar el encauzamiento del agua hacia zonas invadidas por agua durante la inyección de agua, que dirige el flujo de agua hacia un área más grande del estrato subterráneo que contiene petróleo que no ha sido invadido por el agua.

5 (Ramkrishna, S., Prog. Energy com. Sci., 34: 714-724, 2008).

Uno de los problemas asociados con la MEOR es la actividad prematura de microorganismos introducidos exógenamente, o microorganismos nativos, al añadir soluciones nutrientes a un pozo de inyección, lo que resulta en la
10 formación prematura de biotaponos y bloqueo de los poros cerca del pozo de inyección. En esta situación, los componentes introducidos al pozo de inyección no pueden moverse al estrato subterráneo que contiene petróleo para fomentar la MEOR.

La patente núm. WO 2009017810A1 describe un método para
15 la recuperación intensificada de petróleo de una formación de rocas que contienen petróleo. El método implica introducir un consorcio de microorganismos y una solución nutriente a un pozo de inyección. El consorcio se mantiene por una cantidad de tiempo suficiente para que el crecimiento y la colonización
20 de los microbios en el reservorio desplacen el petróleo.

La publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos copendiente y de propiedad compartida núm. US 20100081585A1, que se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad, describe la activación del
25 control de microorganismos en los procesos de MEOR y

bioremediación y depende de formulaciones que son inhibidoras, en concentraciones aplicadas, tanto para los microbios nativos como para los introducidos cuando se aplican en el lugar. Estas formulaciones evitan el crecimiento y activación microbiana hasta que el agente inhibidor se ha disipado.

La patente de los Estados Unidos núm. 4,947,923 describe un proceso para la MEOR, que comprende inyectar bacterias a un pozo e inyectar una fuente de nutrientes para provocar que las bacterias crezcan y taponen selectivamente la formación. El nutriente usado es capaz de fluir hacia el fondo del pozo y proporcionar una fuente de nutrientes de fosfato, por ejemplo, tripolifosfato, sin precipitación al contacto con agua intersticial.

Para obtener operaciones de MEOR y bioremediación exitosas, la prevención de la formación de biotaponos prematuros y bloqueo de los poros cercanos al pozo de inyección permanece un problema que debe resolverse.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En un aspecto, la presente invención es un método para el tratamiento de un sitio subterráneo objetivo; el método comprende las etapas de, en orden:

- a) preparar una suspensión de biomasa que comprende una o más especies de microorganismos;

- 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;
- 5 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
- 10 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 dicha segunda formulación de solución nutriente
- 15 fomenta el biotaponamiento de poros y canales en el lugar subterráneo objetivo.

En otro aspecto de la invención se presenta un método para el tratamiento de un lugar subterráneo objetivo; el método comprende las etapas de, en orden:

- 20 a) preparar una suspensión de biomasa que comprende una o más cepas de *Pseudomonas stutzeri*;
- b) introducir la suspensión de (a) al pozo de inyección del lugar subterráneo objetivo;
- c) introducir uno o más fluidos a dicho pozo de
- 25 inyección;

- d) introducir una primera formulación de solución nutriente al pozo de inyección, en donde la primera solución nutriente comprende lactato y ningún acetato, en donde el lactato fomenta el crecimiento de las *Pseudomonas stutzeri* y mantiene las *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).

15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURA DE LA INVENCION

La Figura 1 es un esquema de un pozo y de los sitios subterráneos adyacentes a este. Todos los números en negrita que están a continuación se refieren a la Figura 1. **(1)** es el flujo de agua por inyección al entubado del pozo **(7)**, **(2**
20 y **3)** son capas rocosas, **(4)** son las perforaciones en el entubado, **(5)** es el agujero del pozo, **(6)** es la superficie de arena del pozo de inyección, **(8)** es el fondo del pozo en la capa rocosa **(2)**.

Los solicitantes elaboraron el siguiente depósito
25 biológico de conformidad con los términos del Tratado de

Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de patentes:

5 Información sobre la cepa depositada

Identificación del depositante Referencia	Designación de depósito internacional	Fecha de depósito
10 <i>Pseudomonas stutzeri</i> BR5311	ATCC núm. PTA-11283	9/9/2010
<i>Pseudomonas stutzeri</i> LH4:15	ATCC núm. PTA-8823	12/4/2007
15 <i>Pseudomonas stutzeri</i> 89AC1-3	ATCC núm. PTA-11284	9/9/2010
<i>Arcobacter sp</i> 97AE3-3	ATCC núm. PTA-11410	10-14-10
<i>Arcobacter sp</i> 97AE3-12	ATCC núm. PTA-11409	10-14-10

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los solicitantes incorporan específicamente el contenido completo de toda la bibliografía citada en esta descripción. A menos que se establezca de cualquier otra forma, todos los
5 porcentajes, partes, relaciones, etc., se expresan en peso. Las marcas registradas se muestran en mayúsculas. Adicionalmente, cuando una cantidad, concentración, u otro valor o parámetro se da ya sea como un intervalo, intervalo preferido o una lista de valores preferibles superiores y
10 valores preferibles inferiores, esto se entenderá específicamente al describir todos los intervalos formados de cualquier par de cualquier límite de intervalo superior o valor preferido y cualquier límite de intervalo inferior o valor preferido, sin considerar si los intervalos se
15 describen separadamente. En los casos en que en la presente descripción se mencione un intervalo de valores numéricos, a menos que se establezca de cualquier otra forma, el intervalo pretende incluir los límites de este y todos los números enteros y fracciones comprendidos dentro del intervalo. No
20 está previsto que el alcance de la invención esté limitado a los valores específicos mencionados al definir un intervalo.

Se presentan las siguientes definiciones para los términos especiales y abreviaciones usadas en esta solicitud:

La abreviación "ATCC" se refiere a American Type Culture
25 Collection International Depository, Manassas, VA, EE. UU.

“ATCC núm.” se refiere al número de registro de los cultivos en depósito con el ATCC.

El término “biopelícula” significa una película o “capa de biomasa” de microorganismos. Frecuentemente, las biopelículas
5 están incorporadas en polímeros extracelulares que se adhieren a superficies sumergidas en, o sometidas a, entornos acuáticos. Las biopelículas consisten en una matriz de una masa compacta de microorganismos con heterogeneidad estructural, que pueden tener diversidad genética, interacciones complejas de
10 comunidad, y una matriz extracelular de sustancias poliméricas.

El término “biopelícula de taponamiento” o “biotapón” significa una biopelícula que es capaz de alterar la permeabilidad de un material poroso y, así, retardar el movimiento de un fluido a través de un material poroso
15 asociado con la biopelícula o biotapón.

La invención se refiere a un método para la prevención del taponamiento de la superficie de arena de un pozo de inyección, y de los poros cercanos al pozo de inyección, durante la aplicación de MEOR o bioremediación por medio de introducir
20 fluidos y formulaciones de nutrientes seleccionados. En el método descrito, después de la introducción de la suspensión de biomasa microbiana a un pozo de inyección, opcionalmente, se añade fluido para mover la biomasa lejos del sitio de introducción. Después de esto se introduce una primera

formulación de solución nutriente al pozo de inyección que proporciona nutrientes para el crecimiento de microorganismos en el lugar subterráneo objetivo sin fomentar la agregación de biomasa y la formación de biopelículas. Seguidamente, se introduce una segunda formulación de solución nutriente que fomenta la adhesión de microorganismos a los poros y canales en el lugar subterráneo objetivo y la producción de biopelículas para la formación de biotaponos.

En una modalidad, la suspensión de biomasa microbiana se prepara en la primera formulación de solución nutriente, y esta preparación de suspensión se introduce al pozo de inyección. Cuando se usa la suspensión de biomasa preparada en la primera solución nutriente, se puede introducir más de la primera formulación de solución nutriente después de la introducción opcional de fluido, o esta etapa puede omitirse.

La “superficie de arena del pozo de inyección” está orientada hacia las capas rocosas (Figura 1: **2, 3**) de los estratos subterráneos que están en comunicación con el pozo de inyección a través de perforaciones en el entubado del pozo (Figura 1: **4**). El método presente altera la permeabilidad del sitio subterráneo objetivo y, de ese modo, ayuda en la recuperación de petróleo o bioremediación. La frase “sitio subterráneo objetivo”, como se usa en la presente, se refiere a zonas debajo de la superficie de la tierra compuesta por

piedra arenisca, arena no consolidada o piedra caliza, en donde se aplica la MEOR o bioremediación. Como se usa en la presente, la frase “alterar la permeabilidad del sitio objetivo” se refiere a los procesos que resultan en el taponamiento de las zonas invadidas por agua y, así, redirigir el flujo de inundación de agua hacia las zonas que no han sido invadidas por agua. Estos procesos incluyen la formación de biopelículas y taponamiento de los poros de la arena y las rocas en el lugar subterráneo objetivo por microorganismos.

En otras modalidades, pueden incluirse etapas adicionales en el método. Por ejemplo, en una modalidad, después de la etapa (d), el pozo de inyección se cierra por un periodo de tiempo. Durante este tiempo, el pozo está cerrado, de manera que no se introduce nada al pozo, y los microorganismos crecerán en su nuevo entorno. En otra modalidad, después de la etapa (d) se introducen uno o más fluidos al pozo de inyección. Este fluido se usa para mover el microorganismo más hacia el sitio subterráneo objetivo. En otra modalidad, el pozo de inyección se cierra por un periodo de tiempo después de introducir uno o más fluidos después de la etapa (d). En otra modalidad, después de la etapa (e), uno o más fluidos se introducen al pozo de inyección. Las torrentes de fluido se mueven a través de poros no bloqueados y canales, sacando el petróleo para recuperación de petróleo, u otras sustancias

para bioremediación. En otra modalidad se introduce la segunda formulación de solución nutriente al pozo de inyección después de la etapa (e) para fomentar más formación de biopelículas. La segunda formulación de solución nutriente adicional se
5 añade, típicamente, periódicamente, en lotes entre las introducciones de fluidos. En el presente método puede usarse cualquier combinación de estas etapas adicionales.

En la Figura 1 se ilustra un esquema de un pozo de inyección el sitio subterráneo adyacente a este. Cuando se
10 introduce un fluido (1) al pozo de inyección, este fluye al entubado del pozo (7) que está dentro del pozo (5) perforado a través de las capas rocosas (2, 3). Existe un espacio entre el entubado del pozo (7) y la superficie de arena del pozo de inyección (6) de la capa rocosa hecha por el agujero
15 del pozo (5). La capa rocosa (2) representa las rocas impermeables encima y debajo de una capa de roca permeable (3) que guarda o atrapa petróleo. Cualquier fluido (1) introducido al pozo desciende por el entubado del pozo (7) y pasa a través de perforaciones en el entubado (5) y hasta
20 las perforaciones (4) en la matriz rocosa del estrato subterráneo que contiene petróleo (3). Después, este fluido desciende al estrato subterráneo que contiene petróleo (3) y desplaza al petróleo de estos estratos. Esta zona se extiende radialmente del pozo (5) en todas las direcciones
25 en los estratos que contienen petróleo (3).

En el presente método, cuando se introduce biomasa microbiana a un pozo de inyección, se sigue, opcionalmente, con la adición de uno o más fluidos para ayudar a mover los microorganismos al sitio subterráneo objetivo adyacente. Los fluidos adecuados para usar en la presente pueden incluir, por ejemplo, agua de inyección y producción que se usa durante las operaciones de MEOR. Un fluido útil en el presente método comprende agua. El agua puede suministrarse de una fuente adecuada y puede incluir, por ejemplo: agua de mar, saladar, agua de producción, agua recuperada de un acuífero subterráneo, que incluyen aquellos acuíferos en contacto con el petróleo en un sitio subterráneo, o agua superficial de una corriente, río, laguna o lago. Como se conoce en la técnica, puede que sea necesario eliminar materias particuladas que incluyen polvo, pedazos de roca o arena y subproductos de corrosión tales como herrumbre del agua antes de la inyección a uno o más pozos. Los métodos para eliminar tales materias particuladas, por ejemplo, filtración, sedimentación y centrifugación, se conocen en la técnica.

En una modalidad del método descrito, se introducen aguas de inyección o producción de reservorios de petróleo a un pozo de inyección después de la introducción de una suspensión de biomasa microbiana para mover los microorganismos introducidos al pozo de inyección más allá, hacia el sitio subterráneo objetivo adyacente.

El agua de inyección o agua de producción de tales pozos puede contener varias concentraciones de sales mezcladas que contienen, por ejemplo cloruro, sodio, potasio, bromo, magnesio, bario y calcio (de aquí en adelante, “sal”). La salinidad del agua de pozo de inyección o producción puede ser de aproximadamente 0 a aproximadamente 100 partes por mil (ppt).

Aun cuando se prepara una suspensión de biomasa bien dispersada, esta puede agregar y provocar taponamiento de la superficie de arena del pozo de inyección después de su introducción al pozo, por lo que reduce, de ese modo, la cantidad de biomasa que llega al sitio subterráneo objetivo en donde tendrá lugar la recuperación de petróleo o bioremediación, o aumenta la presión necesaria para bombear fluido al pozo y, en el peor de los casos, destaponar efectivamente el pozo. El presente método reduce la agregación de biomasa microbiana y biopelículas y la formación de biotaponos en la superficie de arena del pozo de inyección por medio de introducir fluidos y formulaciones de soluciones nutrientes descritas en la presente descripción, que permiten una penetración más profunda de la biomasa al sitio subterráneo objetivo.

Formulación de soluciones nutrientes

Las formulaciones de soluciones nutrientes útiles en la presente invención pueden incluir sustratos de crecimiento

(compuestos que suministran masa y energía para el crecimiento celular); aceptores de electrones; fuentes de nitrógeno y fósforo, así como varios oligoelementos tales como vitaminas y metales que se necesitan, usualmente, para el crecimiento y actividad microbiana, además del sustrato de crecimiento y las fuentes de nitrógeno.

Las formulaciones de soluciones nutrientes útiles en la presente invención comprenden las siguientes sustancias, solas o en combinación: fuentes de carbón, añadidas en relaciones mayores que 0,01 % peso/volumen; un aceptor de electrones para crecimiento microbiano (en condiciones de crecimiento anaerobio), añadido en una relación mayor que 0,01 % p/v; una fuente de nitrógeno, añadida en una relación mayor que 0,001 % p/v; una fuente de fósforo, añadida en una relación mayor que 0,001 % p/v; una fuente de oligonutrientes, tales como vitaminas y metales, añadidos en una relación mayor que 0,0001 % p/v.

Las formulaciones de soluciones nutrientes útiles contempladas en la presente descripción incluyen aquellas que contienen por lo menos uno de los siguientes elementos: C, H, O, P, N, S, Mg, Fe, o Ca. Los ejemplos no limitantes de radicales inorgánicos que comprenden por lo menos un elemento de los citados anteriormente incluyen, por ejemplo: PO_4^{2-} , NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- , y SO_4^{2-} . Los sustratos de crecimiento pueden incluir azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes,

proteínas, polisacáridos, grasas, hidrocarburos u otros materiales orgánicos conocidos en la técnica de la microbiología para ser sometidos a descomposición microbiana. Nutrientes vitales que contienen nitrógeno y fósforo (los ejemplos no limitantes pueden incluir NaNO_3 , KNO_3 , NH_4NO_3 , Na_2HPO_4 , K_2HPO_4 , NH_4Cl); vitaminas (los ejemplos no limitantes pueden incluir ácido fólico, ácido ascórbico, y riboflavina); oligoelementos (los ejemplos no limitantes pueden incluir B, Zn, Cu, Co, Mg, Mn, Fe, Mo, W, Ni, y Se); amortiguadores para controles medioambientales; catalizadores, que incluyen enzimas; y pueden incluirse aceptores de electrones naturales y artificiales (los ejemplos no limitantes pueden incluir SO_4^{2-} , NO_3^- , Fe^{+3} , ácido húmico, óxidos minerales, compuestos de quinona, CO_2 , O_2 , y combinaciones de estos). Pueden usarse ingredientes complejos tales como extracto de levadura para proporcionar múltiples nutrientes tales como vitaminas y aminoácidos.

En el presente método se usan formulaciones de soluciones nutrientes separadas que tienen distintos efectos sobre uno o más microorganismos durante tratamiento de un lugar subterráneo objetivo. Las formulaciones de soluciones nutrientes se introducen al pozo de inyección en un lugar subterráneo objetivo después de la introducción de una suspensión de biomasa y, opcionalmente, uno o más fluidos. La primera solución nutriente proporciona nutrientes que

sustentan el crecimiento de uno o más microorganismos introducidos, pero no fomenta la agregación de biomasa y formación de biopelículas. Con la primera formulación de solución nutriente puede haber alguna formación de biopelículas, pero es reducida en comparación con la cantidad de formación de biopelículas producidas por el (los) microorganismo(s) en presencia de la segunda formulación de solución nutriente. Así, la primera formulación de solución nutriente no fomenta la formación de biopelículas. Además, la primera solución nutriente puede mantener los microorganismos en suspensión, en lugar de fomentar la agregación. De este modo, con la introducción de la primera solución nutriente, los microorganismos introducidos pueden expandirse y crecer por todo el sitio subterráneo objetivo sin bloquear la superficie de arena del pozo de inyección ni los poros cercanos al pozo.

La segunda solución nutriente, que se introduce después de la primera solución nutriente, fomenta efectos en los microorganismos que conducen al biotaponamiento de poros y canales en el lugar subterráneo objetivo. Los efectos pueden incluir agregación, adhesión y producción de biopelículas. Así, con la introducción de la segunda solución nutriente, los poros y canales en el lugar subterráneo objetivo se bloquean, lo que lleva a una recuperación mejorada de petróleo o bioremediación.

Las diferencias en la composición de la primera y segunda formulaciones de soluciones nutrientes pueden estar en cualquier componente o componentes que fomentan los diferentes efectos descritos anteriormente. Por ejemplo, puede haber

5 diferencias en los sustratos de crecimiento. En una modalidad del presente método, la primera formulación de solución nutriente introducida después de la introducción de la suspensión de biomasa y, opcionalmente, por lo menos un fluido, contienen lactato y no contienen acetato. La

10 concentración de lactato en la primera formulación de solución nutriente es de 25 partes por millón a aproximadamente 10,000 partes por millón. A esto le sigue la introducción de la segunda formulación de solución nutriente que contiene acetato. La concentración de acetato en la segunda formulación

15 de solución nutriente puede ser de hasta 30 por ciento en peso. La primera y segunda formulaciones de soluciones nutrientes comprenden nitrato hasta 30 por ciento en peso.

Los efectos de las distintas formulaciones de soluciones nutrientes sobre los distintos microorganismos también pueden

20 variar en presencia de distintas concentraciones de sales. Por ejemplo, puede ocurrir una mayor diferencia en la formación de biopelículas entre formulaciones de soluciones nutrientes que contienen lactato o acetato en presencia de sal alta en comparación con sal baja. La concentración alta de sal puede

ser al menos aproximadamente 30 ppt, 35 ppt, 40 ppt, 45 ppt, 50 ppt, 55 ppt, 60 ppt, 65 ppt, 70 ppt, o 75 ppt, o mayor.

En el presente método, después de la introducción de una suspensión de biomasa que contiene microorganismos, la
5 combinación de la primera y segunda solución nutriente con lactato y acetato, respectivamente, puede usarse con cualquier microorganismo que tenga mayor biotaponamiento en un medio que contiene acetato, a diferencia de un medio que contiene lactato.

10 Los microorganismos pueden identificarse por tener diferentes propiedades en diferentes formulaciones de soluciones nutrientes por medio de pruebas en ensayos de biopelícula, tal como se describe en los Métodos generales en la presente. Por ejemplo, en la presente descripción se
15 mostró que las cepas BR5311 (ATCC núm. PTA-11283) y LH4:15 (ATCC núm. PTA-8823) de *Pseudomonas stutzeri* forman biotapones más efectivos en solución nutriente que contiene acetato que en solución nutriente que contiene lactato. La respuesta del biotapón puede variar con la salinidad de la
20 solución nutriente usada; una persona con experiencia en la técnica puede evaluar la respuesta fácilmente por medio del uso de ensayos descritos en la presente descripción.

En otra modalidad, pueden usarse otros microorganismos para taponamiento que podrían necesitar otros nutrientes
25 específicos para la formación de biopelículas y taponamiento.

Las composiciones necesarias para la primera y segunda solución nutriente pueden determinarse fácilmente por una persona con experiencia en la técnica en base a las respuestas de taponamiento del (los) microorganismo(s) a introducirse en la suspensión de biomasa por medio del uso de ensayos descritos en los Métodos generales de la presente descripción.

Biomasa

La suspensión de biomasa útil para el método descrito en la presente, para formar biopelículas y taponar los poros del lugar subterráneo objetivo, puede comprender clases de anaerobios facultativos, anaerobios estrictos y desnitrificantes. Varias especies de microorganismos (bacteria y hongos) que se usan para la formación de biopelículas y agregación para mejorar la eficiencia de barrido y mejorar la recuperación de petróleo pueden incluir, pero no se limitan a, los géneros: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Actinomycetes*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Schizomycetes*, *Corynebacteria*, *Achromobacteria*, *Arcobacter*, *Enterobacteria*, *Nocardia*, *Saccharomycetes*, *Schizosaccharomyces*, *Vibrio*, *Shewanella*, *Thauera*, *Petrotoga*, *Microbulbifer*, *Marinobacteria*, *Fusibacteria*, y *Rhodotorula*. Los términos “género” y “géneros”, como se usa en la presente descripción, se refieren a la categoría de microorganismos que se clasifican debajo de una “familia” y por encima de una especie en la jerarquía de la

clasificación taxonómica de los microorganismos. “Especies”, como se usa en la presente descripción, se refiere a un grupo de microorganismos que comparten un alto grado de similitudes fenotípicas, bioquímicas y genotípicas.

5 La suspensión de biomasa puede comprender una única especie, dos o más especies de los mismos géneros, una combinación de géneros diferentes, o una combinación de múltiples especies de múltiples géneros de microorganismos. En una modalidad, la suspensión de biomasa para la práctica
10 del presente método se obtiene por medio del uso de *Pseudomonas stutzeri* LH4:15 (ATCC NO: PTA-8823) descrito en la publicación de la solicitud de patente copendiente y de propiedad compartida núm.: 20090263887, cuyo contenido se incorpora en la presente en su totalidad como referencia. En
15 otra modalidad, la suspensión de biomasa para la práctica del presente método se obtiene por medio del uso de la cepa BR5311 (ATCC núm. PTA-11283) de *Pseudomonas stutzeri*, que se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos copendiente y de propiedad compartida núm. 61/408734, que se
20 incorpora en la presente como referencia. En otra modalidad adicional, la suspensión de biomasa contiene ambas cepas.

La suspensión de biomasa, fluidos y soluciones de nutrientes pueden introducirse al pozo por varios medios tales como una bomba centrífuga, una bomba de pistón, bomba

de engranajes o cualquier otro dispositivo o mediante cualquier otro método conocido en la técnica.

Preparación de biomasa

La suspensión de biomasa útil para el presente método se
5 prepara por medio de cultivar uno o más microorganismos
preferidos en un medio apropiado. Una persona con experiencia
en la técnica estará familiarizada con cualquier medio
adecuado que puede usarse para la preparación de biomasa de
los microorganismos deseados. Cuando se usa la cepa
10 *Pseudomonas stutzeri*, el medio adecuado puede contener
lactato que no sustenta la formación de biotaponés. La
biomasa puede concentrarse por filtración o centrifugación.
La biomasa puede prepararse según se requiera para su
inmediata introducción al pozo de inyección sin
15 almacenamiento. Alternativamente, la biomasa puede prepararse
con anticipación y puede almacenarse congelada como una
pasta. La preparación de biomasa de una biomasa congelada
requiere atención especial y, probablemente, la aplicación de
uno o más tipos de mezcladoras para asegurar la completa
20 resuspensión de la biomasa y la ausencia de cualquier
agregado celular. Por ejemplo, un método para obtener una
población de biomasa que incluye fluir por un dispositivo
dispersador de biomasa, se describe en la publicación de la
solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 20110244554,
25 que se incorpora en la presente descripción como referencia.

El método descrito puede usarse, además, para la bioremediación de sitios contaminados.

EJEMPLOS

5 La presente invención se define más detalladamente a través de los siguientes ejemplos. Debe entenderse que si bien estos ejemplos indican modalidades preferidas de la invención, estos se proporcionan con fines ilustrativos únicamente. A partir de la descripción anterior y de estos
10 ejemplos, una persona con experiencia en la técnica podrá determinar las características esenciales de esta invención y, sin apartarse del alcance de ella, podrá introducir varios cambios y modificaciones en la invención para adaptarla a los diversos usos y condiciones.

15 Métodos Generales

Crecimiento de biomasa

Las técnicas para crecimiento y mantenimiento de microorganismos anaerobios son bien conocidas en la técnica. El crecimiento anaerobio se mide por la reducción de nitrato
20 de la solución nutriente de crecimiento en el tiempo y la acumulación de nitrito.

La biomasa puede cultivarse y almacenarse tal como se describe en la publicación de la solicitud de patente copendiente núm.: 20090263887, cuyo contenido se incorpora
25 en la presente en su totalidad como referencia.

El medio PPGAS contenía: 20 milimoles (mM) de NH_4Cl , 20 mM de KCl , 120 mM de Tris-Cl , 1,6 mM de MgSO_4 , 1 % de peptona, 0,5 % de glucosa, pH 7,5.

La composición de la formulación de solución nutriente de sales mínimas que se usan en los ejemplos a continuación se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1

10 Composición de la formulación de solución nutriente de sales mínimas

	g/l	Sustancia química
	1,0	NH_4Cl
	0,5	KH_2PO_4
15	0,4	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
	0,2	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
	10	NaCl
	0,69	NaH_2PO_4
	2,5	NaHCO_3
20	0,073	KSO_4
	1000X g/l	Oligoelementos
	1,5	$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
	0,002	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
25	0,1	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

5	0,19	CoCl ₂ .6H ₂ O
	0,07	ZnCl ₂
	0,006	H ₃ BO ₃
	0,036	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O
	0,024	NiCl ₂ .6H ₂ O
10	0,277	HCl
	1000X g/l	Selenio/tungstato
	0,006	Na ₂ SeO ₃ .5H ₂ O
	0,008	Na ₂ WO ₄ .2H ₂ O
	0,5	NaOH
15	1000X mg/l	Mezcla de vitaminas
	100	Vitamina B12
	80	Ácido p-aminobenzoico
	20	D(+)-biotina
	200	Ácido nicotínico
20	100	Pantotenato cálcico
	300	Hidrocloruro de piridoxina
	200	Tiamina-HCL.2H ₂ O
	50	Ácido alfa-lipoico
	El pH del medio se ajustó a 7,3.	

Formulación de solución nutriente comprada

Se compró un medio de crecimiento Millers LB (MediTech, Inc, Manassas, VA).

Muestras de agua de inyección

Se sacaron muestras de agua de inyección de dos campos separados, ubicados en dos campos distintos de producción de petróleo. El pozo núm. 1 está ubicado en el campo Senlac en la
5 frontera de las provincias de Saskatchewan y Alberta, Canadá. Este pozo tiene una salinidad entre 30-35 partes por mil (ppt) en las aguas de producción e inyección. El pozo núm. 2 está en el campo Wainwright en la provincia de Alberta, Canadá. Este pozo tiene una salinidad de aproximadamente el doble del agua
10 de mar, que está en el intervalo de 65 ppt.

Muestras de agua de producción e inyección del reservorio de petróleo.

Se obtuvieron muestras de agua de pozos de producción y de inyección (pozo núm. 1 y pozo núm. 2) como líquidos de
15 mezcla de petróleo/agua en frascos de vidrio marrón de 1,0 litros (l), llenos hasta el borde, tapados y sellados con cinta para evitar la fuga de gas. El gas producido durante los procesos anaerobios inherentes fue suficiente para mantener las condiciones anaerobias durante el envío.
20 Los frascos se enviaron en enfriadores grandes de plástico llenos de bloques de hielo a las instalaciones de pruebas dentro de las 48 horas del muestreo.

Medición del total de sales disueltas (salinidad)

El total de sal disuelta se midió con un refractómetro portátil (Modelo RHS 10ATC, Huake Instrument Co., Ltd, Shenzhen, China).

5 Formación de biopelículas en filtros de vidrio sinterizado

Se desarrolló un ensayo para evaluar microorganismos por su habilidad para formar biopelículas sobre superficies de sílice y evitar el flujo de agua a través de espacios porosos de ~10 micrones (taponamiento) con el uso de filtros de vidrio sinterizado. Se pegaron filtros de gas sinterizado de 10 25 milímetros (mm) de granulosis media (inventario núm. 15254, Adams and Chittenden Scientific Glass, Berkeley CA) a la base de soportes de plástico diseñados para filtración por membranas. Después del curado, las unidades de filtro se 15 esterilizaron mediante autoclave. Se puso cada filtro, en soportes, en placas Petri esterilizadas y la formulación de solución nutriente, que contenía inóculo de cultivos de varias cepas durante la noche, se añadió encima de los filtros de vidrio. La formulación de solución de nutrientes en este ensayo 20 de formación de biopelículas/taponamiento fue un medio de sales mínimas (Tabla 1) o muestras de agua de inyección o producción, suplementada con nitrógeno, fosfato, oligoelementos, vitaminas, fuente de carbono y nitrato como aceptor de electrones. Las placas Petri se cubrieron e incubaron a temperatura ambiente 25 bajo condiciones anaerobias por una o dos semanas. Los filtros

se retiraron de la formulación de solución nutriente y la parte superior del soporte plástico se ajustó en su sitio. Un tubo de diez centímetros de largo se adjuntó al puerto de entrada del soporte del filtro y se llenó con agua. Se midió el tiempo (en 5 segundos) para drenar el agua en el tubo. Los filtros de control sin ningún microorganismo tomaron alrededor de 10 segundos para drenar. Los filtros que tomaron más de 10 segundos para drenar se consideraron “taponados”.

En un ensayo alternativo de taponamiento, los filtros 10 de vidrio sinterizado se infiltraron con fluido antes de usar, se cribaron para determinar el régimen de flujo antes de la adición de microorganismos, y el porcentaje de cambio en el régimen de flujo pos-incubación se determinó al final del experimento.

15

Ejemplo 1

Habilidad de *Pseudomonas stutzeri* (LH4:15) para formar biopelículas en superficies de sílice

Para evaluar la habilidad de la cepa LH4:15 (ATCC núm. 20 PTA-8823) de *Pseudomonas stutzeri* para producir biopelículas estables en superficies de sílice, se colocaron cuentas de vidrio esterilizadas (3 mm, núm. 11-312A, Fisher Scientific, Hampton, NH) en los pocillos de una placa de microtitulación de 24 pocillos (núm. 353047, BD Biosciences) y se añadió una 25 alícuota (1,0 ml) de agua de inyección o el medio PPGAS.

Después, se añadió acetato al 0,6 % acetato o lactato al 0,6 % a cada pocillo seguido de 10 µl de un cultivo de la cepa LH4:15 que creció aerobiamente durante la noche en un medio PPGAS mientras se agitó a 200 revoluciones por minuto
5 (rpm) y a temperatura ambiente. Las placas se incubaron a temperatura ambiente por una semana. Se evaluó la formación de biopelículas mediante inspección visual.

Los resultados indicaron que diferentes tipos de biopelículas se formaron en las cuentas de vidrio. En los
10 pocillos que contenían el agua de inyección, la mayor parte de la biopelícula se formó en las cuentas de vidrio, mientras que únicamente pequeñas cantidades de biopelícula se observaron en los lados y el fondo del pocillo. Sin embargo, cuando se usó el medio PPGAS como la formulación de solución
15 nutriente, se formó una biopelícula por todo el pocillo. En los pocillos que contenían acetato como la fuente de carbono adicional, la biopelícula formada fue más granular, mientras que en los pocillos que contenían lactato, la biopelícula formada era más lisa. Estos resultados indicaron que la cepa
20 LH4:15 de *Pseudomonas stutzeri* tenía la habilidad para formar biopelículas en superficies de sílice fácilmente y para producir distintos tipos de biopelículas dependiendo de la fuente de carbono disponible.

Efecto de la fuente de carbono sobre la habilidad de la cepa
BR5311 de *Pseudomonas stutzeri* para formar biopelículas

En este ejemplo se examinó el efecto de la fuente de carbono en la formulación de solución nutriente sobre la formación de biopelículas por la cepa BR5311 (ATCC núm. PTA-11283) de *Pseudomonas stutzeri*. La cepa BR5311 se aisló como un microorganismo capaz de crecer en interfaces de agua/petróleo bajo condiciones desnitrificantes del agua de inyección del pozo núm. 1 que está ubicado en el campo Senlac en la frontera de las provincias de Saskatchewan y Alberta en Canadá central. Fue identificada como una cepa de *Pseudomonas stutzeri* mediante análisis de rDNA 16S, que se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos copendiente y de propiedad mancomunada núm. 61/408734.

El ensayo de formación de biopelículas se realizó tal como se describe en los Métodos generales. El medio que se usó fue el medio de sales mínimas indicado en la Tabla 1 y se complementó con acetato o lactato como la única fuente de carbono y nitrato como el aceptor de electrones, como se indica en la Tabla 2. La mezcla se hizo anaerobia por medio de colocarla en una cámara plástica que contiene un sistema de restregado por oxígeno de ascorbato (Becton, Dickinson Co, Sparks, Maryland). La formulación de solución nutriente que se usó en el ensayo contenía acetato o lactato como la

única fuente de carbono y nitrato como el aceptor de electrones, como se muestra en la Tabla 2.

Agua de inyección de sal alta del pozo núm. 2 (67 ppt) se esterilizó mediante filtro y se añadieron los siguientes
 5 nutrientes adicionales: 0,5 g/l de NH_4Cl ; 0,69 g/l de NaH_2PO_4 ; 1,4 g/l de KH_2PO_4 ; vitaminas y oligometales como en la Tabla 1. Se añadió nitrato sódico y acetato sódico o lactato sódico para ensayar las muestras para dar las relaciones de electrones de donador/aceptor disponibles mostradas en la
 10 columna e de la Tabla 2. Se añadieron 25 ml de la formulación de solución nutriente anterior y 1,0 ml microorganismos cultivados durante la noche (preparados tal como se describe en el Ejemplo 1) a cada soporte de filtro de vidrio. Después de una semana de incubación en una incubadora/agitador a
 15 28 °C y 100 rpm en cajas anerobias, los filtros se retiraron y se ensayaron para determinar el taponamiento, tal como se describe en los Métodos generales. Cada filtro se midió tres veces. Los resultados de los tiempos de flujo de cada muestra de ensayo se dan en la Tabla 2.

20

Tabla 2

Fuentes de carbono añadidas a la formulación de solución nutriente de la cepa BR5311 de *Pseudomonas stutzeri* para la
 25 formación de biopelículas y tiempos de flujo relacionados

5

Prueba	Acetato sódico	Nitrato sódico	Lactato sódico	e-	flujo de agua, s
núm. 1	1 g/l	2,66 g/L		1:2	16,7 +/- 3,5
núm. 2		2,66 g/L	0,66 g/L	1:2	8,7 +/- 1,0
núm. 3	2,07 g/l	0,66 g/L		4:1	17,7 +/- 2,8
núm. 4		0,66 g/L	1,33 g/L	4:1	11,7 +/- 2,0

Como se evidencia en la Tabla 2, se observó un taponamiento significativo cuando se usó acetato como fuente de carbono (pruebas núm. 1 y núm. 3) independientemente de la relación de carbono a nitrato. Se observó un taponamiento mínimo en este medio de sal alta (67 ppt) de las aguas con lactato del pocillo núm. 2 con una relación donador/aceptor de electrones de 4:1.

15

Ejemplo 3

Formación de biopelículas en sal baja con acetato o lactato con *Pseudomonas stutzeri* BR5311

La cepa BR5311 de *Pseudomonas stutzeri* se ensayó para determinar su habilidad para formar biopelículas de filtros de vidrio sinterizado en sal baja, tal como se describe en los Métodos generales. La cepa BR5311 se cultivó durante la noche en medio de cultivo Millers LB a 30 °C con agitación de 200 rpm. Para iniciar el experimento, se añadió 1,0 ml de microorganismos cultivados durante la noche a 25 ml de la

formulación de solución nutriente descrita a continuación en triplicado y se añadió a un soporte de filtro de vidrio. Estos cultivos se cultivaron anaerobiamente en una incubadora/agitador a 28 °C/100 rpm por dos semanas. Además, se realizaron controles no inoculados triplicados con la misma formulación de solución nutriente, pero sin el inóculo de la cepa, en paralelo con los tratamientos de las pruebas inoculadas.

Composición de la formulación de solución nutriente de sal baja: NaCl, 10 g/l, NaHCO₃, 0,25 g/l, NaNO₃, 2 g/l, solución vitamínica, 1 ml/l, B12, 100 mg/l, ácido p-aminobenzoico, 80 mg/l, D(+)-biotina, 20 mg/l, ácido nicotínico, 200 mg/l, pantotenato cálcico, 100 mg/l, clorhidrato de piridoxina, 300 mg/l, tiamina-HCl. 2 H₂O, 200 mg/l, ácido alfa-lipoico, 50 mg/l], solución de selenita/tungstato, 1 ml/l [NaOH, 0,5 g/l, Na₂SeO₃.5H₂O, 6,0 mg/l, Na₂WO₄.2H₂O, 8,0 mg/l], oligometales SL-10, 1 ml/l [25 % HCl, 10 ml/l, FeCl₂.4 H₂O, 1,5 g/l, ZnCl₂, 70 mg/l, MnCl₂.4 H₂O, 100 mg/l, H₃BO₃, 6 mg/l, CoCl₂.6 H₂O, 190 mg/l, CuCl₂.2 H₂O, 2 mg/l, NiCl₂.6 H₂O, 24 mg/l, Na₂MoO₄.2 H₂O, 36 mg/l], KH₂PO₄, 0,02 g/l, NH₄Cl, 0,1 g/l, MgSO₄.7H₂O, 0,1 g/l, extracto de levadura 0,1 g/l.

La fuente de carbono en la formulación de solución nutriente fue acetato sódico o lactato sódico (a 1,0 g/l). La salinidad fue 20 ppt.

Después de dos semanas, los regímenes de flujo se comprobaron tal como se describe en los Métodos generales. El tiempo para el paso del agua se anotó para cada prueba y cada filtro de control, y cada filtro se ensayó tres veces. Se

5 calcularon los regímenes de flujo y se compararon los valores de posincubación con los valores de preincubación para cada filtro. Los resultados en la Tabla 3 muestran que la cepa BR 5311 de *Pseudomonas stutzeri* provocó una considerable disminución en el régimen de flujo contra los tratamientos de

10 control después de dos semanas de incubación. En ambos tratamientos de control de acetato y de lactato, los regímenes de flujo aumentaron. El aumento en el régimen de flujo fue resultado de una mejor saturación de agua de los poros del filtro después de dos semanas de incubación sumergida. Los

15 tratamientos de prueba que contenían el inóculo de la cepa BR 5311 de *Pseudomonas stutzeri* mostraron descenso en el régimen de flujo. En el tratamiento de prueba de acetato, el régimen de flujo disminuyó aproximadamente 42 %, y en el tratamiento de prueba de lactato, el régimen de flujo disminuyó

20 aproximadamente 27 % en condiciones de sal baja.

Tabla 3

Cambios en el régimen de flujo a través de filtros de vidrio de porosidad media
después de la incubación de dos semanas

5		Flujo, ml/s						
		Preincubación	Posincubación Valores*			Media	% de cambio en el régimen de flujo ¹	% promedio de cambio en el régimen de flujo
	Tratamiento	Valor	núm. 1	núm. 2	núm. 3			
10	Control de acetato 1	0,083	0,100	0,100	0,100	0,100	+20	+16
	Control de acetato 2	0,091	0,125	0,111	0,111	0,116	+27	
	Control de acetato 3	0,091	0,091	0,091	0,091	0,091	0	
15	Prueba de acetato 1	0,100	0,067	0,067	0,067	0,067	-33	

5 10 15	Prueba de acetato 2	0,100	0,043	0,042	0,038	0,041	-59	-42
	Prueba de acetato 3	0,091	0,059	0,059	0,063	0,060	-34	
	Control de lactato 1	0,083	0,100	0,100	0,100	0,100	+20	+9
	Control de lactato 2	0,091	0,100	0,091	0,100	0,097	+7	
	Control de lactato 3	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0	
	Prueba de lactato 1	0,111	0,125	0,111	0,111	0,116	+4	-27
	Prueba de lactato 2	0,091	0,048	0,045	0,045	0,046	-49	

Prueba de lactato 3	0,100	0,067	0,067	0,063	0,065	-35	
------------------------	-------	-------	-------	-------	-------	-----	--

* 3 mediciones/réplicas sucesivas.

¹ calculado como $((\text{medio posincubación, ml/s} / \text{preincubación, ml/s})^{-1}) \times 100$

Ejemplo 4

Ensayo de taponamiento en sal alta con acetato, con el uso de la cepa BR5311 de *Pseudomonas stutzeri*

La cepa BR5311 de *Pseudomonas stutzeri* se ensayó para
 5 determinar su habilidad para formar biopelículas en filtros
 de vidrio sinterizado tal como se describe en los Métodos
 generales, con un medio de sal alta. La salinidad de la
 formulación de solución nutriente fue 70 ppt. La cepa BR5311
 se cultivó anaerobiamente en una formulación de solución
 10 nutriente con la siguiente composición: NaCl, 40,5 g/l,
 NH₄Cl, 0,1 g/l, KH₂PO₄, 0,02 g/l, Na₂SO₄, 0,1 g/l, solución de
 selenita-tungstato [NaOH, 0,5 g/l, Na₂SeO₃.5H₂O, 6,0 mg/l,
 Na₂WO₄.2H₂O, 8,0 mg/l], 1 ml/l, NaHCO₃, 0,2 g/l, solución de
 vitaminas [vitamina B12, 100 mg/l, ácido p-aminobenzoico,
 15 80 mg/l, D(+)-biotina, 20 mg/l, ácido nicotínico, 200 mg/l,
 pantotenato cálcico, 100 mg/l, clorhidrato de piridoxina,
 300 mg/l, tiamina-HCl. 2 H₂O, 200 mg/l, ácido alfa-lipoico,
 50 mg/l], 1 ml/l, solución de oligometales SL-10 [25 % HCl,
 10 ml/l, FeCl₂.4 H₂O, 1,50 g/l, ZnCl₂, 70 mg/l, MnCl₂.4 H₂O,
 20 100 mg/l, H₃BO₃, 6 mg/l, CoCl₂.6 H₂O, 190 mg/l, CuCl₂.2 H₂O,
 2 mg/l, NiCl₂.6 H₂O, 24 mg/l, Na₂MoO₄.2 H₂O, 36 mg/l], 1 ml/l,
 CaCl₂.2H₂O, 8,8 g/l, extracto de levadura, 0,025 g/l, NaNO₃,
 2,4 g/l, acetato sódico, 1,2 g/l, KCl, 0,86 g/l, MgCl₂.6H₂O,
 6,4 g/l, solución de azul de bromotimol, 0,4 %, 3 ml.

El experimento y las pruebas de régimen de flujo después de dos semanas de incubación se realizaron tal como se describe en el Ejemplo 3. Mientras que el régimen de flujo aumentó en los controles como en el Ejemplo 3, la cepa BR5311
5 provocó una disminución significativa en el régimen de flujo (Tabla 4). Los regímenes de flujo en los tratamientos de control aumentaron en un promedio de 20 %. Los tratamientos de prueba que contenían el inóculo de la cepa BR5311 mostraron un promedio de disminución de 55 % en el régimen de flujo, lo que
10 pone en evidencia la habilidad de la cepa BR5311 de *Pseudomonas stutzeri* para taponar los poros en una formulación de solución nutriente de sal alta y que contiene acetato.

Tabla 4

Cambios en el régimen de flujo a través de filtros de porosidad media después de dos semanas incubación.

5		Flujo, ml/s						
		Preincubación Valor	Posincubación Valores*			Media	% de cambio en el régimen de flujo ¹	% promedio de cambio en el régimen de flujo
	Tratamiento		núm. 1	núm. 2	núm. 3			
10	Control 1	0,083	0,091	0,091	0,091	0,091	+10	+20
	Control 2	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0	
	Control 3	0,111	0,167	0,167	0,167	0,167	+50	
	Prueba 1	0,125	0,071	0,071	0,071	0,071	-43	-55
	Prueba 2	0,083	0,048	0,048	0,048	0,048	-42	
15	Prueba 3	0,083	0,015	0,016	0,017	0,016	-81	

* 3 mediciones sucesivas

¹ calculado como $((\text{medio posincubación, mL/s} / \text{preincubación, mL/s}) - 1) \times 100$.

Ejemplo 5 (esperado)Preparación de un inóculo que no forma biopelículas de
Pseudomonas stutzeri (cepa LH4:15) con el uso de lactato

Se prepara una biomasa de *Pseudomonas stutzeri* (cepa
5 LH4:15), cultivada durante la noche, tal como se describió
anteriormente. Esta biomasa se añade a un fermentador de
200 litros de capacidad para preparar mayores cantidades de
biomasa. La biomasa cultivada se filtra y almacena a -80 °C
hasta que se la necesite.

10 Se usa un camión tanque de 9,000 litros (l) de capacidad
que contiene 6,000 l de una primera formulación de solución
nutriente con lactato; la formulación contiene: cloruro
sódico: 10,000 ppm; lactato sódico: 1,000 ppm; nitrato sódico:
2,000 ppm; extracto de levadura: 100 ppm; cloruro amónico:
15 100 ppm; hidrogeno fosfato sódico: 20 ppm; pH (ajustado con
NaOH o HCl según se necesite) a 6,5 hasta 7,0. Los
ingredientes de la primera formulación de solución nutriente
se mezclan al hacer circular el contenido del tanque. Si es
necesario, el camión puede estacionarse en un garaje calentado
20 mientras se hace circular el contenido del tanque, para ayudar
a que el tanque se caliente a la temperatura deseada.

Se añade un bloque de caldo congelado de *Pseudomonas
stutzeri* (cepa LH4:15) al tanque. Se continúa la circulación
del contenido del tanque para que se mezcle con la primera
25 formulación de solución nutriente alrededor y sobre el

bloque congelado para acelerar el proceso de descongelación. Se determina si el proceso de descongelación ha terminado por observación visual del bloque, si está flotando, o por monitoreo de la turbidez de la suspensión en densidad óptica (OD₆₀₀ nanómetros, nm). La suspensión de *Pseudomonas stutzeri* (cepa LH4:15) obtenida de esta manera se usa inmediatamente o se almacena por un tiempo.

El camión tanque que contiene la suspensión de la *Pseudomonas stutzeri* (cepa LH4:15) en la primera formulación de solución nutriente se lleva al pozo de inyección. Para inocular el pozo, el tanque se conecta directamente o a través de un aparato de filtración, diseñado para evitar que pasen fragmentos grandes de biomasa (tales como un dispositivo dispersador de biomasa descrito en la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 20110244554), a una bomba de inyección de alta presión. La bomba de alta presión se usa para transferir la biomasa del tanque al pozo de inyección para depositarla en el sitio subterráneo objetivo. La velocidad de inyección se determina por la máxima presión de inyección permitida al reservorio. Esta presión de inyección debe permanecer debajo de la presión de fractura de los estratos rocosos que contienen el petróleo.

Ejemplo 6 (esperado)

Activación de la formación de biopelículas mediante

Pseudomonas stutzeri (cepa LH4:15) con el uso de acetato

Después de la inyección de la biomasa al pozo de inyección tal como se describe en el Ejemplo 5, la biomasa se empuja hacia el fondo a los estratos subterráneos por medio de inyectar agua o la primera formulación de solución nutriente que contiene lactato, tal como se especifica en el Ejemplo 5. Esta etapa se sigue con la inyección de 1,000 a 6,000 l de una segunda formulación de solución nutriente que contiene 1,000 ppm de acetato y que incluye: cloruro sódico: 10,000 ppm; nitrato sódico: 2,000 ppm; extracto de levadura: 100 ppm; cloruro amónico: 100 ppm; hidrogeno fosfato sódico: 20 ppm; pH (ajustado con NaOH o HCl según se necesite) de 6,5 a 7,0. Cuando la segunda formulación de solución nutriente añadida alcanza el lugar subterráneo en donde están depositadas las *Pseudomonas stutzeri*, las células *Pseudomonas* comienzan a crecer y consumir el acetato de la segunda formulación de solución nutriente, y producen las biopelículas y biotaponos en los poros del lugar subterráneo objetivo, para alterar, de ese modo, la permeabilidad del sitio objetivo.

Ejemplo 7

Preparación de un inóculo que no forma biopelículas de
Pseudomonas stutzeri (cepa BR5311) con el uso de lactato

Biomasa de la cepa BR5311 (ATCC núm. PTA-11283) de *Pseudomonas stutzeri* se cultivó durante la noche y se preparó
5 tal como se describió anteriormente. Esta biomasa se añadió a un fermentador de 200 litros de capacidad para preparar una cantidad mayor de biomasa. La biomasa cultivada se filtró y concentró ~5X y se almacenó a -80 °C hasta que se la necesite.

Se preparó un camión tanque de 9,000 litros (l) de
10 capacidad con 6,000 l de una formulación de solución nutriente con lactato; la formulación contiene: cloruro sódico: 10,000 ppm; lactato sódico: 1,000 ppm; nitrato sódico: 2,000 ppm; extracto de levadura: 100 ppm; cloruro amónico: 100 ppm; hidrogeno fosfato sódico: 20 ppm; pH (ajustado con
15 NaOH o HCl según se necesite) 6,5 a 7,0. Los ingredientes se mezclaron al hacer circular el contenido del tanque, y se obtuvo una primera formulación de solución nutriente.

Se añadió al tanque un bloque de caldo congelado de biomasa de la cepa BR5311 de *Pseudomonas stutzeri*. Se
20 continuó la circulación del contenido del tanque para que se mezcle con la primera formulación de solución nutriente alrededor y sobre el bloque congelado para acelerar el proceso de descongelación. Se determinó si el proceso de descongelación había terminado por observación visual del

bloque, si estaba flotando, o por monitoreo de la turbidez de la suspensión en densidad óptica (OD_{600} nanómetros, nm).

El camión tanque que contiene la suspensión de la biomasa de *Pseudomonas stutzeri* cepa BR5311 en la primera
5 formulación de solución nutriente se lleva al pozo de inyección. Para inocular el pozo, el tanque se conectó directamente o a través de un aparato de filtración, diseñado para evitar que pasen fragmentos grandes de biomasa tales como un dispositivo dispersador de biomasa descrito en
10 la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 20110244554, a una bomba de inyección de alta presión. La bomba de alta presión se usó para transferir la biomasa del tanque al pozo de inyección para depositarla en el sitio subterráneo objetivo. La velocidad de inyección se
15 determinó por la máxima presión de inyección permitida al reservorio. La presión de inyección se mantuvo debajo de la presión de fractura de los estratos rocosos que contienen el petróleo, mientras se bombeaba el inóculo. De hecho, no se observó ningún aumento en la presión de inyección al bombear
20 el inóculo que indicara que los microbios no habían formado una biopelícula en la superficie del pozo.

Ejemplo 8

Activación de la formación de biopelículas mediante*Pseudomonas stutzeri* (cepa BR5311) con el uso de acetato

Después de la inyección de la biomasa al pozo de inyección, tal como se describe en el Ejemplo 7, se empujó la biomasa hacia los estratos subterráneos por medio de bombear una inyección de salmuera durante la noche al pozo de inyección por 16 horas. A esto siguió la inyección de 6 metros cúbicos de la primera formulación de solución nutriente que contiene lactato, tal como se especifica en el Ejemplo 5. Durante el bombeo de la salmuera y de la primera solución nutriente no hubo ningún aumento en la presión de inyección que indicara que los microbios todavía no habían formado biopelículas en el reservorio. El pozo de inyección se cerró por 5 días. Después de este cierre, se bombearon 1,000 l de una segunda formulación de solución nutriente al pozo de inyección. Esta segunda solución nutriente contenía: acetato sódico: 9 % en peso; nitrato sódico: 18 % en peso; extracto de levadura: 4500 ppm; cloruro amónico: 13500 ppm; hidrogeno fosfato sódico: 500 ppm. La adición de esta segunda solución nutriente se repitió cada dos semanas por 6 meses. Después de ese tiempo, la presión de inyección del pozo había aumentado 1034,2 kPa (150 psi). No se observó acetato o lactato en el agua de producción del pozo productor que se comunicaba con este inyector. Estos resultados mostraron claramente que las células *Pseudomonas*

stutzeri estaban creciendo y consumiendo el acetato de la segunda formulación de solución nutriente, y produciendo biopelículas y biotaponos en los poros del lugar subterráneo objetivo, alterando así la permeabilidad del sitio objetivo.

5 Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes reivindicaciones: Lo que se reivindica es:

- 5 1. 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 especies de microorganismos;
- 10 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
- 15 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
- 20 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
- 25 en el lugar subterráneo objetivo.

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.

5 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
10 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).

15 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
20 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
25 1, en donde una o más especies de microorganismos se

seleccionan de un grupo que consiste en *Pseudomonas*,
Bacillus, *Actinomycetes*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*,
Arcobacter, *Schizomycetes*, *Corynebacteria*, *Achromobacteria*,
Enterobacteria, *Nocardia*, *Saccharomycetes*,
5 *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*
10 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 primera formulación de solución nutriente
comprende lactato y no acetato.

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

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

14. El método de conformidad con la reivindicación
8, en donde la concentración de nitrato es de

aproximadamente 20 partes por millón a aproximadamente 10,000 partes por millón.

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

16. El método de conformidad con la reivindicación 15, en donde la concentración de acetato en la segunda formulación de solución nutriente es de aproximadamente 100 partes por millón a aproximadamente 10,000 partes por
10 millón.

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

- 15 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;
- 20 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).

RESUMEN DE LA INVENCION

Se describe en la presente descripción la introducción de distintas formulaciones de soluciones nutrientes a un lugar subterráneo objetivo para evitar la formación de biopelículas y agregación de biomasa en la superficie de arena de un pozo de inyección durante los procesos de MEOR o bioremediación. Una primera formulación de solución nutriente sustenta el crecimiento de los microorganismos introducidos y una segunda formulación de solución nutriente se usa para fomentar la formación de biopelículas para permitir el taponamiento de poros y canales en el lugar subterráneo objetivo, para MEOR o bioremediación.

Figura 1

