SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-134124- -00000-0000
Fecha: 2013-05-31 16:53:21 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 11

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** _____

54. **TÍTULO** Métodos, Cepas y Composiciones Útiles para la Recuperación Mejorada de Petróleo por vía Microbiana: Pseudomonas Stutzeri

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.,** _____

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-134124- -00000-0000

Fecha: 2013-05-31 16:53:21 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 11

ación

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	**TIPO DE SOLICITUD**	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capitulo II

2 DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)

Solicitud Internacional No.	PCT/US2011/058729	**Fecha**	01/11/2011
Publicación Internacional No.	WO/2012/061350	**Fecha**	10/05/2012

3 TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)

MÉTODOS, CEPAS Y COMPOSICIONES ÚTILES PARA LA RECUPERACIÓN MEJORADA DE PETRÓLEO POR VÍA MICROBIANA: PSEUDOMONAS STUTZERI

4 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)

C09K 8/582 (2006.01), **C09K 8/03** (2006.01), **C09K 8/035** (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	
PAÍS DE RESIDENCIA	Estados Unidos de América		Estados Unidos de América

7 INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria

APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
1. FALLON	Robert, D.	Estados Unidos
2. HENDRICKSON	Edwin, R.	Estados Unidos
3. JACKSON	Scott, Christopher	Estados Unidos
4. KEELER	Sharon, Jo	Estados Unidos
5. REES	Bethany C.	Estados Unidos

DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:

8 DATOS INVENTOR (ES)

PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. Estados Unidos	Maryland	Elkton	104 Black Oak Drive, Elkton, Maryland 21921
2. Estados Unidos	Delaware	Hockessin	49 Kings Grant Road, Hockessin, Delaware 19707
3. Estados Unidos	Delaware	Wilmington	700 Kil burn Road, Wilmington, Delaware 19803
4. Estados Unidos	Delaware	Bear	8 Donna Drive, Bear, Delaware 19701
5. Estados Unidos	Delaware	Wilmington	1507 North Franklin Street #3, Wilmington, Delaware 19806

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		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1. Estados Unidos de América			61/408,734	01/11/2010
2.				
3.				

11 DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS

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.

☐ 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

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.

☐ 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

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

☐ 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

Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)

17 ANEXOS

Documentación Técnica
Solicitud Internacional en castellano

1. ☒ Descripción — N° de folios: 117
2. ☒ Reivindicaciones — N° Reivindicaciones: 18
3. ☒ Dibujos y/o figuras — N° folios: 13
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.

Documentación Jurídica

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 medinas 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)

	APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
2.				
3.				
4.				

5 DATOS DEL SOLICITANTE

	PAÍS DE RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
2.				
3.				
4.				

	TELÉFONO	FAX	E-MAIL	NACIONALIDAD
2.				
3.				
4.				

6 (72) INVENTOR (ES)

	APELLIDOS	NOMBRE	NACIONALIDAD
6.	LUCKRING	Abigail, K.	Estados Unidos
7.			
8.			
9.			
10.			
11.			
12.			

7 DATOS INVENTOR (ES)

	DIRECCIÓN	CIUDAD	DEPARTAMENTO/ESTADO	PAÍS RESIDENCIA
6.	306 West Marshall Street, West Chester, Pennsylvania 19380	West Chester	Pennsylvania	Estados Unidos
7.				
8.				
9.				
10.				
11.				
12.				

9 (30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD

	PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	NÚMERO	FECHA (AAAA/MM/DD)
4.				
5.				
6.				
7.				
8.				
9.				
10.				

2013-0273

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

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0032737

Bogotá D.C., Abril 09 de 2013 - 12:10:39

RECIBIDO DE : BAKER NI 900.532.339

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
RECIBO DE CA	999999999	5524	18/01/2013		500.000.00
RECIBO DE CA	999999999	5525	18/01/2013		500.000.00
RECIBO DE CA	999999999	5526	18/01/2013		500.000.00
RECIBO DE CA	999999999	5527	18/01/2013		500.000.00
RECIBO DE CA	999999999	5528	18/01/2013		500.000.00
RECIBO DE CA	999999999	5529	18/01/2013		500.000.00
RECIBO DE CA	999999999	5530	18/01/2013		500.000.00
RECIBO DE CA	999999999	5531	18/01/2013		500.000.00
RECIBO DE CA	999999999	5532	18/01/2013		500.000.00
RECIBO DE CA	999999999	5533	18/01/2013		500.000.00
RECIBO DE CA	999999999	5534	18/01/2013		500.000.00
RECIBO DE CA	999999999	5535	18/01/2013		500.000.00
RECIBO DE CA	999999999	5536	18/01/2013		500.000.00
RECIBO DE CA	999999999	5537	18/01/2013		500.000.00
RECIBO DE CA	999999999	5538	18/01/2013		500.000.00
RECIBO DE CA	999999999	5539	18/01/2013		500.000.00
RECIBO DE CA	999999999	5540	18/01/2013		500.000.00
RECIBO DE CA	999999999	5541	18/01/2013		500.000.00
RECIBO DE CA	999999999	5542	18/01/2013		500.000.00

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

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

RECIBO DE CA	999999999	5543	18/01/2013	500.000.00
RECIBO DE CA	999999999	5544	18/01/2013	500.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	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. 13-134124- -00000-0000
Fecha: 2013-05-31 16:53:21 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 11

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

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0052802

Bogotá D.C., Mayo 30 de 2013 - 16:24:50

RECIBIDO DE : BAKER NI 900.532.339 R

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
RECIBO DE CA	999999999	44653	09/05/2013		10.000.00
RECIBO DE CA	999999999	44667	09/05/2013		170.000.00
RECIBO DE CA	999999999	46137	14/05/2013		60.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
8	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	240.000.00
				$240.000.00

SON: **DOSCIENTOS CUARENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE*

Responsable: _____
-*******-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-134124- -00000-0000

Fecha: 2013-05-31 16:53:21 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 11

EXTRACTOS

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN 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.*** **61/408,734** 32) ***Fecha*** **01/11/2010** (33) ***País*** **US**	(72) Inventor(es) **FALLON, Robert, D.** **HENDRICKSON, Edwin, R.** **JACKSON, Scott, Christopher** **KEELER, Sharon, Jo** **REES, Bethany C.** **LUCKRING, Abigail, K.**
	(74) Apoderado: **ALVARO CORREA ORDOÑEZ**
(85) Fecha limite inicio fase nacional: **01/06/2013** (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud : **01/11/2011** No. de solicitud : **PCT/US2011/058729**	(87) Publicación internacional Fecha: **10/05/2012** N° publicación: **WO/2012/061350**

(54) Titulo: **MÉTODOS, CEPAS Y COMPOSICIONES ÚTILES PARA LA RECUPERACIÓN MEJORADA DE PETRÓLEO POR VÍA MICROBIANA: PSEUDOMONAS STUTZERI**

Resumen :

Se proporcionan métodos, microorganismos y composiciones que se caracterizan porque los yacimientos de petróleo se inoculan con microorganismos que pertenecen a *Pseudomonas stutzeri* y un medio que incluye un aceptor de electrones. La *Pseudomonas stutzeri* crece en el yacimiento de petróleo para formar biopelículas obturadoras que reducen la permeabilidad en áreas de formaciones subterráneas e incrementan, de este modo, la eficacia de barrido y mejoran, por lo tanto, la recuperación de petróleo.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO TEMATICO

PATENTE DE INVENCION ____ PCT _X_ 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) : **FALLON, Robert, D.; HENDRICKSON, Edwin, R., JACKSON, Scott, Christopher; KEELER, Sharon, Jo; REES, Bethany C.; LUCKRING, Abigail, K.**

(74) Apoderado: **ALVARO CORREA ORDOÑEZ**

(30) Prioridad	(31) *No. Prioridad*	32) *Fecha*	(33) *País*
	61/408,734	**01/11/2010**	**US**

(85) Fecha límite inicio fase nacional : **01/06/2013**
(86) Datos relativos a la presentación de la solic. PCT
Fecha de presentación de la solicitud : **01/11/2011**
No. de solicitud : **PCT/US2011/058729**

(87) Publicación internacional:
Fecha : **10/05/2012**
No. Publicación : **WO/2012/061350**

(54) Titulo : **MÉTODOS, CEPAS Y COMPOSICIONES ÚTILES PARA LA RECUPERACIÓN MEJORADA DE PETRÓLEO POR VÍA MICROBIANA: PSEUDOMONAS STUTZERI**

(57) Resumen :

Se proporcionan métodos, microorganismos y composiciones que se caracterizan porque los yacimientos de petróleo se inoculan con microorganismos que pertenecen a *Pseudomonas stutzeri* y un medio que incluye un aceptor de electrones. La *Pseudomonas stutzeri* crece en el yacimiento de petróleo para formar biopelículas obturadoras que reducen la permeabilidad en áreas de formaciones subterráneas e incrementan, de este modo, la eficacia de barrido y mejoran, por lo tanto, la recuperación de petróleo.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION ____ PCT X 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) : **FALLON, Robert, D.; HENDRICKSON, Edwin, R., JACKSON, Scott, Christopher; KEELER, Sharon, Jo; REES, Bethany C.; LUCKRING, Abigail, K.**

(74) Apoderado : **ALVARO CORREA ORDOÑEZ**

(30) Prioridad	(31) *No. Prioridad*	32) *Fecha*	(33) *País*
	61/408,734	**01/11/2010**	**US**

(85) Fecha inicio fase nacional : **01/06/2013**
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud : **01/11/2011**
No. de solicitud : **PCT/US2011/058729**

(87) Publicación internacional
Fecha : **10/05/2012**
N° publicación : **WO/2012/061350**

(54) Titulo : **MÉTODOS, CEPAS Y COMPOSICIONES ÚTILES PARA LA RECUPERACIÓN MEJORADA DE PETRÓLEO POR VÍA MICROBIANA: PSEUDOMONAS STUTZERI**

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

HERRELL, Roger W.
E. I. du Pont de Nemours and Company
Legal Patent Records Center
4417 Lancaster Pike
Wilmington, Delaware 19805
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
11 April 2013 (11.04.2013)

Applicant's or agent's file reference
CL5094PCT

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2011/058729

International filing date *(day/month/year)*
01 November 2011 (01.11.2011)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
LUCKRING, Abigail, K. 306 West Marshall Street West Chester, PA 19380 United States of America	US	US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:
The person identified in Box 2 has been added as applicant for US only and inventor for all designated States.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 89 75

Authorized officer
Deprez Isabelle
e-mail pt05.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 05

MEMORIA
DESCRIPTIVA

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA
RELACIÓN DE ANEXOS

Dependencia:	Fecha: 2023 / 05 / 31 (AAAA MM DD)	Recorrido:
2020		

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

Radicador: | Planilla:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	13-134124-	0	
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

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

Observaciones:

Folio 11 CD

Patty

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-134124- -00000-0000

Fecha: 2013-05-31 16:53:21 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 11

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO DE UTII

- ☐ 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 INVENCIÓN 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 ☐

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN THE APPLICATION OF:

ROBERT D. FALLON et al.

CASE NO.: CL5094USNA APPLICATION NO.:

CONFIRMATION NO.: GROUP ART UNIT:

EXAMINER: FILED:

FOR: METHODS, STRAINS, AND COMPOSITIONS USEFUL FOR MICROBIALLY ENHANCED OIL RECOVERY: PSEUDOMONAS STUTZERI

DECLARATION OF BIOLOGICAL CULTURE DEPOSIT

Via EFS-Web

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

Sir:

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

a) I am an attorney/agent of record in the above-identified application;

b) Pursuant to 37 CFR 1.804, cultures of the following biological materials have been deposited with the following international depository(ies):

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

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

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

Depositor's Identification of Organism	International Depository Accession Number	Date of Deposit
Pseudomonas stutzeri BR5311	PTA-11283	September 9, 2010
Pseudomonas stutzeri 89AC1-3	PTA-11284	September 9, 2010

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

Respectfully submitted,

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

Dated: October 25, 2011
Attachment: Deposit Receipt

ATCC™

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**

Identification Reference by Depositor:	ATCC ®Patent Deposit Designation:	Quantity Received:
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=IPLS Department, email=lramakrishnan@atcc.org, c=US
Date: 2010.10.08 14:30:29 -04'00'

ATCC® Patent Depository

October 08, 2010

Date

Ref: Docket or Case No: CL5094

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

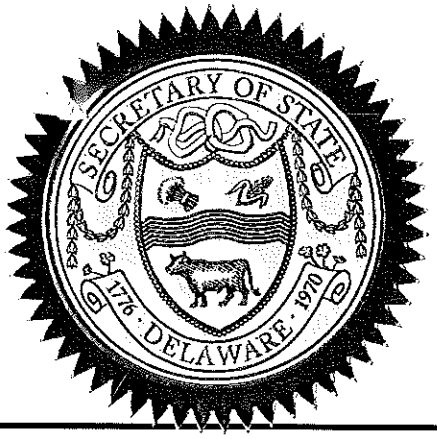
5. *at Dover, Delaware*

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

7. *by Secretary of State, Delaware Department of State*

8. *No. 0493775*

9. *Seal/Stamp:*



10. *Signature:*

Secretary of State

CL5094 PCT **COLOMBIA**

ASSIGNMENT

Robert D. FALLON; Edwin R. HENDRICKSON; Scott Christopher JACKSON; Sharon Jo KEELER; Bethany C. REES; Abigail K. LUCKRING

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:

METHODS, STRAINS AND COMPOSITIONS USEFUL FOR MICROBIALLY ENHANCED OIL RECOVERY: PSEUDOMONAS STUTZERI

so far as the Republic of Colombia is concerned.

Place: Wilmington DE USA

Date: 11 April 2013

Robert D. FALLON

Scott Christopher JACKSON

Bethany C. REES

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:

en lo que concierne a la República de Colombia.

Lugar y fecha: _____

_____

Edwin R. HENDRICKSON

Sharon Jo KEELER

Abigail K. LUCKRING

LEGALIZATION REQUIRED – NOTARY SIGNATURE/SEAL ON PAGE 2

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

On this 1st day of April, 2013, personally appeared before me Robert D. Faulon; Shawn Js 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.

Notary Public

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

CL5094 PCT **COLOMBIA**

ASSIGNMENT

Robert D. FALLON; Edwin R. HENDRICKSON; Scott Christopher JACKSON; Sharon Jo KEELER; Bethany C. REES; Abigail K. LUCKRING

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:

METHODS, STRAINS AND COMPOSITIONS USEFUL FOR MICROBIALLY ENHANCED OIL RECOVERY: PSEUDOMONAS STUTZERI

so far as the Republic of Colombia is concerned.

Place: Wilmington DE USA

Date: 12 April 2013

Robert D. FALLON

Scott Christopher JACKSON

Bethany C. REES

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:

en lo que concierne a la República de Colombia.

Lugar y fecha: _____

Edwin R. HENDRICKSON

Sharon Jo KEELER

Abigail K. LUCKRING

LEGALIZATION REQUIRED – NOTARY SIGNATURE/SEAL ON PAGE 2

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

On this 12th day of April, 2013, personally appeared before me Edwin R. Hendrickson, Abigail K. Luckring

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

CL5094 PCT **COLOMBIA**

ASSIGNMENT

Robert D. FALLON; Edwin R. HENDRICKSON; Scott Christopher JACKSON; Sharon Jo KEELER; Bethany C. REES; Abigail K. LUCKRING

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:

METHODS, STRAINS AND COMPOSITIONS USEFUL FOR MICROBIALLY ENHANCED OIL RECOVERY: PSEUDOMONAS STUTZERI

so far as the Republic of Colombia is concerned.

Place: Wilmington DE USA

Date: April 16, 2013

Robert D. FALLON

Scott Christopher JACKSON

Bethany C. REES

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:

en lo que concierne a la República de Colombia.

Lugar y fecha: _____

_____

Edwin R. HENDRICKSON

Sharon Jo KEELER

Abigail K. LUCKRING

LEGALIZATION REQUIRED – NOTARY SIGNATURE/SEAL ON PAGE 2

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

On this 16th day of April, 2013, personally appeared before me Scott Christopher Jackson

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

CL5094 PCT **COLOMBIA**

ASSIGNMENT

Robert D. FALLON; Edwin R. HENDRICKSON; Scott Christopher JACKSON; Sharon Jo KEELER; Bethany C. REES; Abigail K. LUCKRING

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:

METHODS, STRAINS AND COMPOSITIONS USEFUL FOR MICROBIALLY ENHANCED OIL RECOVERY: PSEUDOMONAS STUTZERI

so far as the Republic of Colombia is concerned.

Place: Wilmington DE USA

Date: 17 April 2013

Robert D. FALLON

Scott Christopher JACKSON

Bethany C. REES

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:

en lo que concierne a la República de Colombia.

Lugar y fecha: _____

_____

Edwin R. HENDRICKSON

Sharon Jo KEELER

Abigail K. LUCKRING

LEGALIZATION REQUIRED – NOTARY SIGNATURE/SEAL ON PAGE 2

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

On this 17th day of April, 2018, personally appeared before me Bethany C. Rees

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

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

JAIME A. GARAVITO B.
Intérprete Oficial
Res. 034 de enero 11 de 1983
MINISTERIO DE JUSTICIA

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

---

[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
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
Res. 034 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

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

BAKER & MCKENZIE

Baker & McKenzie Colombia S.A.
Av. 82 No. 10 - 62 6th Floor
Bogotá, Colombia

NIT: 900.034.906-9
Tel: +57 1 634 1500
Fax: +57 1 376 2211
www.bakernet.com

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 D. Macnamara

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

BAKER & McKENZIE

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.

Patricia Panariello, Notary Public

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:

El Notario Público

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
10 May 2012 (10.05.2012)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2012/061350 A2

(51) International Patent Classification:
C09K 8/582 (2006.01) *C09K 8/035* (2006.01)
C09K 8/58 (2006.01) *C09K 8/03* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2011/058729

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

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/408,734 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)*: **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). **JACKSON, Scott, Christopher** [US/US]; 700 Kilburn Road, Wilmington, Delaware 19803 (US). **KEELER, Sharon, Jo** [US/US]; 8 Donna Drive, Bear, Delaware 19701 (US). **REES, Bethany C.** [US/US]; 1507 North Franklin Street #3, Wilmington, Delaware 19806 (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, 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:

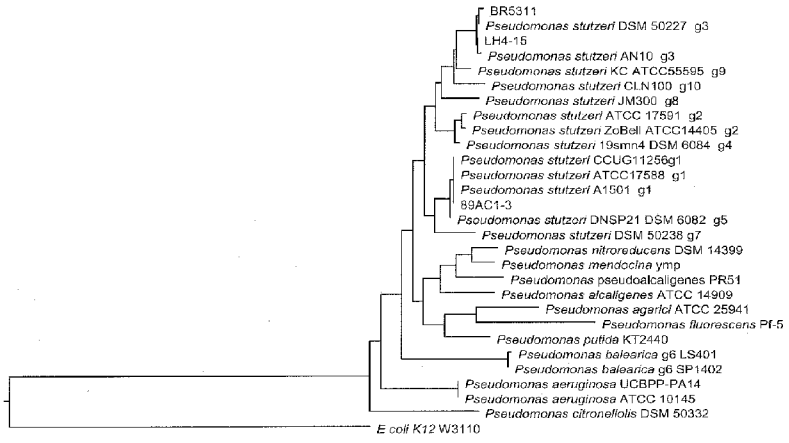
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))*

— *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))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

(54) Title: METHODS, STRAINS, AND COMPOSITIONS USEFUL FOR MICROBIALLY ENHANCED OIL RECOVERY: PSEUDOMONAS STUTZERI

Figure 1



(57) Abstract: Methods, microorganisms, and compositions are provided wherein oil reservoirs are inoculated with microorganisms belonging to *Pseudomonas stutzeri* and medium including an electron acceptor. The *Pseudomonas stutzeri* grow in the oil reservoir to form plugging biofilms that reduce permeability in areas of subterranean formations thereby increasing sweep efficiency, and thereby enhancing oil recovery.

WO 2012/061350 A2

TITLE

METHODS, STRAINS, AND COMPOSITIONS USEFUL FOR MICROBIALLY ENHANCED OIL RECOVERY: *PSEUDOMONAS STUTZERI*

This application claims the benefit of United States Provisional Application 61/408734, filed November 1, 2010, and is incorporated by reference in its entirety.

FIELD OF INVENTION

This disclosure relates to the field of environmental microbiology and modification of crude oil well properties using microorganisms. More specifically, methods for improving oil recovery from an underground reservoir are presented and new microorganisms are identified that can be used for oil recovery.

BACKGROUND OF THE INVENTION

During recovery of oil from oil reservoirs, typically only a minor portion of the original oil in the oil-bearing strata is recovered by primary recovery methods which use only the natural forces present in an oil reservoir. To improve oil recovery, a variety of supplemental recovery techniques, such as water flooding which involves injection of water through well bores into the oil reservoir, have been used. As water moves into the reservoir from an injection well and moves through the reservoir strata, it displaces oil to one or more production wells where the oil is recovered. One problem commonly encountered with water flooding operations is poor sweep efficiency of injection water. Poor sweep efficiency occurs when water preferentially channels through highly permeable zones of the oil reservoir as it travels from the injection well(s) to the production well(s), thus bypassing less permeable oil-bearing strata. Oil in the less permeable zones is thus not recovered. Poor sweep efficiency may also be due to differences in the mobility of the water versus that of the oil.

Microorganisms have been used to enhance oil recovery from subterranean formations using various processes which may improve sweep efficiency and/or oil release. For example, viable microorganisms may be injected into an oil reservoir where they may grow and adhere to the surfaces of pores and channels in the rock or sand matrices in the permeable zones to reduce water channeling, and thereby target injection water flow towards less permeable oil-bearing strata. Processes for promoting growth of indigenous microbes by injecting nutrient solutions into subterranean formations are disclosed in US 4,558,739 and US 5,083,611. Injection of microorganisms isolated from oil recovery sites into subterranean formations along with nutrient solutions has been disclosed, including for *Pseudomonas putida* and *Klebsiella pneumoniae* (US 4,800,959), for a *Bacillus* strain or *Pseudomonas* strain I-2 (ATCC 30304) isolated from tap water (US 4,558,739), and for *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium lepus*, *Mycobacterium rhodochrous,* and *Mycobacterium vaccae* (US 5,163,510). Injection of isolated microorganisms and a surfactant is disclosed in US 5,174,378.

Commonly owned and co-pending US Patent Application Publication, US 2009/0263887 discloses a microorganism identified as *Pseudomonas stutzeri* strain LH4:15 (ATCC No. PTA-8823), that was isolated from production well head mixed oil/water samples. Compositions and methods for enhancing oil recovery using this strain were disclosed. US 7,776,795 discloses a microorganism identified as *Shewanella putrefaciens* strain LH4:18, that was isolated from production well head mixed oil/water samples. Compositions and methods for enhancing oil recovery using this strain were disclosed. Commonly owned and co-pending US Patent Application Publication US 2011/0030956 discloses contacting a hydrocarbon coated surface with a medium comprising *Shewanella* sp. to alter the wettability of a hydrocarbon coated surface to improve oil recovery.

Additional useful microbial strains and methods for enhancing oil recovery are needed to further improve the recovery of oil from oil reservoirs.

SUMMARY OF THE INVENTION

The invention relates to methods for enhancing oil recovery from an oil reservoir, as well as to isolated microorganisms and compositions that may be used to enhance oil recovery.

Accordingly, the invention provides a method for enhancing oil recovery from an oil reservoir comprising:

a) providing a composition comprising:

i) at least one strain of *Pseudomonas stutzeri*: and

ii) a minimal growth medium comprising at least one electron acceptor;

b) providing an oil reservoir;

c) inoculating the oil reservoir with the composition of (a) such that the *Pseudomonas stutzeri* populates and grows in the oil reservoir; and

d) recovering oil from the oil reservoir;

wherein growth of the *Pseudomonas stutzeri* in the oil reservoir enhances oil recovery.

In another embodiment the invention provides an isolated microorganism selected from the group consisting of *Pseudomonas stutzeri* BR5311 (ATCC No. PTA 11283) and *Pseudomonas stutzeri* 89AC1-3 (ATCC No. PTA-11284).

In yet another embodiment the invention provides an oil recovery enhancing composition comprising:

a) at least one isolated microorganism named above;

b) one or more electron acceptors; and

c) at least one carbon source.

BRIEF DESCRIPTION OF FIGURES AND SEQUENCES

The invention can be more fully understood from the following detailed description, the Figures, and the accompanying sequence descriptions, which form a part of this application.

Figure 1 shows a phylogenetic tree for *Pseudomonas stutzeri* and related *Pseudomonas* species based on differences in 16S rRNA gene sequences (rDNA).

Figure 2 shows a RIBOPRINTER® analysis of various *Pseudomonas stutzeri* strains.

Figure 3 shows dominant and degenerate signature sequences for *Shewanella* species in rDNA variable regions 2 (A), 5 (B), and 8 (C). The variable positions are underlined. Alternative nucleotides for each variable position designation are given in the legend.

Figure 4 shows a schematic diagram of the slim tube experimental set up used to measure plugging of permeable sand packs.

Figure 5 shows graphs of changes in nitrate ppm observed as a measure of growth of BR5311 and *Vibrio harveyi* in production water (A) or injection water (B) mixes from Well site #2 that include nutrients.

Figure 6 shows a graph of changes in nitrate ppm observed as a measure of growth of BR5311 in production water from Well site #2 with limited nutrient additions.

Figure 7 shows a graph of the pressure drop across a control slim tube (9a) that had no inoculum or nutrients fed to it, measured for over 50 days

Figure 8 shows a graph of the pressure drop across a slim tube (9b) that was inoculated with *Pseudomonas stutzeri* LH 4:15 (ATCC NO: PTA-8823) and then fed nutrients continuously, measured for over 50 days.

Figure 9 shows a graph of the pressure drop across a slim tube (9c) that was inoculated with *Pseudomonas stutzeri* LH 4:15 (ATCC NO: PTA-8823) and then batch fed periodically with concentrated nutrients and measured for over 50 days.

Figure 10 shows a graph of the pressure drop across a slim tube (9a-2) prior to inoculation, measured for 12 days.

Figure 11 shows a graph of the pressure drop across a slim tube (9a-2) that was inoculated with *Pseudomonas stutzeri* BR5311 (ATCC NO: PTA-11283) and then batch fed nutrients periodically, measured for over 46 days.

Figure 12 shows a graph of the pressure drop across a slim tube (9b-2) that was inoculated with *Pseudomonas stutzeri* BR5311 (ATCC NO: PTA-11283) and then continuously fed nutrients, measured for over 46 days.

The following sequences conform with 37 C.F.R. §§ 1.821-1.825 ("Requirements for Patent Applications Containing Nucleotide Sequences and/or Amino Acid Sequence Disclosures - the Sequence Rules") and are consistent with World Intellectual Property Organization (WIPO) Standard ST.25 (2009) and the sequence listing requirements of the EPO and PCT (Rules 5.2 and 49.5(a-bis), and Section 208 and Annex C of the Administrative Instructions. The symbols and format used for nucleotide and amino acid sequence data comply with the rules set forth in 37 C.F.R. § 1.822.

SEQ ID NOs:1 - 4 are primers.

SEQ ID NO:5 is the sequenced 16S rDNA sequence of strain BR5311.

SEQ ID NO:6 is the sequenced 16S rDNA sequence of strain 89AC1-3.

SEQ ID NO:7 is a 16S rDNA dominant consensus sequence for *Pseudomonas stutzeri*

SEQ ID NO:8 is a 16S rDNA degenerate consensus sequence for *Pseudomonas stutzeri.*

Table 1. 16S rDNA seqs of *Pseudomonas* strains including coordinates 60 to 1400 in the *E. coli* 16S rDNA sequence, included as a reference.

16S rDNA: coordinates 60 to 1400	Genomovar or Type*	SEQ ID NO
Escherichia coli K-12 W3110	NA#	9
Pseudomonas stutzeri BR5311	NA	10
Pseudomonas stutzeri 89AC1-3	NA	11
Pseudomonas stutzeri LH4:15	NA	12
Pseudomonas stutzeri DSM 50227	g3	13
Pseudomonas stutzeri AN10	g3	14
Pseudomonas stutzeri ATCC:17591	g2	15
Pseudomonas stutzeri ZoBell ATCC 14405	g2	16
Pseudomonas stutzeri ATCC:17588	g1	17
Pseudomonas stutzeri A1501	g1	18
Pseudomonas stutzeri 19smn4 DSM 6084	g4	19
Pseudomonas stutzeri DNSP21 DSM 6082	g5	20
Pseudomonas stutzeri DSM 50238	g7	21
Pseudomonas stutzeri JM300	g8	22
Pseudomonas stutzeri KC ATCC 55595	g9	23
Pseudomonas stutzeri CLN100	g10	24
Pseudomonas stutzeri CCUG 11256	g1	25
Pseudomonas balearica SP1402	g6 Type	26
Pseudomonas balearica LS401	g6	27
Pseudomonas aeruginosa ATCC 10145	Type	28
Pseudomonas aeruginosa UCBPP-PA14	NA	29
Pseudomonas citronellolis DSM 50332	NA	30
Pseudomonas alcaligenes ATCC 14909	Type	31
Pseudomonas nitroreducens DSM 14399	Type	32
Pseudomonas mendocina ymp	Type	33
Pseudomonas agarici ATCC 25941	Type	34
Pseudomonas pseudoalcaligenes PR51	NA	35
Pseudomonas fluorescens Pf5	NA	36
Pseudomonas putida KT2440	NA	37

*Type: a Type strain for that species

#NA: not applicable

SEQ ID NO:38 is the *Shewanella* dominant signature sequence for the 16S rDNA variable region 2.

SEQ ID NO:39 is the *Shewanella* degenerate signature sequence for the 16S rDNA variable region 2.

SEQ ID NO:40 is the *Shewanella* dominant signature sequence for the 16S rDNA variable region 5.

SEQ ID NO:41 is the *Shewanella* degenerate signature sequence for the 16S rDNA variable region 5.

SEQ ID NO:42 is the *Shewanella* dominant signature sequence for the 16S rDNA variable region 8.

SEQ ID NO:43 is the *Shewanella* degenerate signature sequence for the 16S rDNA variable region 8.

SEQ ID NO:44: is the sequenced 16S rDNA sequence of strain LH4:15.

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

TABLE 2

INFORMATION ON DEPOSITED STRAINS

Depositor Identification Reference	International Depository Designation	Date of Deposit
Pseudomonas stutzeri BR5311	ATCC No. PTA-11283	9/9/10
Pseudomonas stutzeri 89AC1-3	ATCC No. PTA-11284	9/9/10

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

The invention relates to methods for enhancing oil recovery from an oil reservoir by inoculating an oil reservoir with a strain of *Pseudomonas stutzeri*: and a minimal growth medium that supports growth of the *Pseudomonas stutzeri* under denitrifying conditions in the subterranean location. Growth of *Pseudomonas stutzeri* in the oil reservoir may form biofilms that plug more permeable zones in sand or sandstone layers thereby rerouting water towards less permeable, more oil rich areas. Sweep efficiency is thereby enhanced, leading to increased oil recovery.

In addition, the invention relates to previously unknown microorganisms isolated from production water samples obtained from an oil reservoir, and compositions containing these microorganisms, which are useful in oil recovery methods. Improving oil recovery using the described methods and microorganisms would increase the output of active oil wells.

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

The term "PCR" refers to Polymerase chain reaction.

The term "dNTPs" refers to Deoxyribonucleotide triphosphates.

The term "ASTM" refers to the American Society for Testing and Materials.

The abbreviation "NCBI" refers to the National Center for Biotechnology Information.

The abbreviation "RNA" refers to ribonucleic acid.

The abbreviation "DNA" refers to deoxyribonucleic acid.

The abbreviation "ATCC" refers to American Type Culture Collection International Depository, Manassas, VA, USA. "ATCC No." refers to the accession number to cultures on deposit with ATCC.

The abbreviation "CCUG" refers to the Culture Collection of the University of Göteborg, Sweden, which is a collection of microorganisms.

The abbreviation "DSM" or "DSMZ" refers to Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH which is a German collection of microorganisms and cell cultures (Braunschweig, Germany).

The terms "oil reservoir" and "oil-bearing stratum" may be used herein interchangeably and refer to a subterranean or sub sea-bed formation from which oil may be recovered. The formation is generally a body of rocks and soil having sufficient porosity and permeability to store and transmit oil.

The term "well bore" refers to a channel from the surface to an oil-bearing stratum with enough size to allow for the pumping of fluids either from the surface into the oil-bearing stratum (injection well) or from the oil-bearing stratum to the surface (production well).

The terms "denitrifying" and "denitrification" mean reducing nitrate for use in respiratory energy generation.

The term "sweep efficiency" refers to the fraction of an oil-bearing stratum that has seen fluid or water passing through it to move oil to production wells. One problem that can be encountered with waterflooding operations is the relatively poor sweep efficiency of the water, i.e., the water can channel through certain portions of a reservoir as it travels from injection well(s) to production well(s), thereby bypassing other portions of the reservoir. Poor sweep efficiency may be due, for example, to differences in the mobility of the water versus that of the oil, and permeability variations within the reservoir which encourage flow through some portions of the reservoir and not others.

The term "pure culture" means a culture derived from a single cell isolate of a microbial species. The pure cultures specifically referred to herein include those that are publicly available in a depository, and those identified herein.

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 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" means a biofilm that is able 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.

The term "simple nitrates" and "simple nitrites" refer to nitrate (NO_3^-) and nitrite (NO_2^-), respectively. as they occur in ionic salts such as potassium nitrate.

The term "injection water" refers to fluid injected into oil reservoirs for secondary oil recovery. Injection water may be supplied from any suitable source, and may include, for example, sea water, brine, production water, water recovered from an underground aquifer, including those aquifers in contact with the oil, or surface water from a stream, river, pond or lake. As is known in the art, it may be necessary to remove particulate matter 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 matter include filtration, sedimentation and centrifugation.

The term "production water" means water recovered from production fluids extracted from an oil reservoir. The production fluids contain both water used in secondary oil recovery and crude oil produced from the oil reservoir.

The term "inoculating an oil well" means injecting one or more microorganisms or microbial populations or a consortium into an oil well or oil reservoir such that microorganisms are delivered to the well or reservoir without loss of viability.

The term "phylogenetic typing", "phylogenetic mapping", or "phylogenetic classification" may be used interchangeably herein and refer

to a form of classification in which microorganisms are grouped according to their evolutionary genetic lineage. Phylogenetic typing herein is of strains of microorganisms isolated from environmental samples and is based on 16S ribosomal RNA (rRNA) encoding gene (rDNA) sequences.

The term "hypervariable regions" as used herein refers to sequence regions in the 16S rRNA gene where the nucleotide sequence is highly variable. In most microbes the16S rDNA sequence consists of nine hypervariable regions that demonstrate considerable sequence diversity among different bacterial genera and species and can be used for genus and species identification

The term "signature sequences" as used herein refers to specific nucleotides at specific16S rRNA encoding gene (rDNA) positions (signature positions), which usually occur within the hypervariable regions, that are distinguishing for microorganisms at different levels. At the signature positions, nucleotides that distinguish between species may be one or more specific base substitutions, insertions or deletions. When taken together, the signature sequences of 16S rDNA are useful for describing microbes at the species, strain or isolate level and can be used in the identification of a microbe.

The term "degeneracy or degenerate base position" refers to the case where more than one nucleotide (A, G, C, or T) is possible at a particular position in a sequence. A position is a "two-fold degenerate" site if only two of four possible nucleotides may be at that position. A position is a "three-fold degenerate" site if three of four possible nucleotides may be at that position. A position is a "four-fold degenerate" site if all four nucleotides may be at that position.

The term "degenerate signature sequence" refers to a signature sequence that may have one or more possible degenerate base positions in the signature sequence.

The term "phylogenetics" refers to the field of biology that deals with identifying and understanding evolutionary relationships between organisms, and in particular, molecular phylogenetics uses DNA sequence homologies in this analysis. In particular, similarities or differences in 16S

rDNA sequences, including signature sequences, identified using similarity algorithms serves to define phylogenetic relationships.

The term "phylogenetic tree" refers to a branched diagram depicting evolutionary relationships among organisms. The phylogenetic tree herein is based on DNA sequence homologies of 16S rDNAs, including of signature sequences in the 16S rDNA, and shows relationships of the present strains to related strains and species.

The term "phylogenetic clade" or "clade" refers to a branch in a phylogenetic tree. A clade includes all of the related organisms that are located on the branch, based on the chosen branch point.

The term "genomovar" is used to describe a sub-species classification which is used when a group of strains of a species are differentiable by DNA sequence, but are phenotypically indistinguishable. Genomovars are defined and identified by DNA-DNA hybridization and/or by 16S rDNA signature sequences. This terminology has been used to describe *Pseudomonas stutzeri* by Bennasar et al. ((1996) Int. J. of Syst. Bacteriol.46:200-205).

The term "ribotyping" means fingerprinting of genomic DNA restriction fragments that contain all or part of the genes coding for the 16S and 23S ribosomal RNAs. Ribotyping is performed using the DuPont RIBOPRINTER® system.

The term "RIBOPRINT™" refers to the unique genomic fingerprint of a specific microbial isolate or strain, generated using the DuPont RIBOPRINTER® system.

The term "type strain" refers the reference strain for a particular species whose description is used to define and characterize a particular species.

The term "sequence analysis software" refers to any computer algorithm or software program that is useful for the analysis of nucleotide or amino acid sequences. "Sequence analysis software" may be commercially available or independently developed. Typical sequence analysis software includes, but is not limited to: the GCG suite of programs (Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group (GCG),

Madison, WI), BLASTP, BLASTN, BLASTX (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215, 403-410,1990), DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, WI), and the FASTA program incorporating the Smith-Waterman algorithm (Pearson, W. R., *Comput. Methods Genome Res.*, Proc. Int. Symp, Meeting Date 1992, 111-120, Eds: Suhai, Sandor, Plenum Publishing, New York, NY, 1994). Within the context of this application, it will be understood that, where sequence analysis software is used for analysis, the results of the analysis will be based on the "default values" of the program referenced, unless otherwise specified. As used herein "default values" will mean any set of values or parameters which originally load with the software when first initialized.

The term "electron acceptor" refers to a compound that receives or accepts an electron(s) during cellular respiration. Microorganisms obtain energy to grow by transferring electrons from an "electron donor" to an electron acceptor. During this process, the electron acceptor is reduced and the electron donor is oxidized. Examples of electron acceptors include oxygen, nitrate, fumarate, iron (III), manganese (IV), sulfate and carbon dioxide. Sugars, low molecular weight organic acids, carbohydrates, fatty acids, hydrogen, and crude oil or its components such as petroleum hydrocarbons or polycyclic aromatic hydrocarbons are examples of compounds that can act as electron donors.

"Darcy" is a unit of permeability. A medium with a permeability of 1 darcy permits a flow of 1 cm^3/s of a fluid with viscosity 1 cP (1 mPa·s) under a pressure gradient of 1 atm/cm acting across an area of 1 cm^2. A millidarcy (mD) is equal to 0.001 darcy.

Isolated microorganisms

Microorganisms capable of growth at water/oil interfaces under denitrifying conditions were isolated from production and injection waters of Well #1 that is located in the Senlac field on the border of Saskatchewan and Alberta provinces in central Canada. Well #1 has a salinity between 30-35 parts per thousand (ppt) in both production and injection waters, which is equivalent to the salinity of sea water. The

isolation process included enriching for growth of microorganisms using lactate as the carbon source and nitrate as the electron acceptor.

Isolated microorganisms were classified by analysis of their 16S ribosomal DNA (rDNA) sequences and by fingerprinting of their genomic DNA restriction fragments that contain all or part of the genes coding for the 16S and 23S ribosomal RNAs (rRNAs; ribotyping). Two isolated strains were identified as new strains of *Pseudomonas stutzeri*.

Microorganisms that belong to the *Pseudomonas stutzeri* species are identified herein by signature sequences found in their 16S rDNAs, which are present in the degenerate consensus sequence for *Pseudomonas stutzeri* 16S rDNA (SEQ ID NO:8). As described in Example 3 herein, specific positions in the16S rDNA sequence are identified herein as having nucleotides that are characteristic for *Pseudomonas stutzeri,* which may be fixed or may have some degeneracy, as listed in Table 5. The set (all positions together) of signature sequences for *Pseudomonas stutzeri* that are listed in Table 5 differs from each set of signature sequences for the closely related species *Pseudomonas balearica, Pseudomonas nitroreducens, and Pseudomonas agarici,* also listed in Table 5. The *Pseudomonas stutzeri* 16S rDNA dominant (most prevalent) consensus sequence (which may not be full length), is provided as SEQ ID NO:7. The *Pseudomonas stutzeri* 16S rDNA consensus sequence (which may not be full length), including degeneracy, is provided as SEQ ID NO:8. Microorganisms that belong to the *Pseudomonas stutzeri* species, as used herein, may be identified as having the degenerate consensus sequence for *Pseudomonas stutzeri* 16S rDNA (SEQ ID NO:8). The 16S rDNA sequences of the two isolated strains identified herein have the *Pseudomonas* 16S rDNA degenerate consensus sequence of SEQ ID NO:8 including the signature sequences identified herein, confirming their identity as strains of *Pseudomonas stutzeri*.

In one embodiment is *Pseudomonas stutzeri* strain BR5311 which has been deposited with the ATCC under the Budapest Treaty as ATCC PTA-11283. The sequenced 16S rRNA gene (rDNA) of strain BR5311

(SEQ ID NO:5) has signature sequences, listed in Table 5, that are the same as the degenerate consensus signature sequences of *Pseudomonas stutzeri* that are described above and are listed in Table 5. The 16S rDNA sequence of BR5311 has sequence identities of between 97.9% and 99.9% to 16S rDNA sequences of other known *Pseudomonas stutzeri* strains with SEQ ID NOs:13-25. As shown in a phylogenetic tree (Figure 1) described in Example 3 herein and made by aligning near full length 16S rDNA sequences of representative *Pseudomonas stutzeri* strains and other *Pseudomonads* (SEQ ID NOs:10 -37) using Clustal W alignment, phylogenetic tree, and bootstrapping functions of the MegAlign program in the DNAstar LaserGene package (DNASTAR, Inc Madison, WI). Based on the 16S rDNA sequences, BR5311 is most closely related to the following *Pseudomonas stutzeri* strains: LH4:15 (ATCC NO: PTA-8823; US Patent Publication #20090263887; 16S rDNA SEQ ID NO:12), DSM 50227 (16S rDNA SEQ ID NO:13), and AN10 (16S rDNA SEQ ID NO:14). All four strains are members of the phylogenetic grouping known as *Pseudomonas stutzeri* genomovar 3 (g3, Figure 1). Genomovar 3 includes these named strains, as well as any other strains that are placed in the same grouping with these strains using phylogenetic analysis as described in Example 3 herein.

There is one nucleotide difference between sequenced16S rRNA genes of strains LH4:15 (SEQ ID NO:44) and BR5311 (SEQ ID NO:5), which is at position 265 as listed in Table 5. LH4:15 was isolated from a mesothermic oil well in Alaska. BR5311 differs from LH4:15 phenotypically in the ability to hydrolyze starch and grow on ethylene glycol, as demonstrated herein in Example 5. In addition, ribotyping of BR5311, in Example 4 herein, showed this strain to have a different RiboPrint™ pattern as compared to other known strains of *Pseudomonas stutzeri* tested: LH4:15, DSM 50227, KC (ATCC 55595), Zobell (ATCC 14405), ATCC 17588, and DSM 6082. Thus genomic and phenotypic analysis herein of BR5311 identified this strain as a new strain of *Pseudomonas stutzeri*.

In another embodiment is *Pseudomonas stutzeri* strain 89AC1-3 which has been deposited with the ATCC under the Budapest Treaty as ATCC PTA-11284. The sequenced16S rDNA of strain 89AC1-3 (SEQ ID NO:6) has signature sequences, listed in Table 5, that are the same as the degenerate consensus signature sequences of *Pseudomonas stutzeri* that are described above and are listed in Table 5. In the phylogenetic tree described above and in Figure 1, 89AC1-3 is most closely related to the following *Pseudomonas stutzeri* strains: A1501 (16S rDNA SEQ ID NO:18), ATCC 17588 (16S rDNA SEQ ID NO:17), and CCUG11256 (16S rDNA SEQ ID NO:25). The sequenced 16S rDNA of 89AC1-3 has sequence identities of between 98.2% and 100% to 16S rDNA sequences of other known *Pseudomonas stutzeri* strains with SEQ ID NOs:13-25. Though there is 100% sequence identity between the 16S rDNA sequences of strains 89AC1-3 and ATCC 17588, the RiboPrint™ patterns for these two strains are different as shown in Figure 2, indicating differences in genomic DNA between the two strains. In addition, the 89AC1-3 RiboPrint™ pattern is different from the patterns of other known strains of *Pseudomonas stutzeri* tested: LH4:15, DSM 50227, KC (ATCC 55595), Zobell (ATCC 14405), and DSM 6082. Thus genomic analysis herein of 89AC1-3 identified this strain as a new strain of *Pseudomonas stutzeri*. Strains 89AC1-3 and ATCC 17588 are members of the phylogenetic grouping known as *Pseudomonas stutzeri* genomovar 1 (g1, Figure 1), which also includes strains CCUG11256 and A1501 as shown in the Figure 1 diagram. Genomovar 1 includes these named strains, as well as any other strains that are placed in the same grouping with these strains using phylogenetic analysis as described in Example 3 herein.

The *Pseudomonas stutzeri* strains BR5311 and 89AC1-3 were found as shown in Examples herein to have properties indicating their ability to enhance oil recovery by growing to form plugging biofilms. BR5311 grew in the presence of petroleum, and was shown to be particularly useful in high salt conditions, growing well in sea water salinity (for example, 34 parts per thousand (ppt)) and higher (for example, 67 ppt salinity) media under anaerobic denitrifying conditions. In very high salt

conditions (for example, 67-70 ppt used in Examples 7 and 9), BR5311 was able to plug glass filters using acetate as a carbon source under anaerobic, denitrifying conditions. In low salt medium (for example, 20 ppt used in Example 8), BR5311 was able to plug glass filters using either acetate or lactate as a carbon source under anaerobic, denitrifying conditions. Strain 89AC1-3 was able to plug glass filters in high salt (for example, 35 ppt used in Example 10) using either acetate or lactate as a carbon source, in anaerobic denitrifying conditions. In addition, strain 89AC1-3 was shown to aggregate grains of crystalline silica in high salt (35 ppt) under anaerobic denitrifying conditions using either lactate or acetate as a carbon source.

Further, strain BR5311 was shown to reduce the permeability of sand and silica filled tubes having high initial permeability of about 1 Darcy. Increased pressure in the tubes occurred under high salt denitrifying conditions when using either batch or continuous feeding conditions.

These properties of the isolated *Pseudomonas stutzeri* strains BR5311 and 89AC1-3 demonstrate their use for forming biofilms to plug hyperpermeable zones in permeable sand or rock of oil reservoirs. Plugging of hyperpermeable zones may reroute water towards less permeable, more oil rich areas thereby enhancing sweep efficiency leading to increased oil recovery.

Oil Recovery Enhancing Compositions

The *Pseudomonas stutzeri* strains BR5311 (ATCC PTA-11283) and 89AC1-3 (ATCC PTA-11284), described above, may be included as components in oil recovery enhancing compositions which are an embodiment of the present invention. The two strains may each be in separate oil recovery enhancing compositions, or the two strains may be combined in the same composition.

In addition to one or both of strains BR5311 and 89AC1-3, the present oil recovery enhancing composition includes one or more electron acceptors and at least one carbon source. In one embodiment the electron

acceptor is nitrate. Nitrate is reduced to nitrite and/or to nitrogen during growth of the BR5311 and 89AC1-3 strains. Nitrite may also serve as an electron acceptor in the composition. In various embodiments the electron acceptor is one or more ionic salts of nitrate, one or more ionic salts of nitrite, or any combination of ionic salts of nitrate and nitrite.

The carbon source may be a simple or a complex carbon-containing compound. The carbon source may be complex organic matter such as peptone, corn steep liquor, or yeast extract. In another embodiment the carbon source is a simple compound such as succinate, acetate, or lactate.

Oil recovery enhancing compositions may include additional components which promote growth of and/or biofilm formation by the microbial strains of the composition. These components may include, for example, vitamins, trace metals, salts, nitrogen, phosphorus, magnesium, buffering chemicals, and/or yeast extract

In one embodiment the oil recovery enhancing compositions include one or more additional microorganisms which grow in the presence of oil. The microorganisms may use a component of oil as a carbon source, or when using an alternate carbon source their growth is not inhibited by the presence of oil. Particularly useful are other microorganisms that have properties which enhance oil recovery, such as microorganisms that form biofilms or that release oil from surfaces. In one embodiment an additional microorganism in the present composition is a microorganism of a *Shewanella* species. *Shewanella* is a bacterial genus that has been established, in part, through phylogenetic classification by rDNA and is fully described in the literature (see for example Fredrickson et al., Towards Environmental Systems Biology Of Shewanella, Nature Reviews Microbiology (2008), 6(8), 592-603; Hau et al., Ecology And Biotechnology Of The Genus Shewanella, Annual Review of Microbiology (2007), 61, 237-258).

There is at least about 89% sequence identity of 16S rDNA sequences among *Shewanella* species. *Shewanella* species have 16S rDNA which has the signature sequences of hyper-variable regions 2

(SEQ ID NOs:38 and 39 are dominant and degenerate sequences, respectively), 5 (SEQ ID NOs:40 and 41 are dominant and degenerate sequences, respectively) and 8 (SEQ ID NOs: 42 and 43 are dominant and degenerate sequences, respectively) as shown in Figure 3. The combination of the degenerate signature sequences for each region defines *Shewanella* species, including some position variations as shown in Figure 3. Thus *Shewanella sp.* useful in the present invention are those that comprise within the 16s rDNA the degenerate signature sequences as set forth in SEQ ID NOs:39, 41, and 43. In one embodiment *Shewanella sp.* useful in the present invention are those that comprise within the 16S rDNA the dominant signature sequences as set forth in SEQ ID NOs:38, 40, and 42.

The dominant signature sequences in Figure 3 are those with the variable positions designated as the most frequently found nucleotides in *Shewanella* species. *Shewanella* are gram negative, gamma-proteobacteria, which have the ability to reduce metals and are capable of additionally reducing a wide range of terminal electron acceptors. These microorganisms gain energy to support anaerobic growth by coupling the oxidation of H_2 or organic matter to the reduction of a variety of multivalent metals, which leads to the precipitation, transformation, or dissolution of minerals.

The ability of *Shewanella* species to alter the wettability a hydrocarbon coated surface leading to improved oil recovery is disclosed in commonly owned and co-pending US Patent Application Publication # 2011/0030956, which is herein incorporated by reference. In one embodiment an additional microorganism is *Shewanella putrefaciens, Shewanella sp* LH4:18 (ATCC No. PTA-8822; described in commonly owned US Patent 7,776,795 or *Shewanella sp* L3:3 (ATCC No. PTA-10980; described in commonly owned and co-pending US Patent Application Publication No. 2011/0030956).

Methods of Enhancing Oil Recovery

The present oil recovery enhancing compositions may be used to inoculate an oil reservoir leading to enhancement in oil recovery. In addition, compositions including at least one strain of *Pseudomonas stutzeri* and a minimal growth medium including at least one electron acceptor may be used to inoculate an oil reservoir to enhance oil recovery. Typically one or more ionic salts of nitrate and/or nitrite are used as the electron acceptor. The *Pseudomonas stutzeri* strain in the composition includes viable cells that populate and grow in the oil reservoir.

A minimal growth medium includes at least one carbon source, and may include other components such as vitamins, trace metals, salts, nitrogen, phosphorus, magnesium, and buffering chemicals. The carbon source may be a simple or a complex carbon-containing compound, for example, 1) oil or an oil component, 2) complex organic matter such as peptone, corn steep liquor, or yeast extract; or 3) simple compounds such as succinate, acetate, or lactate.

Any strain of *Pseudomonas stutzeri* may be used which forms plugging biofilms under anaerobic denitrifying conditions in the presence of petroleum oil. *Pseudomonas stutzeri* belongs to a broad category of denitrifying bacteria that is found in, and adaptable to, many environments. Strains of microorganisms that are *Pseudomonas stutzeri* that may be used in the present methods may be identified by their 16S rDNA sequences, which have the signature sequences described above and listed in Table 5. In one embodiment *Pseudomonas stutzeri* strains used in the present methods are those having the 16S rDNA sequence of SEQ ID NO:8, as described above. In another embodiment the *Pseudomonas stutzeri* strains used in the present methods are those belonging to genomovar 1 or 3, as described above. In yet another embodiment the *Pseudomonas stutzeri* strains used in the present methods are any of BR5311 (ATCC No. PTA-11283), 89AC1-3 (ATCC No. PTA-11284), and LH4:15 (ATCC No. PTA-8823).

In addition, strains of *Pseudomonas stutzeri* useful in the present methods may be identified by one skilled in the art using biofilm formation,

silica aggregation, and/or permeability reduction assays such as those described in Examples herein. As examples of *Pseudomonas stutzeri* strains able to form plugging biofilms, these properties of strains LH4:15 (ATCC NO: PTA-8823), BR5311 (ATCC PTA-11283), and AC1-3 (ATCC PTA-11284) are demonstrated herein. In one embodiment, any of these strains are used in the present methods. In one embodiment *Pseudomonas stutzeri* strain LH4:15 is not included in *Pseudomonas stutzeri* strains used in the present methods.

In another embodiment, one or more microorganisms in addition to strains of *Pseudomonas stutzeri,* which grow in the presence of oil under denitrifying conditions, are included in a composition used in the present method. Microorganisms of *Shewanella* species, which are described above, are particularly useful.

In certain oil reservoirs having specific properties, specific strains of *Pseudomonas stutzeri* may be best suited for use in the present methods. For example, in oil reservoirs where at least one fluid, such as injection water and/or production water, has a high concentration of salt, *Pseudomonas stutzeri* strains that grow and form plugging biofilms in high salt media are particularly suitable. Specifically, *Pseudomonas stutzeri* strains BR5311 (ATCC No. PTA-11283) and 89AC1-3 (ATCC No. PTA-11284) are particularly suited to oil reservoirs with at least one fluid having high salt, particularly salt of about 30 ppt or higher.

Oil reservoirs may be inoculated with compositions including *Pseudomonas stutzeri* and a minimal growth medium using any introduction method known to one skilled in the art. Typically inoculation is by injecting a composition into an oil reservoir. Injection methods are common and well known in the art and any suitable method may be used (see for example Nontechnical guide to petroleum geology, exploration, drilling, and production, 2nd edition. N. J. Hyne, PennWell Corp. Tulsa, OK, USA, Freethey, G.W., Naftz, D.L., Rowland, R.C., &Davis, J.A. (2002); Deep aquifer remediation tools: Theory, design, and performance modeling, In: D.L. Naftz, S.J. Morrison, J.A. Davis, & C.C. Fuller (Eds.); and Handbook of groundwater remediation using permeable reactive

barriers (pp. 133–161), Amsterdam: Academic Press). Injection is typically through one or more injection wells, which are in communication underground with one or more production wells from which oil is recovered.

Enhanced Oil Recovery From An Oil Reservoir

Enhanced oil recovery in this context may include secondary or tertiary oil recovery of hydrocarbons from subsurface formations. Specifically, hydrocarbons are recovered that are not readily recovered from a production well by water flooding or other traditional secondary oil recovery techniques.

Primary oil recovery methods, which use only the natural forces present in an oil reservoir, typically obtain only a minor portion of the original oil in the oil-bearing strata of an oil reservoir. Secondary oil recovery methods such as water flooding may be improved using methods herein which provide microorganisms and growth media for formation of plugging biofilms in areas of subterranean formations where there is a high variation in permeability. Biofilm plugging of the highly permeable regions of a reservoir reroute water used in water flooding towards less permeable, more oil rich areas. Thus enhanced oil recovery is obtained particularly from oil reservoirs where sweep efficiency is low due to, for example, interspersion in the oil-bearing stratum of rock layers that have a substantially higher permeability compared to the rest of the rock layers. The higher permeability layers will channel water and prevent water penetration to the other parts of the oil-bearing stratum. Formation of plugging biofilms by microorganisms will reduce this channeling.

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 spirit and scope thereof, can make various changes and modifications of the invention to adapt it to various usages and conditions.

GENERAL METHODS

The meaning of abbreviations used in this application are as follows: "hr" means hour(s), "min" means minute(s), "day" means day(s), "mL" or "ml" means milliliters, "mg/mL" means milligram per milliliter, "L" means liters, "µL" means microliters, "mM" means millimolar, "µM" means micromolar, "nM" means nano molar, "µg/L" means microgram per liter, "pmol" means picomol(s), "°C" means degrees Centigrade, "°F" means degrees Fahrenheit, "bp" means base pair, "bps" means base pairs, "mm" means millimeter, "ppm" means part per million, "g/L" means gram per liter, "mL/min" means milliliter per minute, "mL/hr" means milliliter per hour, "cfu/mL" means colony forming units per milliliter, "g" means gram, "mg/L" means milligram per liter, "Kev" means kilo or thousands of electron volts, "psi" means pounds (of force) per square inch, "LB" means Luria broth medium, "rpm" means revolution per minute, "ppt" is parts per thousand, "ppm is parts per million, "OD600" means optical density at 600 nanometer (nm), "IC" is ion chromatography, "MPN" is most probable number.

Growth of microorganisms

Techniques for growth and maintenance of anaerobic cultures are described in "Isolation of Biotechnological Organisms from Nature", (Labeda, D. P. ed. 117-140, McGraw-Hill Publishers, 1990). Anaerobic growth is measured by nitrate depletion from the growth medium over time. Nitrate is utilized as the primary electron acceptor under the growth conditions used herein. The reduction of nitrate to nitrogen has been previously described (Moreno-Vivian, C., et al., *J. Bacteriol.*, 181, 6573 – 6584, 1999). In some cases nitrate reduction processes lead to nitrite accumulation which is subsequently further reduced to nitrogen.

Accumulation of nitrite is therefore also considered evidence for active growth and metabolism by microorganisms.

Purchased media

Millers LB medium (MediTech, Inc, Manassas, VA)

Determination of viable cell titer (most probable number)

In order to determine viable cell titer, samples from cultures or slim tubes were diluted by 1:10 serial dilution in 8 rows per sample of a 96 well plate using standard Miller's Luria Broth or Luria Broth with 3.5 % NaCl added. Titration was done using an automated Biomek 2000 robotic pipettor. Growth was determined by visual turbidity and recorded for each of 8 rows. The most probable number algorithm of Cochran (Biometrics (1950) 6:105-116) was used to determine the viable cells/ml and the 95% confidence limits for this number in the original sample.

The serial dilution method plating was used to determine the bacterial titer of such cultures. A series of 1:10 dilutions of such samples was plated and the resulting colonies were counted. The number of colonies on a plate was then multiplied by the dilution factor (the number of times that the 1:10 dilution was done) for that plate to obtain the bacterial count in the original sample.

Ion chromatography

To quantitate nitrate and nitrite ions in aqueous media, an ICS2000 chromatography unit (Dionex, Banockburn, IL) was used. Ion exchange was accomplished on an AS15 anion exchange column using a gradient of 2 to 50 mM potassium hydroxide. Standard curves using known amounts of sodium nitrite or sodium nitrate solutions were generated and used for calibrating nitrate and nitrite concentrations.

Samples from oil reservoir production and injection waters

Two oil well systems were sampled for this study: Well #1 was located in the Senlac field on the border of Saskatchewan and Alberta

provinces, Canada. Well #1 has a salinity between 30-35 ppt in both production and injection waters, which is the salinity of sea water. 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. Water samples were obtained from production and injection well heads as mixed oil/water liquids in glass 1.0 L brown bottles, filled to the top, capped and sealed with tape to prevent gas leakage. Gas from 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 hr of sampling.

Measurement of Total Dissolved Salts (Salinity) by Refractometer

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

DNA preparation for sequence analysis

Genomic DNA from bacterial colonies was isolated by diluting bacterial colonies in 50 µL of water or Tris-HCL buffer pH7-8. Diluted colony DNAs were amplified with Phi 29 DNA polymerase prior to sequencing (GenomiPHI Amplification Kit GE Life Sciences, New Brunswick, NJ). An aliquot (1.0 µL) of a diluted colony was added to 9.0 µL of the Lysis Reagent (from the GenomiPHI Amplification Kit) and heated to 95 °C for 3 min followed by immediate cooling to 4 °C. 9.0 µL of Enzyme Buffer and 1.0 µL of Phi 29 enzyme were added to each lysed sample followed by incubation at 30 °C for 18 hr. The polymerase was inactivated by heating to 65 °C for 10 min followed by cooling to 4 °C.

DNA sequence analyses

DNA sequencing reactions were set up as follows: 8.0 µL of GenomiPHI amplified sample were added to 8.0 µL of BigDye v3.1 Sequencing reagent (Applied Biosystems, Foster City, CA) followed by 3.0

µL of 10 µM primers SEQ ID NOs:1, 2, 3 or 4 (prepared by Sigma Genosys, Woodlands, TX), 4.0 µL of 5X BigDye Dilution buffer (Applied Biosystems) and 17µL Molecular Biology Grade water (Mediatech, Inc., Herndon, VA).

Sequencing reactions were heated for 3.0 min at 96 °C followed by 200 thermocycles of (95 °C for 30 sec; 55 °C for 20 sec; 60 °C for 2 min) and stored at 4 °C. Unincorporated dNTPs were removed using Edge Biosystems (Gaithersburg, MD) clean-up plates. Amplified reactions were pipetted into one well of a pre-spun 96 well clean up plate. The plate was centrifuged for 5.0 min at 5,000x g in a Sorvall RT-7 (Sorvall, Newtown, CT) at 25 °C. The cleaned up reactions were placed directly onto an Applied Biosystems 3730 DNA sequencer and sequenced with automatic basecalling.

Each of the assembled rDNA sequences was compared to the NCBI rDNA database (~260,000 rDNA sequences) using the BLAST algorithm (Altschul et al., *supra*). The highest scoring sequence identity hit was used as an identifier of the most closely related known species for strain identification.

Alternatively, to generate amplified rDNA fragments from individual strains, we chose primer sets from Grabowski et al. (FEMS Microbiology Ecology, (2005) 3:427-443). The combination of primer SEQ ID NO: 1 and primer SEQ ID NO: 2 was chosen to specifically amplify bacterial rDNA sequences.

The PCR amplification mix included: 1.0X GoTaq PCR buffer (Promega), 0.25 mM dNTPs, 25 pmol of each primer, in a 50 µL reaction volume. 0.5 µL of GoTaq polymerase (Promega) and 1.0 µL (20 ng) of sample DNA were added. PCR reaction thermocycling protocol was 5.0 min at 95°C followed by 30 cycles of: 1.5 min at 95°C, 1.5 min at 53°C, 2.5 min at 72°C and final extension for 8 min at 72°C in a Perkin Elmer 9600 thermocycler (Waltham, MA). The 1400 base pair amplification products were visualized on 1.0% agarose gels. The PCR reaction mix was used directly for cloning into pCR -TOPO4 vector using the TOPO TA cloning system (Invitrogen) as recommended by the manufacturer. DNA

was transformed into TOP10 chemically competent cells selecting for ampicillin resistance. Individual colonies (~48-96 colonies) were selected and grown in microtiter plates for sequence analysis. Sequencing of the amplified fragments and strain identification was as described above.

Automated ribotyping

Automated ribotyping was used for conclusive identification of selected strains with similar 16S rRNA sequence phylogenetic characteristics (Webster, John A (1988) US Patent 4,717,653; Bruce, J. L. (1996) *Food Technology*, 50:77-81; and Sethi, M. R. (1997) *Am. Lab.* 5: 31-35). Ribotyping was performed as recommended by the manufacturer (DuPont Qualicon Inc., Wilmington, DE). For these analyses, one fresh colony was picked, resuspended in the sample buffer and added to the processing module for the heat treatment step at 80°C for 10 min to inhibit endogenous DNA-degrading enzymes. The temperature was then reduced, and two lytic enzymes (lysostaphin and N-acetylmuramidase; provided by the manufacturer) were added to the sample. The sample carrier was then loaded onto the Riboprinter™ system with the other commercial reagents. Restriction enzyme digestion of the sample chromosomal DNA using *Eco*RI enzyme, gel electrophoresis and blotting steps were completely automated. Briefly, genomic bacterial DNA was digested with the *Eco*RI restriction enzyme and loaded onto an agarose gel. Restriction fragments were separated by electrophoresis and simultaneously transferred to a nylon membrane. After a denaturation step, the nucleic acids were hybridized with a sulfonated DNA probe harboring the rRNA operon of *E. coli*, which includes genes for the small and large rRNA subunits, the 5S rRNA gene, and the internal transcribed spacers. The hybridized probe was detected by capturing light emission from a chemiluminescent substrate with a charge-coupled device camera. The output consisted of a densitometric fingerprint scan depicting the distribution of the genomic *Eco*RI restriction fragments containing sequences from the ribosomal operon(s) in the genome, that are electrophoretically separated by their molecular weights.

Screening Of Strains For Their Ability To Form Biofilms On Sintered Glass Filters

An assay to screen for strains that could form biofilms on silica surfaces and prevent water flow through ~10 micron pore spaces (plugging) was developed using sintered glass filters. 25 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 growth medium which contained inoculum from overnight cultures of various strains was added on top of the glass filters. Overnight cultures were prepared by growing inocula of microorganisms in Miller's LB medium overnight at 30 °C aerobically, while shaking at 200 rpm. Growth medium for this biofilm formation/plugging assay was either a minimal salts medium (Table 4 below) or injection or production water samples, supplemented with nitrogen, phosphate, trace elements, vitamins, carbon source and nitrate as electron acceptor. Nitrate and carbon sources vary with experiments. The plates were covered and incubated at room temperature under anaerobic conditions for one to 2 weeks. The filters were then removed from the culture medium and the top piece of the plastic holder was screwed in place. A 1 mL syringe attached to the inlet port of the filter holder was filled with 1.0 mL of water and the time (in seconds) to drain the water in the tube was measured. Control filters without inoculation took around 10 seconds to drain. Filters that took longer than 10 seconds to drain were considered plugged.

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

Screening Of Strains For Aggregation Of Silica

Pseudomonas stutzeri strains were tested for their ability to aggregate grains of crystalline silica. Crystalline silica represents a

surrogate for the sand grains common to many subterranean geological formations. A 100 µL aliquot of 220 g/L crystalline silica (grain size range approximately 2-20 microns; Sil-co-Sil 125 made by U.S. Silica, Berkeley Springs, WV) was added to each sample tube. In addition, 8 mL of medium was added and the tubes were capped to restrict oxygen entry to the medium.

Duplicate, live (inoculated) test treatments received 200 µL of inoculation sample of various strains. Also, uninoculated control tubes were set up that contained all components, except the microbial inoculum. Tubes were statically incubated at 30 °C. Test tubes containing microorganisms were mixed vigorously for 10 seconds using a Vortex mixer. Turbidity increased dramatically due to resuspension of the crystalline silica, which had settled to the tube bottoms during incubation. The decline in turbidity due to settling of the crystalline silica was monitored over time after mixing by measuring OD600. The settling behavior of the silica particles showed that some strains formed a strong adhesive interaction with adjacent crystalline silica particles, causing them to settle more rapidly. In the oil field, making sand grains adherent to one another increases resistance to liquid flow through sand. This allows control over sweep efficiency which leads to more efficient oil recovery via water flooding.

Slim Tube Apparatus For Permeability Reduction Assay

An apparatus was designed for measuring plugging of permeable sand packs using slim tubes. A schematic diagram of the slim tube experimental set up is shown in Figure 4. All numbers below in bold refer to Figure 4.

A sample of sand that was produced from the Schrader Bluff formation at the Milne Point Unit of the Alaska North Slope was cleaned by washing with a solvent made up of a 50/50 (volume/volume) mixture of methanol and toluene. The solvent was subsequently drained and then evaporated off the sand to produce clean, dry, flowable sand. This sand was sieved to remove particles less than one micrometer in size. This

sand alone, or a mixture of this sand combined with washed Sil-co-Sil 125 (U.S. Silica, Berkeley Springs, WV) in a 4:1 ratio, was packed tightly into separate four foot (121.92 cm) long, about 1 cm inner diameter, flexible slim tubes (**9a, 9b, 9c**) and compacted by vibration using a laboratory engraver.

Both ends of each slim tube were capped with common compression type fittings to keep the sand in it. Flexible 1/8 inch (0.32 cm) tubing capable of sustaining the pressures used in the test was attached to the fittings. The slim tubes were mounted into a pressure vessel, (**10**) with the tubing passing through the ends of the pressure vessel (**11 and 12**) using commonly available pressure fittings (1/8 inch (0.32 cm) union bulkhead) (**18a, 18b, 18c** and **21a, 21b, 21c**). Additional fittings and tubing were used to connect the inlet of each slim tube to a pressure pump (**13a, 13b, 13c**) and feed reservoir (**14a, 14b, 14c**). Other common compression fittings, including elbows unions and tees, and tubing connected the inlet of each slim tube to a transducer that measured the pressure above atmospheric pressure (absolute pressure gauge) (**20a, 20b, 20c**). The inlet of the slim tube was also connected using the same types of tubing and fittings to the high pressure side of a commonly available differential pressure transducer (**19a, 19b, 19c**). Fittings and tubing connected the outlet of each slim tube to the low pressure side of the differential pressure transducer (**19a, 19b, 19c**) and to a back pressure regulator (**16a, 16b, 16c**). The signals from the differential pressure and the absolute pressure transducers were ported to a computer and these pressure readings were monitored and periodically recorded. The pressure vessel (**10**) around the slim tubes was filled with water, which acted as a hydraulic fluid, through a water port (**15**). This water was slowly pressurized with air through port **17** to a pressure of about 107 pounds per square inch (psi) (0.74 mega Pascal) while Brine #1 (below) from the feed reservoirs (**14a, 14b, 14c**) flowed through the slim tubes and came out through the back pressure regulator (**16a, 16b, 16c**). This operation was performed such that the pressure in each slim tube was always 5 to 20 psi

(0.034 – 0.137 mega Pascal) below the pressure in the pressure vessel (**10**).

Solutions For Slim Tube Experiments:

Brine #1: (no nutrient brine) – grams per liter (gr/L) of deionized water

$NaHCO_3$	1.38	
$CaCl_2*6H_2O$	0.39	
$MgCl_2*6H_2O$	0.220	
KCl	0.090	
NaCl	11.60	
Trace metals	1.0 mL	(Table 4)
Trace vitamins	1.0 mL	(Table 4)
Na_2HPO_4	0.015	(=10 ppm PO_4
NH_4Cl	0.029	(=10 ppm NH_4)
NaAcetate	0.278	(200 ppm acetate)

pH was adjusted to 7.0 with HCl or NaOH and the solution was filter-sterilized.

Brine #2 (continuous nutrient feed):

Brine #1 + 100 ppm nitrate

Brine #3 (pulse nutrient feed):

Brine #1 + 1400 ppm nitrate + 2600 ppm acetate

Measurement Of Pressure Drop

The pressure drop in the slim tubes was measured using the differential pressure transducer described above. The pressure drop was measured across each slim tube at various flow rates. This pressure drop was approximately proportional to the flow rate. For each pressure drop measured at each flow rate, the base permeability of the sand pack was calculated.

Pressure drop alone can be compared and used as a measure of the change in permeability between slim tubes since all the tubes had similar dimensions and received the same flow rates of brine during the tests.

The empty volume in the slim tubes, called the pore volume, was 40-50 ml. This pore volume was calculated from the product of the total volume of the slim tube and an estimate of the porosity (~40%).

Calculation of Base Permeability

The base permeability of each tube was measured using the brine flowing at full pressure: about 95 psi (0.665 megapascal) in the slim tube (controlled at the outlet end with the back pressure regulator) and about 110 psi (0.758 megapascal) in the pressure vessel (outside of the slim tube). Base permeability was calculated using the Darcy Equation:

$$k = \frac{4.08*Q*\mu*L}{A_x*\Delta P}$$

ΔP = The pressure drop across a porous pack or rock, [=]psi

Q = Volumetric flow rate through pack, [=]cc/hr

μ = Viscosity of fluid (single phase) through pack [=] centipoise

L = Length of pack (parallel to flow), [=] cm

A_x = Cross sectional area (normal to flow) [=] cm^2

k = Permeability [=] milliDarcy

4.08 = a conversion constant to make the units compatible [=] mD-hr-psi/cp/cc^2

Base permeability, along with other properties of each packed slim tube are given in Table 3.

Table 3 Properties of packed slim tubes

Tube #	Example number	Tube ID, cm	Length, cm	Sil-co-Sil 125	Mass of sand, g	permeability, Darcy
9a	12	0.980	121.92	0	187.5	13
9b	13	0.993	121.92	0	182	11
9c	14	0.975	121.92	0	176.3	13
9a -2	15, 16	0.978	121.9	20 wt%	179.0	1.2
9b -2	15, 17	0.978	121.9	20 wt%	177.9	0.8

EXAMPLE 1

ISOLATION OF MICROORGANISMS FROM OIL WELL INJECTION WATER THROUGH GROWTH AT AN OIL/WATER INTERFACE

To enrich for species that can interact at a hydrophobic/aqueous interface simulating a petroleum/ water interface, water from the Well #1 injection or production water samples, described in General Methods, was inoculated into 18 mL of minimal salts media (Table 4) in 20 mL anaerobic serum vials with 1.6g/L sodium nitrate added as electron acceptor, 0.1% yeast extract and with 2 ml sterilized corn oil as the primary carbon source. The medium was deoxygenated by sparging the filled vials with a mixture of nitrogen and carbon dioxide followed by autoclaving. All manipulations of microorganisms were performed in an anaerobic chamber (Coy Laboratories Products, Inc., Grass Lake, MI), and the cultures were incubated at ambient temperature with moderate shaking (100 rpm) for several weeks to several months and monitored for nitrate, nitrite, visible turbidity and visible oil modifications. When nitrate was depleted in any culture, sodium nitrate (50 g/L solution) was added to the medium to the final concentration of 1.6 g/L.

In order to access the corn oil, cells must be able to interact at the oil/water interface. Over time, growth of microbial slime could be visualized at and in the corn oil layer. Isolated colonies were derived by subculturing from the liquid media or the corn oil layer onto LB agar medium with 2 g/L sodium nitrate. Cultures from isolated colonies were maintained anaerobically and identified using 16S rRNA PCR markers as described above.

Table 4 Minimal salts medium

g/L	Chemical
1.0	NH_4Cl
0.5	KH_2PO_4
0.4	$MgCl_2.6H_2O$
0.2	$CaCL_2.2H_2O$
10	NaCl
0.69	NaH2PO4
2.5	$NaHCO_3$

0.073	KSO_4
1000X g/L	**Trace elements**
1.5	$FeCl_2.4H_2O$
0.002	$CuCl_2.2H_2O$
0.1	$MnCL_2.4H_2O$
0.19	$CoCl_2.6H_2O$
0.07	$ZnCl_2$
0.006	H_3BO_3
0.036	$Na_2MoO_4.2H_2O$
0.024	$NiCl_2.6H_2O$
0.277	HCl
1000X g/L	**Selenium/ tungstate**
0.006 0.008	$Na_2SeO_3.5H_2O$ $Na_2WO_4.2H_2O$
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.$2H_2O$
50	Alpha-lipoic acid

The pH of the medium was adjusted to 7.3.

One strain isolated from the injection water sample using this enrichment was named BR5311. The 16S rRNA of strain BR5311 was analyzed as described in General Methods, and was identified as a *Pseudomonas stutzeri* strain as described in Example 3.

EXAMPLE 2

ISOLATION OF *PSEUDOMONAS STUTZERI* STRAIN 89AC1-3 FROM WELL #1 WATERS

In this example we demonstrate a process by which microorganisms were isolated using specific nutrient enrichments of both injection and production water samples obtained from Well # 1, described in General Methods. Isolated strains were obtained through anaerobic

enrichments of crude oil recovery processing water samples obtained from Well #1. A minimal salt medium (Table 4) was used as the base medium in initial enrichments.

The minimal salt medium had been deoxygenated by sparging these reagents with a mixture of carbon dioxide and nitrogen (20% and 80%, respectively) followed by autoclaving. All manipulations of microorganisms were done in an anaerobic chamber (Coy Laboratories Products, Inc., Grass Lake, MI) (gas mixture: 5% hydrogen, 10% carbon dioxide and 85% nitrogen). Replicate enrichment samples were set up by adding 10 mL of the sterile anaerobic minimal salts medium into sterile 20 mL serum bottles. Lactate (1000 ppm) was added as a carbon source and nitrate (2000 ppm) was added as an electron acceptor. Each of the enrichments was inoculated with a specific crude processing fluid, either oily sand-production water emulsion, collected at the base of the production well, or injection water, which is water injected into the reservoir to pressurize and displace hydrocarbons to production wells. The cultures were incubated at ambient temperature for two weeks.

After incubation for seven days, 100 µL samples from each of the enrichments were streaked onto Marine broth agar plates (made per recipe, Difco 2216, Becton-Dickenson, Sparks, MD) and incubated at room temperature for two days. Representative colonies with unique morphologies were isolated. Samples of these isolated colonies were screened for identification by PCR amplification using direct colony rDNA analysis described in the General Methods, using both the reverse PCR primer *1492R* (SEQ ID NO:1) and forward PCR primer *8*F(SEQ ID NO:2). The DNA sequencing and analysis described was used to obtain 16S rDNA sequence for microbial identification. An isolate from the first enrichment, 89AC1-3, and an isolate from the second enrichment, 89AF1-5, were identified as having 16S rRNA similarity to *Pseudomonas stutzeri* strain A1501 (GenBank Accession number:AF143245) and were further confirmed as *Pseudomonas stutzeri* strains as described in Example 3.

EXAMPLE 3

PSEUDOMONAS STUTZERI STRAIN ANALYSIS USING IDENTIFIED SIGNATURE SEQUENCES

To determine the full 16S rDNA sequence of strains BR5311 (Example 1), 89AC1-3, and 89AF1-5 (Example 2), a pure single colony of each of the isolates was picked, DNA was isolated and the 16S rRNA gene was amplified by PCR using the procedure in General Methods. The amplified sequences were cloned and then sequenced multiple times to obtain the full sequence. Each strain 16S rDNA sequence was queried against the NCBI (National Center for Biotechnology Information) database using the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) algorithm program provided by NCBI (Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403–410) to identify the most similar nucleotide sequences. This was executed by comparing the query sequence to similar 16S rDNA sequences in the database and determining a score of relative percent identity. All query sequences, one each from BR5311, 89AC1-3, and 89AF1-5, returned top hits as *Pseudomonas stutzeri* at greater than or equal to 98%. The 16S rDNA sequences of isolates 89AC1-3 and 89AF1-5 were identical.

Based on the initial *Pseudomonas stutzeri* identity, 26 16S rDNA reference sequences in the NCBI database from the *Pseudomonas* genus were selected. These sequences are listed in Table 1 with their SEQ ID NOs. These reference sequences included 13 from *Pseudomonas stutzeri* (SEQ ID NOs:13-25), all of which were from type strains for *Pseudomonas stutzeri* and included at least one strain representing each of ten genomovars. Genomovar 6 of *Pseudomonas stutzeri* has been reassigned as *Pseudomonas balearica*. Other reference sequences included 12 from *Pseudomonas* strains (SEQ ID NOs:26-37) that represented 10 different *Pseudomonas* species recognized by the International Committee on Systematics of Prokaryotes. In addition the *E. coli* K12 16S rDNA B sequence (SEQ ID NO:9) was used to anchor a sequence alignment and to provide the base coordinate system, recognized as the base position standard (Brosius, J., et al. (1981) J.of Molecular Biology, 148(2):107-127; Woese, (1987) *Bacterial Evolution.* Microbial Rev. 51: 221-271). Test

sequences were those from strains BR5311 (SEQ ID NO:10), 89AC1-3 (SEQ ID NO:11), and *Pseudomonas stutzeri* strain LH4:15 (ATCC NO: PTA-8823; US Patent Application Publication 20090263887; SEQ ID NO:12), which was isolated from a mesothermic oil well in Alaska.

A phylogenetic tree was created by aligning near full length (position 60 to 1400) 16S rRNA sequences of SEQ ID NOs:9 -37 using Clustal W alignment, phylogenetic tree and bootstrapping functions of the MegAlign program in the DNAstar LaserGene package (DNASTAR, Inc Madison, WI). The phylogenetic tree shown in Figure 1 shows all *P. stutzeri* strains, including strains BR5311 and 89AC1-3, grouped in three clades which are separate from the other *Pseudomonads*. Strain 89AC1-3 is part of the phylogenetic clade that contains *Pseudomonas stutzeri* strain A1501 (Complete genome: GenBank accession No. CP000304). Strain BR5311 and strain LH4:15 are part of the phylogenetic clade that contains *Pseudomonas stutzeri* strain CLN100 (16S rDNA: Genbank accession No AJ544240.1)

Using the global multiple sequence alignment from the Clustal series of programs, Clustal W (DNAstar MegAlign package, Madison WI; Chenna, R., (2003) Nucl. Acids Res. 31(13):3497-3500), a global alignment was made of the 16S rDNA sequences of strains BR5311, 89AC1-3, and LH4:15, along with the 13 *Pseudomonas stutzeri* (SEQ ID NOs:13-25) and 12 representative non-*stutzeri Pseudomonad* sequences (SEQ ID NOs:26-37). From analysis of this alignment, signature positions in the 16S rDNA sequences were identified which may be used to distinguish *Pseudomonas stutzeri* from other *Pseudomonas* by the signature sequences at these positions. These signature positions are listed in Table 5, with position coordinate numbers from the *E. coli* K12 W3110 rrB allele for 16S rDNA sequence. The consensus sequence for *Pseudomonas stutzeri* at each of the signature positions is listed. At some signature positions a single nucleotide occurs, while at other positions there is degeneracy where S may be C or G, Y may be C or T, M may be A or C, K may be G or T, R may be A or G, D may be A, G, or T, and W may be A or T.

In Table 5 the *Pseudomonas stutzeri* consensus nucleotides at each signature position are compared to the consensus nucleotides for each of *Pseudomonas balearica, Pseudomonas nitroreducens*, and *Pseudomonas agarici*, which are species closely related to *Pseudomonas stutzeri.* In addition, the nucleotides present at each signature position in strains BR5311, 89AC1-3, and LH4:15 are shown in Table 5. The nucleotides at all of the signature positions together, for each of these strains, identifies these strains as *Pseudomonas stutzeri,* while there are differences from the *Pseudomonas stutzeri* consensus nucleotides among the signature positions for non-*stutzeri* species.

Most of the signature positions identified were located in the hypervariable regions of the 16S rDNA, with approximate positions designated by nucleotides of the 16S rDNA sequence from *E. coli*:

hypervariable region 1 between positions 60 and 99;
hypervariable region 2 between positions 118 and 290;
hypervariable region 3 between positions 410 and 520;
hypervariable region 4 between positions 578 and 760;
hypervariable region 5 between positions 820 and 888;
hypervariable region 6 between positions 980 and 1048;
hypervariable region 7 between positions 1071 and 1179;
hypervariable region 8 between positions 1215 and 1335;
hypervariable region 9 between positions 1350 and 1480.

The identified signature sequences in the16S rDNA sequence may be used to identify microorganism strains as belonging to *Pseudomonas stutzeri.* Isolated strains BR5311 and 89AC1-3 both have the *Pseudomonas stutzeri* 16S rDNA signature sequences as shown in Table 5. The 16S rDNA sequences of strains BR5311 and 89AC1-3 both have the *Pseudomonas stutzeri* 16S rDNA degenerate consensus sequence (SEQ ID NO:8). The most prevalent, or dominant, 16S rDNA sequence for *Pseudomonas stutzeri* 16S rDNA is SEQ ID NO:7.

Table 5 16S rDNA signature sequences for distinguishing *Pseudomonas stutzeri* from other related *Pseudomonads*, including nucleotides for *Ps. stutzeri* consensus and strains for BR5311, LH4:15, and 89AC1-3 at the signature positions using coordinates of *E. coli* 16S rDNA

E. coli [1] Coord. No.	BR5311	LH4:15	89AC3-1	*Ps. stutzeri* Consensus	*Ps. balearica* Consensus	*Ps. nitroreducens* Consensus	*Ps. agarici* Consensus
70-80	3 n.t. deletion	3 n.t. deletion	3 n.t. deletion	3 n.t. deletion	3 n.t. deletion	3 n.t. deletion	3 n.t. deletion
72-73	AT	AT	AT	AT	CA	AT	AT
75-83	AAGAGAGC	AAGAGAGC	AGTAGAGC	ARKRGAGC	CGGGTCCT	AGAGGAGC	AAGAGGGC
89-100	3 n.t. deletion	3 n.t. deletion	3 n.t. deletion	3 n.t. deletion	3 n.t. deletion	3 n.t. deletion	3 n.t. deletion
90-103	CTCTCTGATT C	CTCTCTGATT C	CTCCATGATT C	CTSYMKGATT C	GGATGCCGGC G	CTCCTTGAT TT	CCCTCGGATTC
122-123	GC	GC	GC	RC	GC	GC	GC
126	A	A	A	A	A	A	A
131	T	T	T	T	T	T	T
138-139	GA	GA	GG	RD	GG	GG	GG
141	A	A	A	A	A	A	A
143	T	T	T	T	T	T	T
150	C	C	C	C	T	T	C
154-158	GTTTC	GTTTC	GTTCC	GTTTC	TCGGG	GTTCC	GTCCG
164-168	GGAAC	GGAAC	GGAAC	GGAAC	CTCGA	GGAAC	GGAAC
182	1 n.t. deletion	1 n.t. deletion	1 n.t. deletion	1 n.t. deletion	1 n.t. deletion	1 n.t. deletion	1 n.t. deletion
188-195	ACGGGAG 1 n.t. insertion	ACGGGAG 1 n.t. insertion	ACGGGAG 1 n.t. insertion	AMGGGAG 1 n.t. insertion	ACGGGAG 1 n.t. insertion	ACGGGAG 1 n.t. insertion	ACGGGAG 1 n.t. insertion
189	C	C	C	M	C	C	C
199-200	CA	CA	TG	YR (CA or TG)	CG	CA	CA

207	C	C	T	Y	T	C	C	
213	G	G	A	R	A	G	G	
217-219	TGC	TGC	CAC	YRC	CGC	TGC	TGC	
224-226	TCA	TCA	TCA	WYA	CCA	TCA	TCA	
231	A	A	A	A	A	A	A	
235	T	T	T	T	T	T	T	
238-240	GTC	GTC	GTC	GTC	GTC	GTC	GTC	
253	T	T	T	T	T	T	T	
256	T	T	T	Y	T	T	T	
258	A	A	A	A	A	A	A	
263-265	AAC	AAT*	AAA	AAH	AAA	AAT	AAA	
268-269	TC	TC	TC	TC	TC	TC	TC	
273	A	A	A	A	A	A	A	
278	G	G	G	D	G	G	G	
286	G	G	G	G	G	G	G	
289	A	A	A	A	G	A	A	
311	T	T	T	T	C	T	T	
370	G	G	G	G	G	G	G	
381	A	A	A	A	A	A	A	
391	C	C	C	C	C	C	C	
408	G	G	G	G	G	G	G	
418	T	T	T	T	T	T	T	
425	A	A	A	A	A	A	A	
434	T	T	T	T	T	T	T	
440-444	CAGCG	CAGCG	CAGCG	CAGCG	CAGCG	CAGCG	CAGCG	
456-463	CATTAACC	CATTAACC	CAGTAAGT	CAKTAASY	CAGTAAGT	CATTAACC CGTTAGTGT	CATTAACC	
469-478	CGTTAGTGTT	CGTTAGTGTT	CCTTGCTGTT	CSTTRSTGTT	CCTTGCTGTT	T	CGTTAGTGTT	
490-491	GA	GA	AA	RA	GA	GA	GA	
497	T	T	T	T	T	T	T	
513-514	TC	TC	TC	TC	TC	TC	CT	

537-538	GA	GA	GA	GA	GA	GA	AG
579	G	G	G	G	G	G	G
582	T	T	T	T	T	T	T
587	T	T	T	T	T	T	T
591-594	TTGTT	TTGTT	TCGTT	TYGTT	TTGAT	TCGTT	TGGTT
599-601	TGA	TGA	TGG	TGR	TGG	TGG	TGG
610	G	G	G	G	G	G	T
638-641	CAAA	CAAA	CAAA	CAAA	CAAA	CAAA	CAAA
644-650	GGCAAG	GGCAAG	GGCGAG	GGCRAG	GTCTGA	GGCGAG	GGCCAG
653	A	A	A	A	A	A	A
658-662	ATGGC	ATGGC	ATGGC	ATGGC	ATGGC	ACGGT	AGGGT
669-673	TGGTG	TGGTG	TGGTG	TGGTG	TGGTG	TGGTG	TGGTG
679-682	TCCT	TCCT	TCCT	TCCT	TCCT	TCCT	TCCT
705-711	TATAGGA	TATAGGA	TATAGGA	TATAGGA	TATAGGA	TATAGGA	TATAGGA
717-721	CACCA	CACCA	CACCA	CACCA	CACCA	CACCA	CACCA
734-737	ACCA	ACCA	ACCA	ACCA	ACCA	ACCA	ACCA
743-748	GCTAAT	GCTAAT	GCTAAT	GCTAAT	GCTAAT	ACTGAT	ACTGAT
755	A	A	A	A	A	A	A
758	G	G	G	G	G	G	G
824	G	G	G	G	G	A	A
828-839	AGCCGTTGG GAT	AGCCGTTGG GAT	AGCCGTTGG GAT	AGCCGTTGG GAT	AGCCGTTGGG AT	AGCCGTTGG GTT	AGCCGTTGGG AA
847-856	ATCTTAGTGG	ATCTTAGTGG	ATCTTAGTGG	ATCTTAGTGG	ATCTTAGTGG	ATTTTAGTG G	TTCTTAGTGG
859	C	C	C	C	C	C	C
865	A	A	A	A	A	G	A
869-870	AT	AT	AT	AT	AT	AT	AT
876	C	C	C	C	C	T	T
960	T	T	T	T	T	C	T
965	A	A	A	A	A	A	A
986	A	A	A	A	A	T	A

989	C	C	C	C	C	C	C
	GCAGAGAAC	GCAGAGAAC	GCAGAGAAC	GCWGAGAAC	GCAGAGAACT	GCTGAGAAC	CCAATGAATCT
998-1011	TTTCC	TTTCC	TTTCC	YTKCC	TTCC	TTTCC	TCC
1019-1024	GGATTG	GGATTG	GGATTG	GGMKKG	GATTG	GATTG	GAGGA
1036-1043	ACTCTGAC	ACTCTGAC	ACTCTGAC	RCTCWGAC	ACTCTGAC	ACTCAGAC	ACATTGAG
1076	C	C	C	C	C	C	C
1081	G	G	G	G	G	G	G
1100	T	T	T	T	T	T	T
1117	G	G	G	G	G	G	G
1123	A	A	A	A	A	A	A
1127	A	A	A	A	A	A	A
						ACGTTATGG	
1133-1141	ACGTTAAGGT	ACGTTAAGGT	ACGTTAAGGT	ACRTTAWGGT	ACGTTAAGGT	T	ACGTGATGGT
	1 n.t. insertion	1 n.t. insertion	1 n.t. insertion	1 n.t. insertion	1 n.t. insertion	1 n.t. insertion	1 n.t. insertion
1134	C	C	C	C	C	C	C
1145	C	C	C	C	C	C	C
1150	T	T	T	T	T	T	T
1163	G	G	G	G	G	G	G
1168	C	C	C	C	C	C	C
1173	C	C	C	C	C	C	C
1216	G	G	G	G	G	G	G
1219	T	T	T	T	T	A	T
1243-1246	TCGG	TCGG	TCGG	TCGG	TCGG	TCGG	TCGG
1254-1257	A	A	A	A	A	A	A
1260-1264	CAAGC	CAAGC	CAAGC	CAAGC	CAAGC	CAAGC	CAAGC
1271-1274	GTGG	GTGG	GTGG	GTGG	GTGG	GTGG	GTGG
1278-1286	TAATCCCAT	TAATCCCAT	TAATCCCAT	TAATCCCAT	TAATCCCAT	TAATCCCAT	TAATCCCAT
1290-1294	ACCGA	ACCGA	ACCGA	ACCGA	ACCGA	ACCGA	ACCGA
1308-1310	CGC	CGC	CGC	CGC	CGC	CGC	CGC
1327-1329	GCG	GCG	GCG	GCG	GCG	GCG	GCG
1354	T	T	T	T	T	T	T

1356	A	A	A	A	A	A	A
1366	T	T	T	T	T	T	T
1368	A	A	A	A	A	A	G
1381	T	T	T	Y	T	T	T
1393	C*	T	T	Y	T	T	T
1428-1430	TCC	TCC	TCC	TCC	TCC	TCC	ACC
1439	C	C	C	C	C	C	C
1443-1444	TC	TC	TC	TC	TC	TC	TC
1450-1453	TTCG	TTCG	TTCG	TTCG	TTCG	TTCG	TTCG
1456	G	G	G	G	G	G	G
1459	A	A	A	A	A	A	A
1462	G	G	G	G	G	G	G
1470-1472	GGA	GGA	GGA	GGA	GGA	GGA	GGT
1475	A	A	G	R	G	G	G
1484	C	C	C	C	C	C	S
R= A/G; K=G/T; S=C/G; Y=C/T; M=A/C; W=A/T; D =A/G/T/ not C; H=A/C/T/ not G; B=C/G/T not A; V = A/C/G not T							
* Signature position distinguishes BR5311 from LH4:15							

[1] K12 W3110 rrB allele

EXAMPLE 4

RIBOPRINTING TO DETERMINE SPECIES UNIQUENESS

The 16S rRNA sequence used to determine taxonomy of isolate BR5311 was homologous to a number of environmentally isolated *Pseudomonas stutzeri* strains. In order to determine whether *Pseudomonas stutzeri* strains BR5311 and 89AC1-3 were novel isolates, multiple strains of *Pseudomonas stutzeri* were subjected to automated RIBOPRINTER® analysis as described above. Strains used for comparison were *Pseudomonas stutzeri* LH4:15 (described in commonly owned and co-pending US Patent Application Publication #US20090263887), *Pseudomonas stutzeri* DSM 50227, *Pseudomonas stutzeri* Zobell ATCC 14405, *Pseudomonas stutzeri* ATCC 17588, and *Pseudomonas stutzeri DSM 6082*. As shown in Figure 2, using the riboprinter protocol it was clear that the pattern of *Eco*RI restriction fragments which hybridized to 16S and 23S rDNA probes was different for BR5311 and EH89AC1-3 as compared to any of the other strains tested, as well as to each other. This analysis confirmed that the genomic sequences surrounding the 16S and 23 rRNA genes in these strains are substantially different from the six tested comparator strains.

EXAMPLE 5

PHENOTYPIC DIFFERENCES BETWEEN *P. STUTZERI* STRAINS BR5311, 89AC1-3, AND LH4:15

Newly isolated strains BR5311 and AC1-3 were tested in phenotypic assays in comparison to each other and to *P. stutzeri* LH4:15 (ATCC No. PTA-8823; described in US patent Publication *20090263887*). These strains were tested for starch hydrolysis on R2A Agar (Difco Laboratories, Detroit, MI) with a 1% starch overlay agar. Strains LH4:15 and 89AC1-3 were positive for starch hydrolysis, but strain BR5311 was not. These strains were tested for aerobic growth on 0.02% ethylene glycol medium (NaCl, 10 g/L, HEPES, 2.4 g/L, $Na_2HPO_4 .7H_2O$, 1.4 g/L,

KH_2PO_4, 0.69 g/L, NH_4Cl, 0.5 g/L, $MgSO_4.7H_2O$, 0.1 g/L, vitamins as in Table 4, selenium tungsten solution as in Table 4, 1 ml/L trace element solution [25 % HCl, 10 mL/L, $FeCl_2.4$ H2O, 1.50 g/L, $ZnCl_2$, 70 mg/L, $MnCl_2.4$ H2O, 100 mg/L, H_3BO_3, 6 mg/L, $CoCl_2.6$ H2O, 190 mg/L, $CuCl_2.2$ H2O, 2 mg/L, $NiCl_2.6$ H2O, 24 mg/L, $Na_2MoO_4.2$ H2O, 36 mg/L], 0.2 ml/L ethylene glycol). Strains BR5311 and 89AC1-3 were positive for growth in this medium, but LH4:15 was not. In summary (Table 6) only 89AC1-3 showed both metabolic features characteristic of the *P. stutzeri* type species (Order IX. Pseudomonadales, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, p. 323-444, V. 2, The Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria, Springer – Verlag, 2005).

Table 6 Phenotype comparison of *P. stutzeri* strains

Strain/feature	Growth, ethylene glycol	Starch hydrolysis
Typical *P. stutzeri*	+	+
BR5311	+	-
LH4:15	-	+
AC1-3	+	+

In addition, strain BR5311 was very tolerant of high salinity during growth. Strain LH4:15 did not grow in nutrient brine at greater than 35 ppt, while BR5311 grew well in nutrient brine with 60 ppt salinity. Nutrient brine consisted of 1/10 X Miller's LB medium (Mediatech, Inc., Manassas, VA) + NaCl added to achieve the desired salinity, 35 g/L (35 ppt) and 60 g/L (60 ppt).

EXAMPLE 6

SCREENING OF BACTERIAL ISOLATE BR5311 FOR GROWTH UNDER HIGH SALT CONDITIONS OF CANADIAN WELLS

Growth on Well #1 injection water

Injection water from the Well #1 site was analyzed for chemical content. Salinity was 34 ppt (approximately equivalent to seawater) with 625 ppm total divalent cations, primarily Ca^{++}. Because of the high salinity

of this injection water compared to the minimal salts media (15 ppt), strain BR5311 was tested for the ability to grow in filtered Well #1 injection water with a simple carbon source, nitrate, as electron acceptor and minimal growth additives. Injection water from Well #1 was filter sterilized and the following components added: vitamins and trace metals as described in Table 4; 3 g/L sodium acetate, and 1 g/L sodium nitrate. In addition, 0.5 g/LNH_4Cl; 0.69g/L NaH_2PO_4; and 1.4g/L KH_2PO_4 were added to the mixture. This medium was degassed using a carbon dioxide/nitrogen mix. To 20 mL anaerobic serum vials, 18 mL of the medium and 160 µL of overnight aerobic culture were added. Vials were incubated at 30° either stationary or with gentle mixing (225 rpm). BR5311 growth was assayed by observations of turbidity and development of biofilm/ clumping of cells. BR5311 grew well in the injection water mix forming a clotting sticky sediment that settled rapidly in the bottom of the vials. Nitrate was used up by day 3 indicating substantial anaerobic growth of the cultures.

Growth in Well #2 injection /production water

A similar anaerobic growth experiment was designed separately using injection water and production water from Well #2, described in General Methods. These water samples contained substantially higher levels of divalent cations (~2500 ppm), primarily Ca^{++}, than the Well #1 water (above). The total salinity was 67 ppt, which is about two times the salinity of sea water. Because of this high salinity, it was unclear whether microorganisms isolated from Well #1 would be capable of growth in Well #2 waters.

Well #2 production and injection waters were separately filter sterilized and the following components added to each: 0.5 g/LNH_4Cl; 0.69 g/L NaH_2PO_4; 1.4 g/L KH_2PO_4; vitamins and trace metals as in Table 4; 3 g/L sodium acetate, 1 g/L sodium nitrate. Each media was degassed and 10 mL of medium added to 20 mL glass serum vials which were inoculated with either BR5311 or *Vibrio harveyi* ATCC # 14126, which is a known halophillic strain used for comparison. Samples were place at 30°C stationary for 3 days. Nitrate levels were followed to monitor growth.

BR5311 reduced nitrate to 0 ppm in 10 days in production water medium (Figure 5A) and in four days in injection water medium (Figure 5B). The *Vibrio* strain did not grow well in these water mixes suggesting that halophillic characteristics are not sufficient to establish good growth in these well waters.

A third growth experiment, performed in duplicate, utilized production water and similar components but limited the NH_4Cl to 0.1 g/L and the KH_2PO_4 to 0.02 g/L to prevent precipitation of Ca^{++} from the Well #2 waters. In this trial, BR5311 depleted nitrate from 800 ppm to <200 ppm in 4 days (Figure 6).

EXAMPLE 7

SCREENING OF BACTERIAL ISOLATE BR5311 FOR GROWTH IN THE PRESENCE OF WELL #1 OIL

Cultures of isolates including BR5311 were grown in the minimal salts media described in Table 4 with additives: 0.5 g/LNH_4Cl; 0.69 g/L NaH_2PO_4; 1.4 g/L KH_2PO_4; vitamins and trace metals as in Table 4; (29.75 g/L NaCl; 0.31 g/L KCl; 0.05 g/L Na_2SO_4; 1.6 g/L $MgCl_2.6H_2O$; 1.08 g/L $CaCl_2.2H_2O$); 1.4 g/L $NaHCO_3$; 0.6 g/L sodium nitrate and 2.0 g/L sodium acetate pH 6.6 to simulate the Well #1 injection water. Media was degassed and 18 mL added to 20 mL serum vials. 1.0 mL of degassed autoclaved petroleum oil from Well #1l was added to each vial. 0.1 mL of BR5311 overnight culture was added as inoculum. Nitrate was analyzed by IC to observe growth in this media. BR5311 reduced nitrate to nitrogen within 2 days of incubation at 25°C. Nitrate reduction indicates that the presence of petroleum from Well #1 did not inhibit growth of this culture.

EXAMPLE 8

SCREENING BACTERIAL ISOLATES FOR THEIR ABILITY TO FORM BIOFILMS

Individual isolates from the corn oil enrichments of Example 1 were assayed for the ability to form biofilms on sintered glass filters as described in General Methods. Media containing inocula was minimal salts

media (Table 4) supplemented with acetate or lactate as the sole carbon source and nitrate as the electron acceptor, as listed in Table 7. The mixture was made anaerobic by placing into a plastic chamber containing ascorbate oxygen scrubbing system (Becton, Dickinson Co, Sparks, Maryland). Based on this screen, *Pseudomonas stutzeri* strain BR5311 was selected as positive for plugging and was then screened for its carbon source preference.

Injection water from Well #2 (67 ppt) was filter sterilized and the following additional nutrients were added: 0.5 g/LNH_4Cl; 0.69 g/L NaH_2PO_4; 1.4 g/L KH_2PO_4; vitamins and trace metals as in Table 4. Sodium nitrate and either sodium acetate or sodium lactate were added to different test samples to give the available donor/acceptor electron ratios shown in the e- column of Table 7. 25 mL of the media and 1 mL of overnight culture was added to each glass filter holder. After 1 week incubation 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 7.

Table 7 Biofilm assay additives and flow results

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

Results showed that significant plugging was observed when acetate was used as a carbon source regardless of electron ratio. Minimal plugging was observed with lactate with a donor/acceptor electron ratio of 4:1.

EXAMPLE 9

STRAIN BR5311 BIOFILM ASSAY IN LOW SALT WITH ACETATE OR LACTATE CARBON SOURCE

Strain BR5311 was assayed for the ability to form biofilms on sintered glass filters as described in General Methods using low salt medium. BR5311 was inoculated into Millers LB medium and incubated aerobically overnight at 30°C with shaking at 200 rpm. To initiate the experiment 1 mL of an overnight inoculum was added to 25 mL of the medium 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 medium formulation, but without the strain inoculum, were performed in parallel with the inoculated test treatments.

Low salt growth medium composition: NaCl, 10 g/L, $NaHCO_3$, 0.25 g/L, $NaNO_3$, 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 H_2O, 200 mg/L, Alpha-lipoic acid, 50 mg/L], selenite/tungstate solution, 1 mL/L [NaOH, 0.5 g/L, $Na_2SeO_3.5H_2O$, 6.0 mg/L, $Na_2WO_4.2H_2O$, 8.0 mg/L], SL-10 trace metals, 1 mL/L [25 % HCl, 10 mL/L, $FeCl_2.4\ H_2O$, 1.5 g/L, $ZnCl_2$, 70 mg/L, $MnCl_2.4\ H_2O$, 100 mg/L, H_3BO_3, 6 mg/L, $CoCl_2.6\ H_2O$, 190 mg/L, $CuCl_2.2\ H_2O$, 2 mg/L, $NiCl_2.6\ H_2O$, 24 mg/L, $Na_2MoO_4.2\ H_2O$, 36 mg/L], KH_2PO_4, 0.02 g/L, NH_4Cl, 0.1 g/L, $MgSO_4.7H_2O$, 0.1 g/L, and yeast extract 0.1 g/L.

The carbon source in the medium was either sodium acetate or sodium lactate (at 1.0 g/L). The salinity was 20 ppt. Triplicate test filters were individually sealed in 125 mL incubation vessels under anaerobic conditions and placed in an incubator/shaker at 28°C and 100 rpm for 2 weeks.

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 preincubation values for each filter. Results in Table 8 show that 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 BR 5311 inoculum showed declines in flow rate. In the acetate test treatment, the flow rate declined by about 42%. In the lactate test treatment flow rates declined about 27%.

Table 8 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	

*3 successive measurements/replicate.

[1]calculated as ((mean post incubation, ml/sec / preincubation, ml/sec)-1) x 100

EXAMPLE 10

STRAIN BR5311 BIOFILM ASSAY IN HGH SALT WITH ACETATE CARBON SOURCE

Strain BR5311 was assayed for the ability to form biofilms on sintered glass filters as described in General Methods using high salt medium. Salinity of the medium was 70 ppt. BR5311 was grown anaerobically in a growth medium of the following composition: NaCl, 40.5 g/L, NH_4Cl, 0.1 g/L, KH_2PO_4, 0.02 g/L, Na_2SO_4, 0.1 g/L, selenite-tungstate solution [NaOH, 0.5 g/L, $Na_2SeO_3.5H_2O$, 6.0 mg/L, $Na_2WO_4.2H_2O$, 8.0 mg/L], 1 mL/L, $NaHCO_3$, 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 H_2O, 200 mg/L, Alpha-lipoic acid, 50 mg/L], 1 mL/L, SL-10 trace metal solution [25 % HCl, 10 mL/L, $FeCl_2.4\ H_2O$, 1.50 g/L, $ZnCl_2$, 70 mg/L, $MnCl_2.4\ H_2O$, 100 mg/L, H_3BO_3, 6 mg/L, $CoCl_2.6\ H_2O$, 190 mg/L, $CuCl_2.2\ H_2O$, 2 mg/L, $NiCl_2.6\ H_2O$, 24 mg/L, $Na_2MoO_4.2\ H_2O$, 36 mg/L], 1 mL/L, $CaCl_2.2H_20$, 8.8 g/L, yeast extract, 0.025 g/L, $NaNO_3$, 2.4 g/L, Sodium acetate, 1.2 g/L, KCl, 0.86 g/L, $MgCl_2.6H_2O$, 6.4 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 9. While the flow rate increased in the controls as in Example 9, BR5311 caused a significant decrease in flow rate (Table 9). The flow rates in the control treatments increased by an average of 20%. The test treatments containing the BR5311 inoculum showed a mean decline of 55% in flow rate.

Table 9 Changes in flow rate through medium porosity glass filters after two weeks 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			
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

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

EXAMPLE 11

BIOFILM ASSAY FOR STRAIN 89AC1-3 IN WELL #1 SIMULATED BRINE

Strain 89AC1-3 was assayed for the ability to form biofilms on sintered glass filters as described in General Methods and Example 8 using Well #1 simulated brine. 89AC1-3 was inoculated into Millers LB medium and incubated at 30°C aerobically overnight (225 rpm). 500 µL of the overnight culture was diluted into 25 mL of minimal media described in Table 4 with 3.0 wt% NaCl to give a salinity approximating the salinity of Well #1 (35 ppt). Either sodium acetate or sodium lactate was added to give a final concentration of 2000 ppm. Sodium nitrate was added at 500 ppm as the electron acceptor for anaerobic growth.

The filter assemblies were incubated anaerobically at room temperature for two weeks and the flow assayed as described in General Methods and Example 3. Strain 89AC1-3 showed plugging with either lactate (flow secs = 30.0 +/- 7.0) or acetate (flow secs = 20 +/- 13.0) in this seawater salinity level (35 ppt).

EXAMPLE 12

AGGREGATION OF SILICA PARTICLES BY STRAIN 89AC1-3

Pseudomonas stutzeri strain 89AC1-3 was tested for its ability to aggregate grains of crystalline silica as described in General Methods. The medium used for this test contained acetate as the carbon source and had salinity of about 32 ppt.

Test medium:

NaCl, 27 g/L, NH_4Cl, 0.05 g/L, KH_2PO_4, 0.025 g/L, Na_2SO_4, 0.05 g/L, selenite-tungstate solution [NaOH, 0.5 g/L, $Na_2SeO_3.5H_2O$, 6.0 mg/L, $Na_2WO_4.2H_2O$, 8.0 mg/L], 0.5 mL/L, $NaHCO_3$, 0.1 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 H_2O, 200 mg/L, Alpha-lipoic acid, 50 mg/L], 0.5 mL/L, SL-10 trace metal solution [25 % HCl, 10 mL/L, $FeCl_2.4\ H_2O$, 1.50 g/L, $ZnCl_2$, 70 mg/L, $MnCl_2.4\ H_2O$, 100 mg/L, H_3BO_3, 6 mg/L, $CoCl_2.6\ H_2O$, 190 mg/L, $CuCl_2.2\ H_2O$, 2 mg/L, $NiCl_2.6\ H_2O$, 24 mg/L, $Na_2MoO_4.2\ H_2O$, 36 mg/L], 0.5 mL/L, $CaCl_2.2H_20$, 4.4 g/L, 0.25 g/L yeast extract, 0.5 g/L casein peptone, KCl, 0.86 g/L, $MgCl_2.6H_2O$, 6.4 g/L, $NaNO_3$, 2 g/L, sodium acetate, 1 g/L.

After seven days the mean OD600 of the duplicate tubes inoculated with strain 89AC1-3 and of the duplicate uninoculated control tubes was about 0.04. When treatment tubes were mixed vigorously by 10 seconds of vortexing, turbidity increased dramatically due to resuspension of the crystalline silica which had settled to the tube bottoms over seven days of incubation (Table 10). The decline in turbidity due to settling of the crystalline silica was monitored over time after mixing by measuring OD600. Turbidity declined much more rapidly in the inoculated treatments than in the controls, as indicated by the percent reduction in OD600 for the inoculated culture vs the control at 1 min and 10 min after mixing (Table 10).

This resulted from the silica particles forming large clumps, up to 100 microns in diameter as determined by microscopic examination, in the inoculated treatments, which settled rapidly compared to the dispersed,

non-aggregated 2-20 μm particles in the uninoculated control tubes. The contrasting behavior of the silica particles showed that strain 89AC1-3 formed a strong adhesive interaction with crystalline silica particles causing clumping of the particles.

Table 10 Settling of silica grains due to microbial induced particle aggregation by 89AC1-3 in acetate medium

Treatment	OD 600 nm, before mixing	OD600 nm, 1 minute after mixing	OD600 nm, 10 minutes after mixing
uninoculated control, #1	0.047	6.311	5.954
uninoculated control, #2	0.034	6.152	5.412
Mean	0.04	6.23	5.68
inoculated test #1	0.07	2.767	2.742
inoculated test #2	0.005	3.841	3.622
Mean	0.04	3.3	3.18
% reduction in OD	Not applicable	48%	44%

Pseudomonas stutzeri strain 89AC1-3 was tested for its ability to aggregate grains of crystalline silica in the following medium containing sodium lactate (4 g/L) instead of sodium acetate:
NaCl, 27 g/L, NH_4Cl, 0.05 g/L, KH_2PO4, 0.025 g/L, Na_2SO_4, 0.05 g/L, selenite-tungstate solution [NaOH, 0.5 g/L, $Na_2SeO3.5H2O$, 6.0 mg/L, $Na_2WO_4.2H_2O$, 8.0 mg/L], 0.5 mL/L, $NaHCO_3$, 0.1 g/L, vitamin solution [Vitamin B12, 100.00 mg/L, p-Aminobenzoic acid, 80 mg/L , D(+)-Biotin, 20 mg/L , Nicotinic acid, 200.00 mg/L , Calcium pantothenate, 100 mg/L , Pyridoxine hydrochloride, 300 mg/L , Thiamine-HCl . 2 H_2O, 200 mg/L, Alpha-lipoic acid, 50 mg/L], 0.5 mL/L, SL-10 trace metal solution [25 % HCl, 10 mL/L, $FeCl_2.4\ H_2O$, 1.50 g/L, $ZnCl_2$, 70 mg/L, $MnCl_2.4\ H_2O$, 100 mg/L, H_3BO_3, 6 mg/L, $CoCl_2.6\ H_2O$, 190 mg/L, $CuCl_2.2\ H_2O$, 2 mg/L, $NiCl_2.6\ H_2O$, 24 mg/L, $Na_2MoO_4.2\ H_2O$, 36 mg/L], 0.5 mL/L, $CaCl_2.2H_20$, 4.4 g/L, 0.25 g/L yeast extract, 0.5 g/L casein peptone, KCl, 0.86 g/L, $MgCl_2.6H_2O$, 6.4 g/L, $NaNO_3$, 4 g/L, sodium lactate, 2 g/L.

After seven days the mean OD600 of the duplicate inoculated tubes and of the duplicate uninoculated control tubes was 0 and 0.07, respectively. Results of settling after mixing were similar to those for medium containing acetate, above (Table 11).

Table 11 Settling of silica grains due to microbial induced particle aggregation by 89AC1-3 in lactate medium

Treatment	OD600 nm, before mixing	OD600 nm, 1 minute after mixing	OD600 nm, 10 minutes after mixing
uninoculated control, #1	0.045	5.419	5.113
uninoculated control, #2	0.094	5.197	4.829
mean	0.07	5.31	4.97
inoculated test #1	0	2.665	2.609
inoculated test #2	0	3.133	3.188
mean	0	2.90	2.90
% reduction in OD	Not applicable	45%	42%

EXAMPLE 13

PRESSURE DROP MEASURED IN CONTROL SLIM TUBE CONTAINING OIL/SAND

The slim tube set-up described in General Methods was used to measure pressure changes of a control sand/oil sample over time. A slim tube (Figure 4, 9a) was packed with sand from the Schrader Bluff formation at the Milne Point Unit of the Alaska North Slope as described in General Methods. The tube was flooded under pressure of about 95 psi (0.66 megapascal) with Brine #1 (General Methods), with 107 psi (0.74 megapascal) pressure in the pressure vessel. After reducing the pressure to about 20 psi (0.14 megapascal) the slim tube was flooded with about 50 cc or about 1 pore volume of crude oil obtained from an oil reservoir of the Milne Point Unit of the Alaskan North Slope. The oil and sand mixture in the slim tube was allowed to sit or age for about 2 weeks with no fluids flowing through it.

Brine #1 (General Methods) was then fed continuously for 55 days to the slim tube starting at a flow rate of 0.06 mL/min, giving a residence time of about 0.5 day in the tube. The pressure drop across the slim tube was measured over time (Figure 7). At various time points higher flow rates had to be used due to system operation problems. During those times the pressure drop was adjusted by the ratio of the flow rates so that this pressure drop could still be compared to the pressure drop measured in other slim tubes. Initially the pressure drop was between 1 to 2 psi (0.0069 to 0.0137 mega Pascal) which then decreased as the slim tube was flooded with Brine #1. The observed drop in pressure was due to the fact that oil was being removed from the slim tube as evidenced by the fact that oil appeared in the effluent of the slim tube. After 40 days, the pressure had continued to drop to about 0.1 psi (0.69 kiloPascal) which was followed by a slight increase in pressure. An effluent sample was taken and viable cell titers (most probable number or MPN) were determined as described in General Methods. The results of the analyses are shown in Table 12 below. The slight pressure increase was likely due to metabolism of the acetate, present in Brine #1, by natural microflora present in the sand in the slim tube.

EXAMPLE 14

INOCULATED CONTINUOUSLY- FED SLIM TUBE AND PRESSURE DROP MEASUREMENTS

A slim tube was set up as in Example 13 except that after aging the sand and oil sample in the tube and flooding with several pore volumes of Brine #1 at 0.6 mL/min, the tube (sample 9b) was inoculated with *Pseudomonas stutzeri* strain LH4:15 (ATCC NO: PTA-8823). This is a strain isolated from production water samples from an oil reservoir as described in commonly owned and co-pending U.S. Patent Publication No. 20090263887. To inoculate the slim tube, a 1.0 mL frozen sample of *Pseudomonas stutzeri* LH4:15 was diluted 1:20 into Brine #3 (General Methods) and agitated. The diluted inoculum solution was further diluted 200:1 (2.5 mL added to 497.5 mL) in Brine #1, and a sample of this was

taken and viable cell titers (most probable number or MPN) were determined as described in General Methods. This MPN value is listed in Table 12 as "MPNs inoculation". A 50 mL syringe was loaded with this diluted inoculum solution and the solution was pumped using a syringe pump into the slim tube at a rate of about 0.2 mL/min. The process of slim tube inoculation took about 4 h to complete.

Following inoculation, an effluent sample was taken and viable cell titers (most probable number or MPN) were determined as described in General Methods. The results of the analyses are shown in Table 12 below labeled as "MPNs in effluent".

Brine #2 was continuously fed through slim tube 9b at 0.06 mL/min for 55 days while the pressure drop across it was measured (Figure 8). Initially the pressure drop was between 1 to 2 psi (0.0069 to 0.0137 mega Pascal) and dropped below 1 psi (0.0069 mega Pascal) in about 8 days. At 10 days, there was a definite increase in pressure drop. At 20 days, the system experienced a pressure spike followed by a sharp unexplained pressure drop. The pressure spike at 22 days (Figure 8) was an artifact due to a system operations problem. Another unexplained pressure spike occurred at 35 days. Most dramatically, there was an increase in the pressure at 45 days followed by another unexplained pressure drop at about 47 days. The increase in pressure across the slim tube, as compared to the control in Example 13, demonstrates the potential for *Pseudomonas stutzeri* LH4:15 (ATCC NO: PTA-8823) to modify the permeability of porous rock.

EXAMPLE 15

INOCULATED BATCH FED SLIM TUBE AND PRESSURE DROP MEASUREMENTS

A slim tube was prepared as in Example 14 with *Pseudomonas stutzeri* strain LH4:15 (ATCC NO: PTA-8823) inoculation. Following inoculation, an effluent sample was taken and viable cell titers (most

probable number or MPN) were done as described in General Methods. The results of the analyses are shown in Table 12 below.

Immediately after inoculating the slim tube, Brine #1 was fed overnight at 0.06 mL/min. The following morning, Brine #3 (General Methods) was fed for 6 h at a rate of 0.06 mL/min. Then Brine #1 was fed at 0.06 mL/min. Typically a batch of Brine #3 was fed for 6 hours every 3rd or 4th day for the duration of the test with Brine #1 fed continuously between batches. The total amount of nutrients fed to slim tube 9c was the same as that fed to slim tube 9b in Example 14.

The pressure drop was initially between 1 to 2 psi (0.0069 to 0.0137 mega Pascal) and then it dropped to about 1 psi (0.0069 mega Pascal) in 8 days. At 10 days, there was an increase in pressure drop and it consistently and linearly increased with time (Figure 9). The spikes seen at 22 and 29 days were artifacts due to a system operations problem. Remarkably, by the end of day 55, the pressure drop was an order of magnitude more than the control in Example 13. This demonstrates the potential for *Pseudomonas stutzeri* LH4:15 (ATCC NO: PTA-8823) to effectively modify the permeability of porous rock.

Table 12 MPN analysis of slim tubes following inoculation

Analysis	Slim tube 9a	Slim tube 9b	Slim tube 9c
MPNs inoculation	No inoculum	~1 $x10^8$ CFU/mL	~1$x10^8$ CFU/mL
MPNs in effluent	4.2 $x10^5$	1.1 $x10^7$CFU/mL	7.9 $x10^6$ CFU/mL

MPN = most probable numbers

EXAMPLE 16

PRESSURE DROP MEASURED IN CONTROL SLIM TUBE CONTAINING SAND IN HIGH SALINITY

The slim tube set-up described in General Methods was used to measure pressure changes of control sand samples in high salinity water (70 ppt) over time. Two slim tubes (tubes 9a-2 and 9b-2) were packed with a mixture of sand plus Sil-co-Sil 125 (U.S. Silica, Berkeley Springs, WV) in a ratio of 4:1 by weight (20% by weight). Each slim tube was flooded,

under pressure of about 95 psi (0.66 megapascal) with Brine #4 (below), with 107 psi (0.74 megapascal) pressure in the pressure vessel.

Brine #4: Filter sterilized Injection water used at a well site in Alberta Canada. The total dissolved salt content was 70 ppt. The pH of this solution was adjusted to ~6.2 to 6.4 using HCl or NaOH.

With only Brine #4 flowing into the tubes (no oil present) measurements were made and the base permeability calculated to be about 1 Darcy as reported in General Methods,

Slim tubes 9a-2 and 9b-2 were pre-inoculated with 60 ml of live injection brine (Brine #4 that was not filter sterilized) at a rate of 15 ml/hour for 4 hours. Following this pre-inoculation, an effluent sample was taken and cell counts were measured, as described in General Methods, and are given in Table 13.

Brine #4 was fed continuously at a rate of 3.6 ml/hr for 11 days to slim tubes 9a and 9b while the pressure drop across the slim tube was measured. Results for tube 9a-2 are shown in Figure 10. Results were similar for both tubes. The pressure drop remained between 1 to 2 psi (0.0069 to 0.0137 megapascal). This illustrates the stability of the packed sand in the slim tube while being flooded with the injection brine.

EXAMPLE 17

PRESSURE DROP MEASURED IN INOCULATED, BATCH FED SLIM TUBE CONTAINING SAND IN HIGH SALINITY

A day later, slim tube 9a-2 from Example 16 was inoculated with *Pseudomonas stutzeri* BR5311 (ATCC NO: PTA-11283). For inoculation, a frozen sample of *Pseudomonas stutzeri* BR5311 was diluted 1:20 into Brine #7 (below) and agitated, then allowed to stand overnight. An inoculum sample was taken and cell counts were measured, as described in General Methods, and are shown in Table 13. A syringe was loaded with the inoculum solution and pumped into the slim tube using a syringe

pump at a rate of about 0.25 ml/min. The process of slim tube inoculation took about 4 hours to complete. Following completion of inoculation the slim tube was aged for 5 days.

At the end of the aging in period, Brine #6 (below) was fed to slim tube 9a-2 at a rate of 3.6 ml/hr for 4 hr. At this point, an effluent sample was taken and cell counts were measured, as described in General Methods, and are given in Table 13. Brine #4 continued to be pumped at a rate of 3.6 ml/hr into this slim tube. An effluent sample was taken after a total of 46 days and a cell count was done. The results of the analysis are shown in Table 13.

Brine #6 was fed to slim tube 9a-2 in 4 to 8 hr pulses twice a week (once every 3 or 4 days) for about 30 days and the pressure drop was measured across the slim tube. Brine #6 was fed in 4 hr pulses on day 17, 20, and 24. Brine #6 was fed in 8 hr pulses on day 27, 32, 34, 38, 41, and 44. The pressure drop was initially between 1 to 2 psi (0.0069 to 0.0137 mega Pascal). After 10 days, there was a discernable increase in pressure drop that became more pronounced with time (Figure 11). The pressure drop was nearly 6 times more than the control (Example 16). This demonstrates the potential for *Pseudomonas stutzeri* BR5311 (ATCC NO: PTA11283) to effectively modify the permeability of porous rock even when it is fed batch wise in a high salinity water environment.

Brine #6: batch nutrients feed

	Amount per L
$NaNO_3$	300.5 g
NaAcetate	152.5 g
NH_4Cl	3.6 g
KH_2PO_4	0.72 g
Yeast Extract	18 g

pH=6.5
Diluted 1 part in 36 parts of Brine #4

Brine #7:
in Tap water,

	Amount per L
NaCl	10 mg
NH4	1 g

lactate	
Na NO3	2 g
NH4Cl	0.1 g
KH2PO4	0.02 g
Yeast extract	0.1 g

Adjust the pH to ~6.2 to 6.4 with HCl.

EXAMPLE 18

PRESSURE DROP MEASURED IN INOCULATED, CONTINUOUSLY FED SLIM TUBE CONTAINING SAND IN HIGH SALINITY

Slim tube 9b-2 from Example 16 was inoculated with *Pseudomonas stutzeri* BR5311 (ATCC NO: PTA-11283), aged, and sampled as described in Example 17. At the end of the aging period, Brine #5 was fed continuously to slim tube 9b-2 at a rate of 3.6 ml/hour and an effluent sample taken and cell counts determined, given in Table 13. Brine #5 has the same concentration of components per liter as given for Brine #6 above, but it was diluted 1 part in 327 parts of Brine #4. Brine #5 was continued to be fed for the duration of the experiment while the pressure drop across it was measured (Figure 12). An effluent sample was taken after 46 days and a cell count was determined. The results of the analysis are shown in Table 13.

Initially the pressure drop was between 2 to 4 psi (0.0137 to 0.0274 mega Pascal). By day 32, the observed pressure drop had increased by about a factor of 4 compared to the initial pressure drop at day 17. At day 32.8, Brine #5 containing nutrients was stopped and Brine #4 (Filter sterilized Injection water used at a well site in Alberta) was fed instead till day 38.7. During this 6 day period, there was a decrease in the pressure drop, although the pressure still remained significantly above the starting pressure drop at day 17. At day 38.7, Brine #5 was again fed to the slim tube 9b. Between days 45 and 46, the pressure drop again climbed so that it was about a factor of 6 higher as compared to the initial pressure drop at day 17. The pressure spike at about 44 days (Figure 12) was an artifact due to a system operations problem. This demonstrates the potential for

Pseudomonas stutzeri BR5311 (ATCC NO: PTA-11283) to effectively modify the permeability of porous rock when fed continuously in a high salinity water environment.

Table 13 Live cell analysis of inoculum and slim tube samples

Cell Counts	Slim tube 9a-2	Slim tube 9b-2
After pre-inoculation with live injection brine	8.1 $x10^4$ CFU/ml	1.1 $x10^4$ CFU/ml
P. stutzeri BR5311 inoculum	4 $x10^6$ CFU/ml	9.8 $x10^5$ CFU/ml
effluent after 5 day aging	2.2 $x10^6$ CFU/ml	7.2 $x10^5$ CFU/ml
effluent after 46 days	4.2 $x10^5$ CFU/ml	1.1 $x10^7$ CFU/ml

CLAIMS

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method for enhancing oil recovery from an oil reservoir comprising:

a) providing a composition comprising:

i) at least one strain of *Pseudomonas stutzeri*; and

ii) a minimal growth medium comprising at least one electron acceptor;

b) providing an oil reservoir;

c) inoculating the oil reservoir with the composition of (a) such that the *Pseudomonas stutzeri* populates and grows in the oil reservoir; and

d) recovering oil from the oil reservoir;

wherein growth of the *Pseudomonas stutzeri* in the oil reservoir enhances oil recovery.

2. The method of Claim 1 wherein the strain of *Pseudomonas stutzeri* comprises a 16S rDNA sequence of SEQ ID NO:8.

3. The method of Claim 1 wherein the oil reservoir comprises at least one fluid having a concentration of salt that is at least about 30 parts per thousand.

4. The method of Claim 1 or 3 wherein the strain of *Pseudomonas stutzeri* is a strain belonging to genomovar 1 or 3.

5. The method of Claim 1 or 3 wherein the strain of *Pseudomonas stutzeri* is selected from the group consisting of *Pseudomonas stutzeri* BR5311 (ATCC No. PTA-11283), 89AC1-3 (ATCC No. PTA-11284) and LH4:15 (ATCC No. PTA-8823).

6. The method of claim 1, wherein the composition of (a) further comprises one or more additional microorganisms which grow in the presence of oil under denitrifying conditions.

7. The method of claim 6, wherein said one or more additional microorganisms comprises a *Shewanella* species.

8. The method of claim 7 wherein the *Shewanella* species comprises a 16S rDNA comprising the degenerate signature sequences of SEQ ID NOs: 39, 41 and 43.

9. The method of claim 1 wherein the electron acceptor is at least one ionic salt of nitrate.

10. The method of claim 1 wherein the electron acceptor is at least one ionic salt of nitrite or a combination of at least one salt of nitrite and at least one salt of nitrate.

11. An isolated microorganism selected from the group consisting of *Pseudomonas stutzeri* BR5311 (ATCC No. PTA-11283) and *Pseudomonas stutzeri* 97AC1-3 (ATCC No. PTA-11284).

12. An oil recovery enhancing composition comprising:

a) at least one isolated microorganism of Claim 11;

b) one or more electron acceptors; and

c) at least one carbon source.

13. The composition of Claim 12 wherein the microorganism of Claim 11 produces a plugging biofilm.

14. The composition of claim 12, wherein said at least one carbon source is selected from the group consisting of lactate, acetate, and succinate.

15. The composition of claim 12, further comprising one or more additional microorganisms.

16. The composition of claim 15, wherein said one or more additional microorganisms will grow in the presence of oil under denitrifying conditions.

17. The composition of claim 16, wherein said one or more additional microorganisms comprises a *Shewanella* species.

18. The method of claim 17 wherein the *Shewanella* species comprises a 16S rDNA comprising the degenerate signature sequences of SEQ ID NOs:39, 41 and 43.

Figure 1

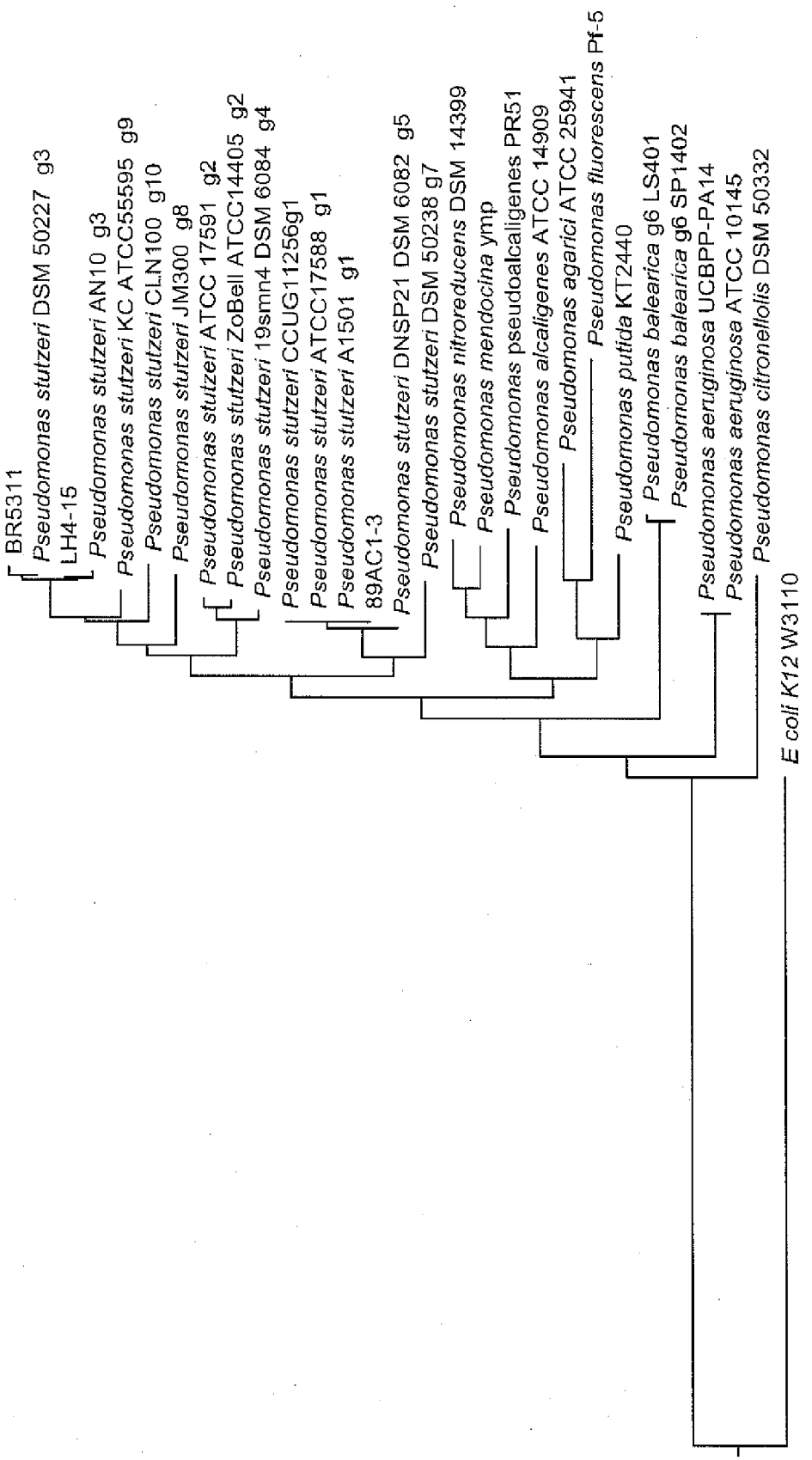

BR5311
Pseudomonas stutzeri DSM 50227 g3
LH4-15
Pseudomonas stutzeri AN10 g3
Pseudomonas stutzeri KC ATCC55595 g9
Pseudomonas stutzeri CLN100 g10
Pseudomonas stutzeri JM300 g8
Pseudomonas stutzeri ATCC 17591 g2
Pseudomonas stutzeri ZoBell ATCC14405 g2
Pseudomonas stutzeri 19smn4 DSM 6084 g4
Pseudomonas stutzeri CCUG11256g1
Pseudomonas stutzeri ATCC17588 g1
Pseudomonas stutzeri A1501 g1
89AC1-3
Pseudomonas stutzeri DNSP21 DSM 6082 g5
Pseudomonas stutzeri DSM 50238 g7
Pseudomonas nitroreducens DSM 14399
Pseudomonas mendocina ymp
Pseudomonas pseudoalcaligenes PR51
Pseudomonas alcaligenes ATCC 14909
Pseudomonas agarici ATCC 25941
Pseudomonas fluorescens Pf-5
Pseudomonas putida KT2440
Pseudomonas balearica g6 LS401
Pseudomonas balearica g6 SP1402
Pseudomonas aeruginosa UCBPP-PA14
Pseudomonas aeruginosa ATCC 10145
Pseudomonas citronellolis DSM 50332
E coli K12 W3110

Figure 2

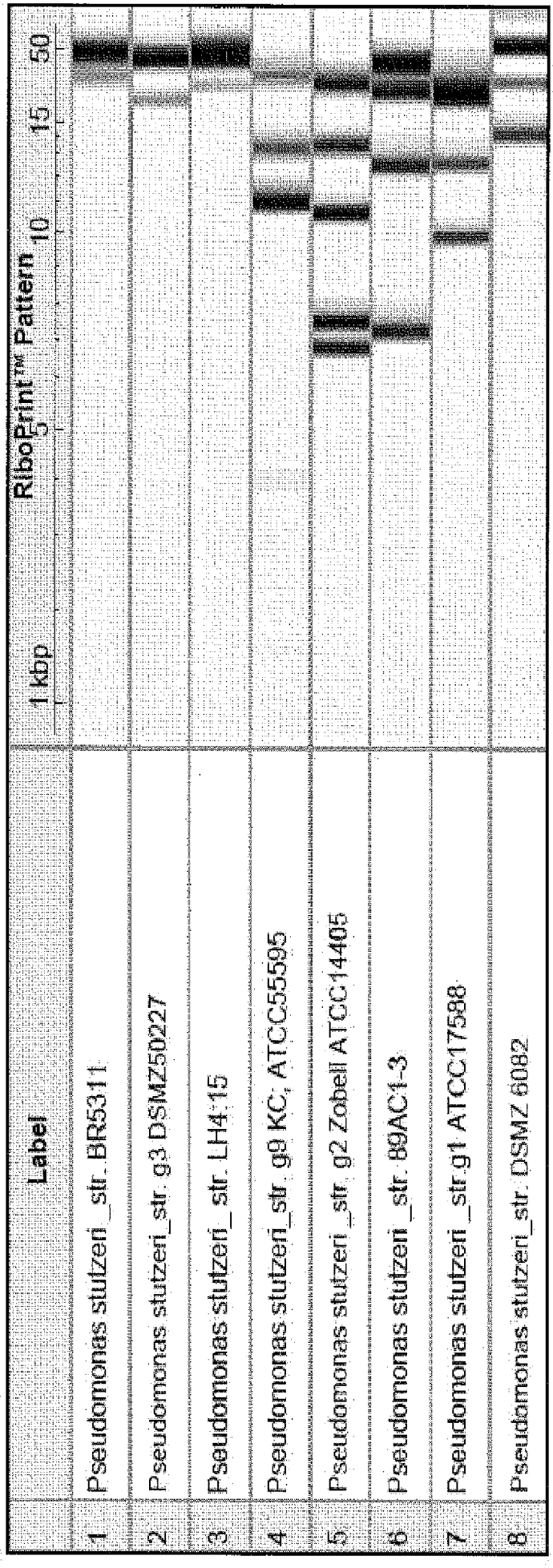

Label
RiboPrint™ Pattern
1 kbp
5
10
15
50
1 Pseudomonas stutzeri _str. BR5311
2 Pseudomonas stutzeri_str. g3 DSMZ50227
3 Pseudomonas stutzeri_str. LH4:15
4 Pseudomonas stutzeri_str. g9 KC; ATCC55595
5 Pseudomonas stutzeri _str. g2 Zobell ATCC14405
6 Pseudomonas stutzeri _str. 89AC1-3
7 Pseudomonas stutzeri _str.g1 ATCC17588
8 Pseudomonas stutzeri_str. DSMZ 6082

Figure 3

A

```
SEQ.                                          170       180       190       200   203
ID NO:                                        +---------+---------+---------+---
   *38Shewanella dominate signature           GCATACGCCCTACGGGGGAAAGAGGGGGACTTTC  203
    39Shewanella degenerate signature         GCATACGCCCTACGGGGGAAARRRGGGGMNYYTM  203
```

B

```
SEQ.                                          820       830       840       850       860
ID NO:                                        +---------+---------+---------+---------+
   40Shewanella dominate signature            TCGGAGTTTGGTGTCTTGAACACTGGGCTCTCAAGCTAACG    860
   41Shewanella degenerate signature          TCGGARTTTGGTVHCTTRRACACTGGKYTYYMAAGCTAACG    860
```

C

```
SEQ.                                    1230      1240      1250      1260      1270
ID NO:                                  +---------+---------+---------+---------+---------
   42Shewanella dominate signature      ACAATGGCGAGTACAGAGGGTTGCAAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCTCA
   43Shewanella degenerate signature    ACAATGGBVDDTACAGAGGGTTGCRAAGCCGCRAGGTSDAGCTAATCYCA

                                        1280      1290      1300      1310      1320
                                        +---------+---------+---------+---------+-----
   Shewanella dominate signature  cont'd.  CAAAGCTCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATG
   Shewanella degenerate signature cont'd. BAAAGBHBGTCGTAGTCCGGATYGGAGTCTGCAACTCGACTCCRTG
```

Legend:
R=A/G; Y=T/C; M=A/C; S=G/C; N=A/C/G/T; H=A/C/T/not G; V=A/C/G/not T B=C/G/T/ not A;
D=A/G/T/not C; K=G/T

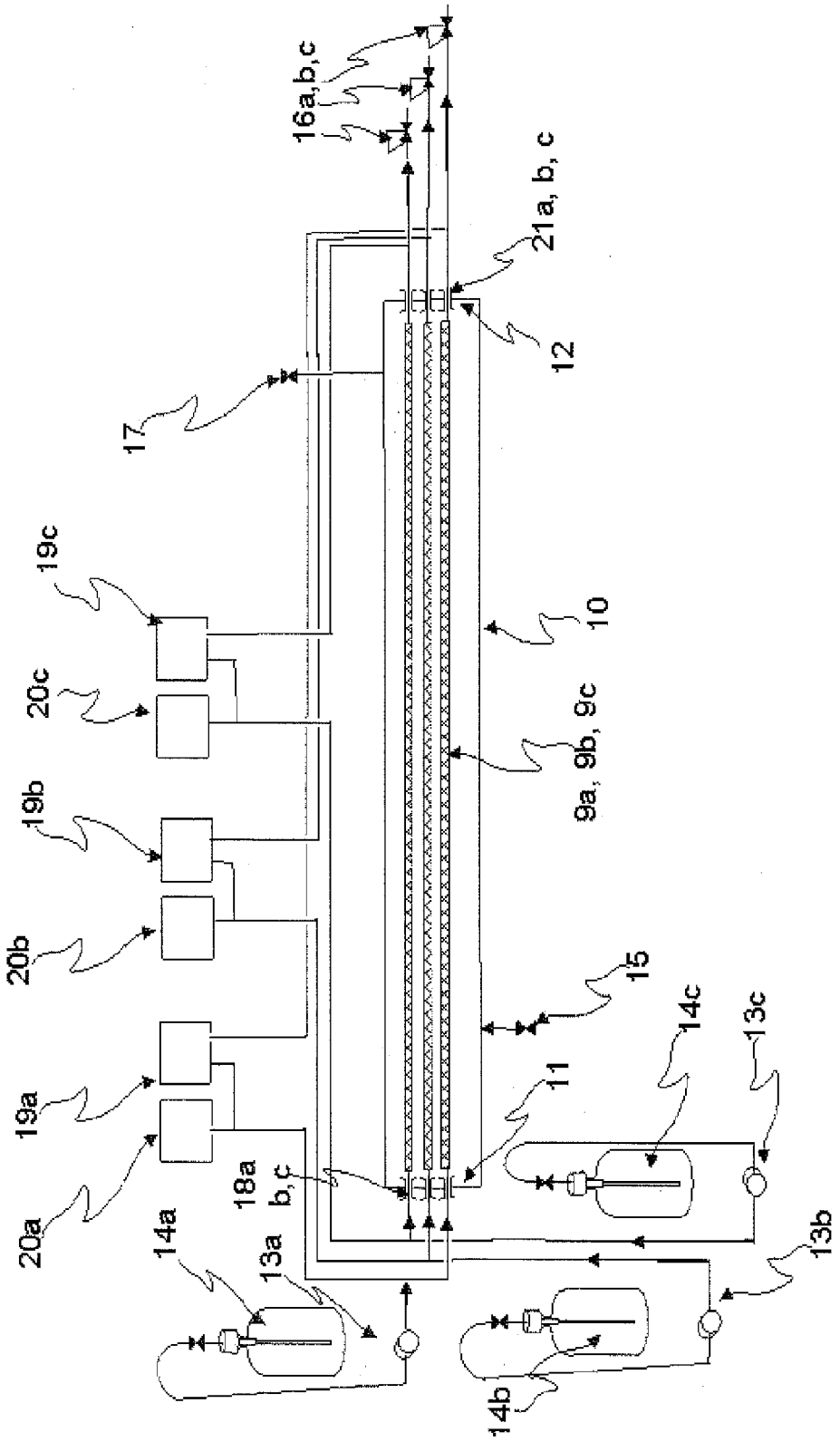

16a,b,c
21a, b, c
12
17
19c
20c
19b
20b
19a
20a
10
9a, 9b, 9c
15
14c
13c
11
18a b,c
14a
13a
13b
14b

Figure 4

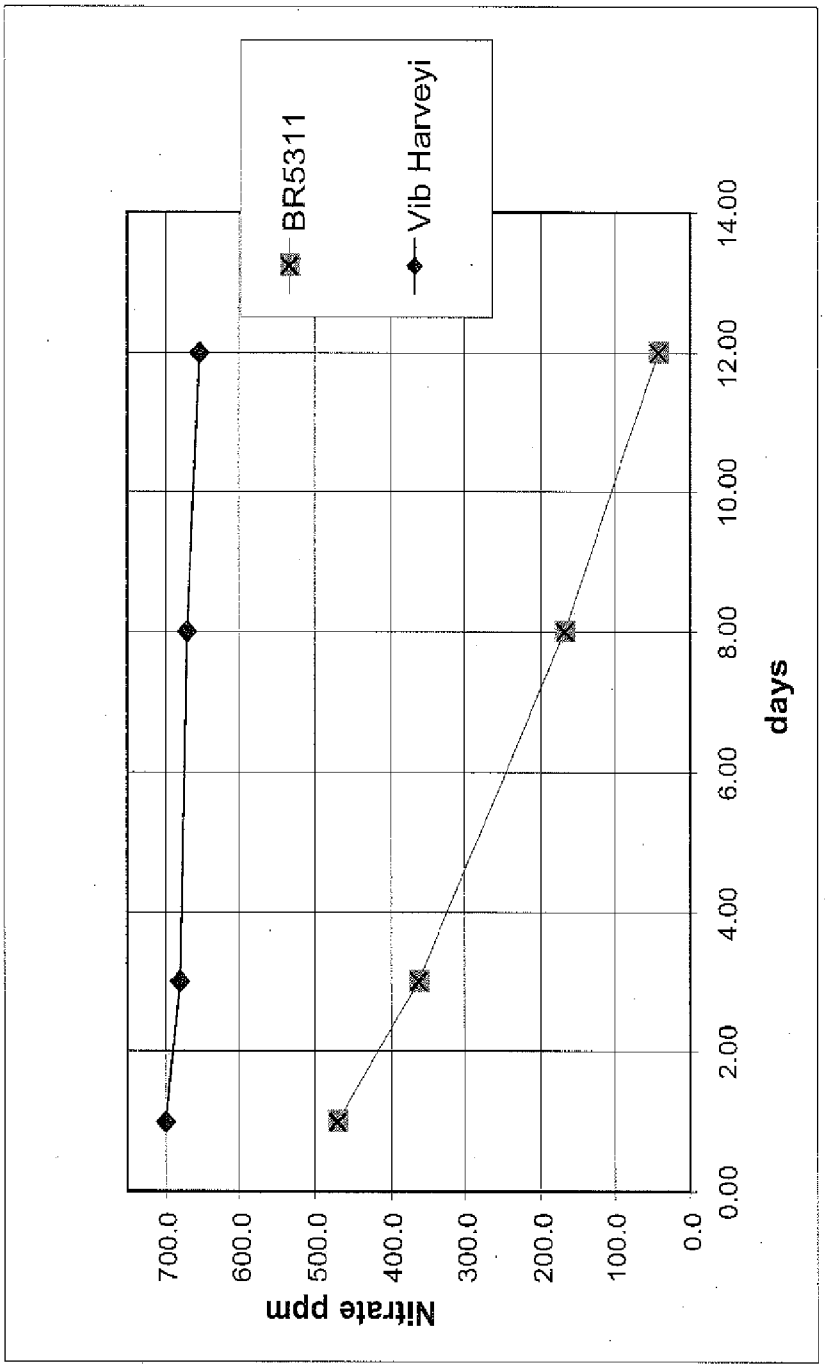

BR5311
Vib Harveyi
Nitrate ppm
700.0
600.0
500.0
400.0
300.0
200.0
100.0
0.0
0.00
2.00
4.00
6.00
8.00
10.00
12.00
14.00
days

Figure 5A

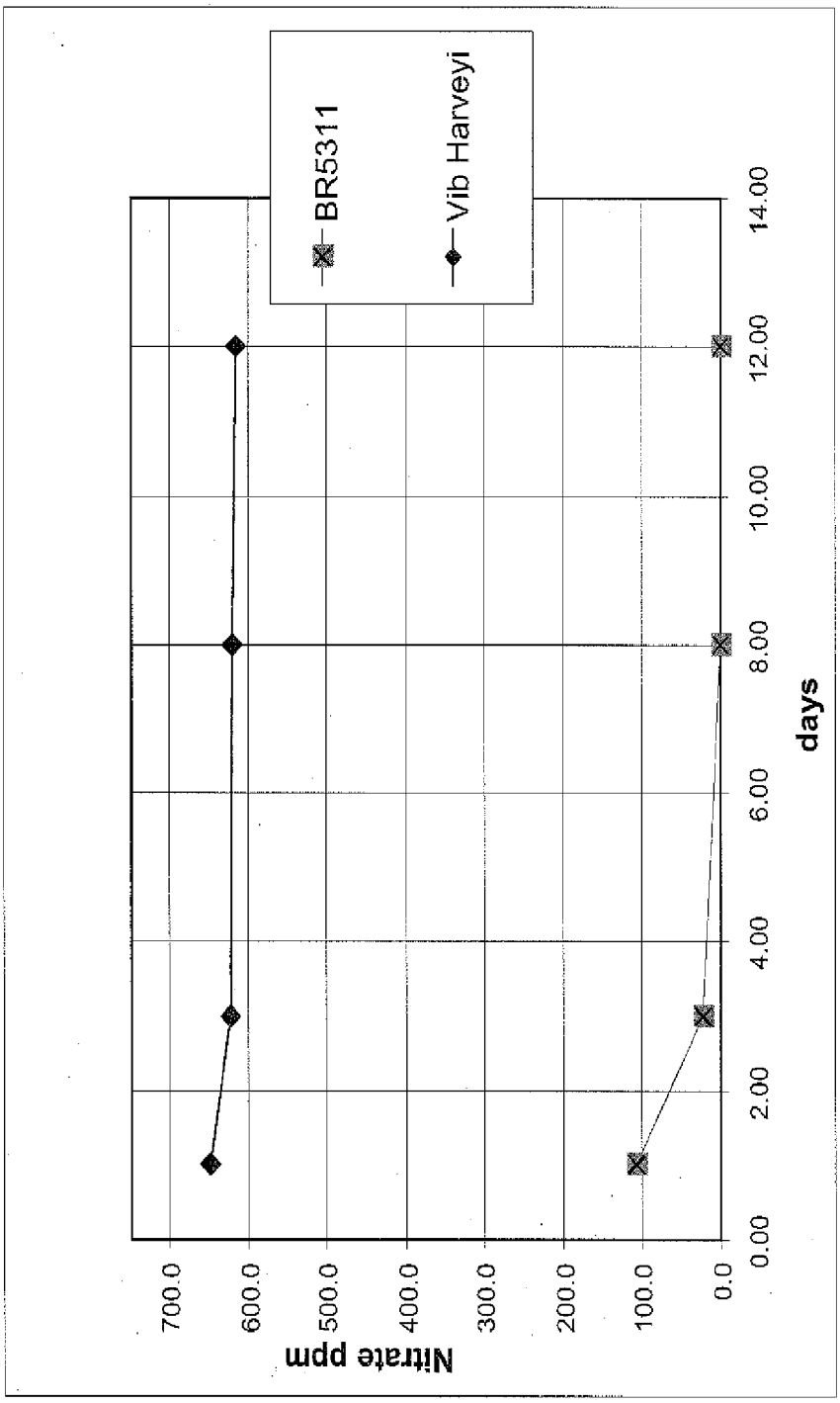

BR5311
Vib Harveyi
Nitrate ppm
700.0
600.0
500.0
400.0
300.0
200.0
100.0
0.0
0.00
2.00
4.00
6.00
8.00
10.00
12.00
14.00
days

Figure 5B

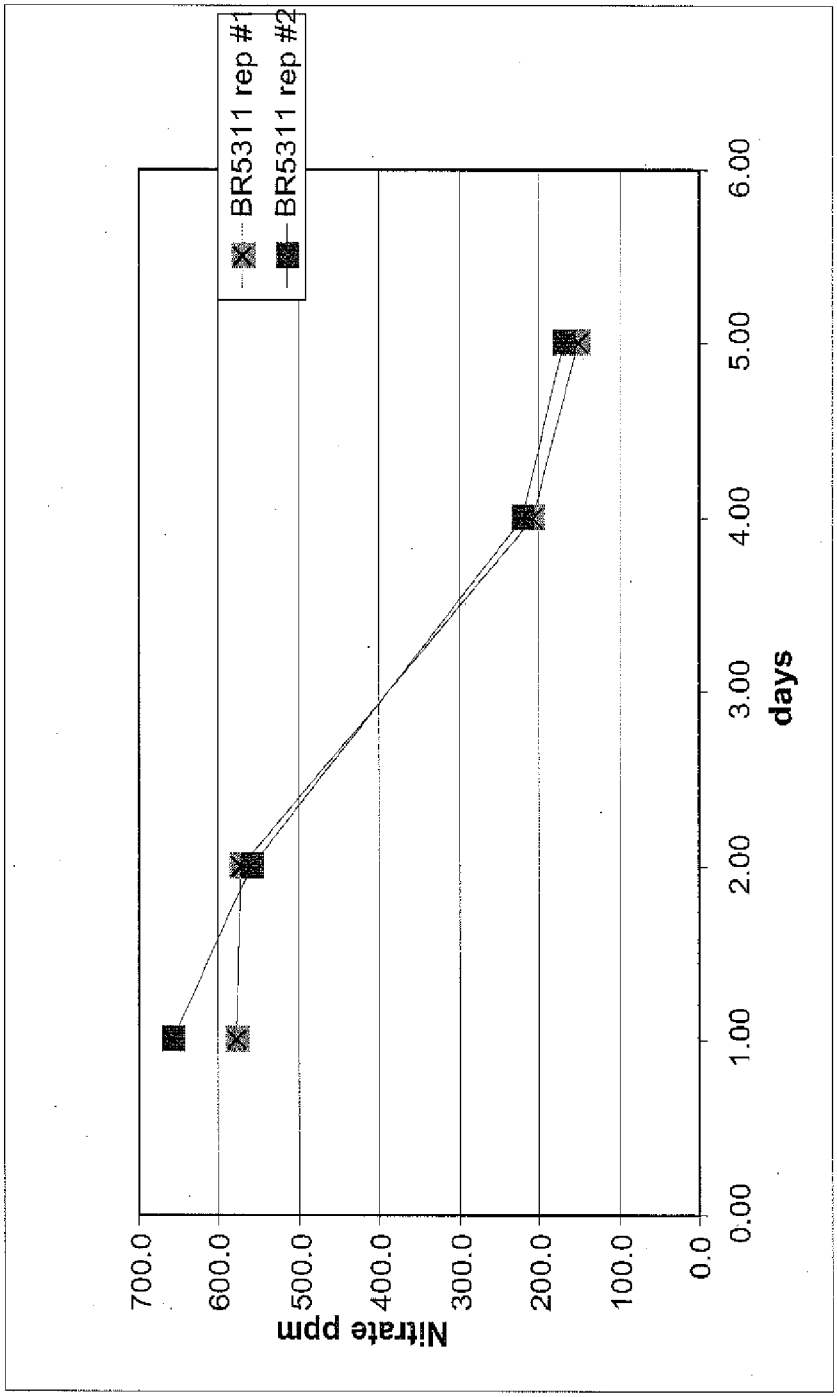

BR5311 rep #1
BR5311 rep #2
Nitrate ppm
700.0
600.0
500.0
400.0
300.0
200.0
100.0
0.0
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
days

Figure 6

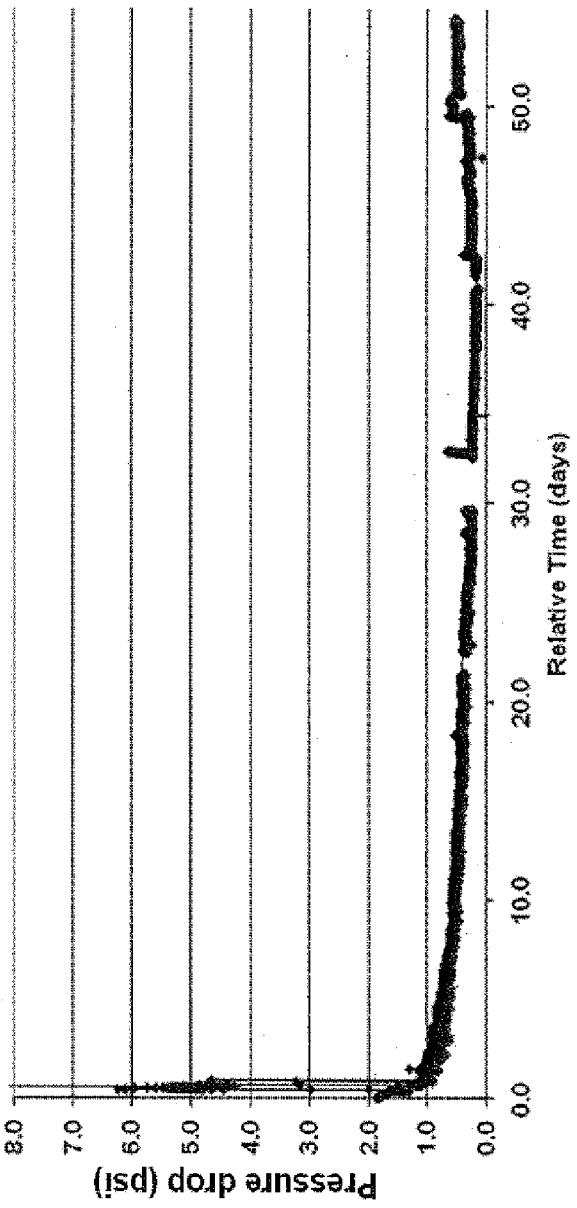

Pressure drop (psi)
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
0.0
10.0
20.0
30.0
40.0
50.0
Relative Time (days)

Figure 7

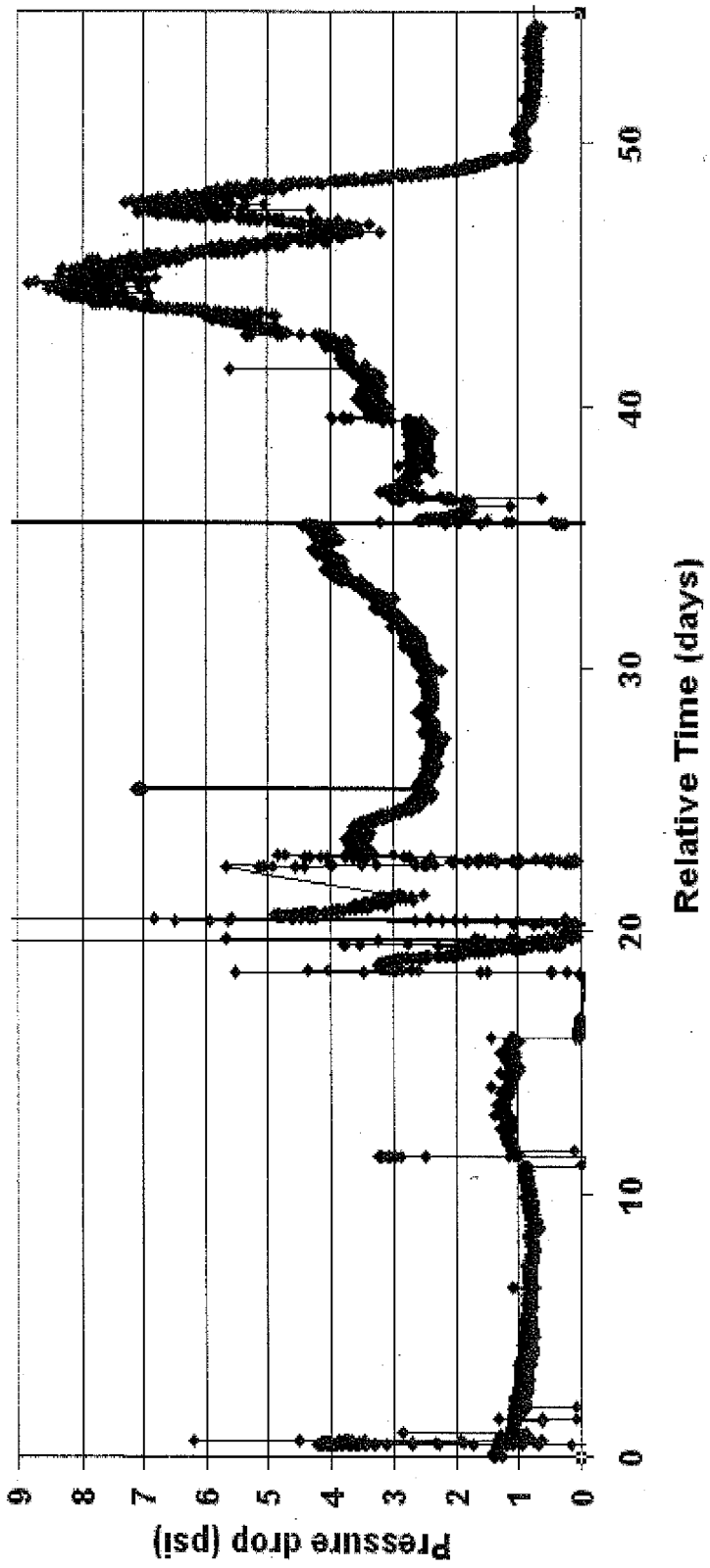

Pressure drop (psi)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
Relative Time (days)
0
10
20
30
40
50

Figure 8

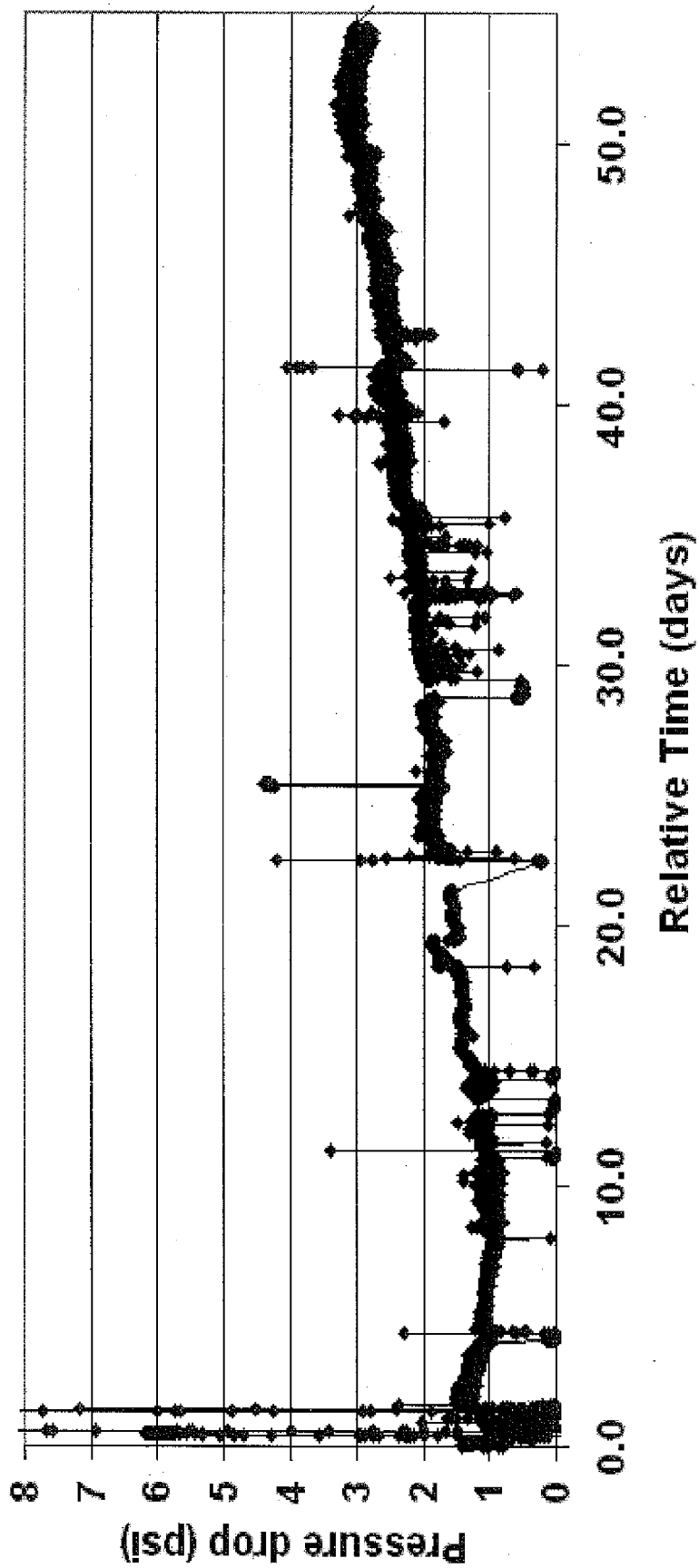
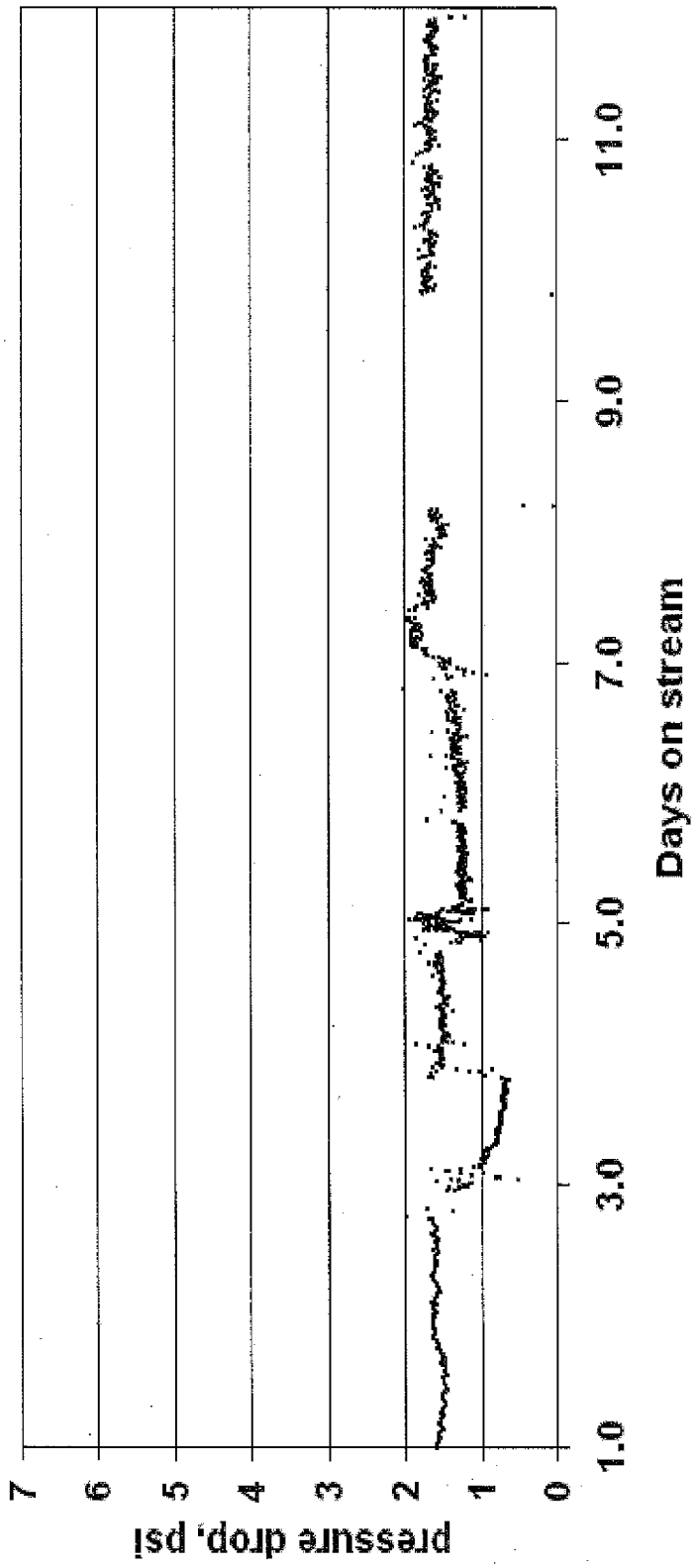

Pressure drop (psi)
8
7
6
5
4
3
2
1
0
0.0
10.0
20.0
30.0
40.0
50.0
Relative Time (days)

Figure 9

Figure 10



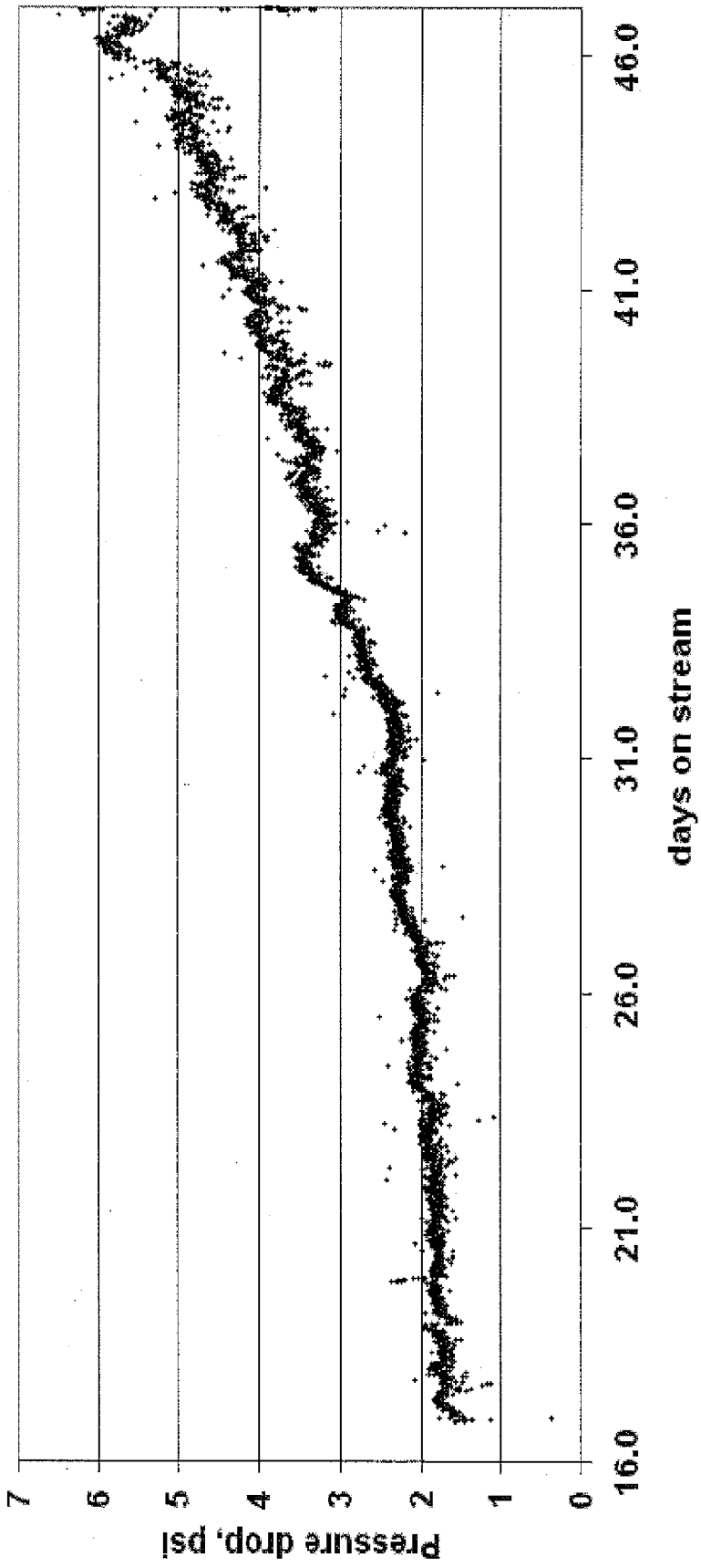

Pressure drop, psi
7
6
5
4
3
2
1
0
16.0
21.0
26.0
31.0
36.0
41.0
46.0
days on stream

Figure 11

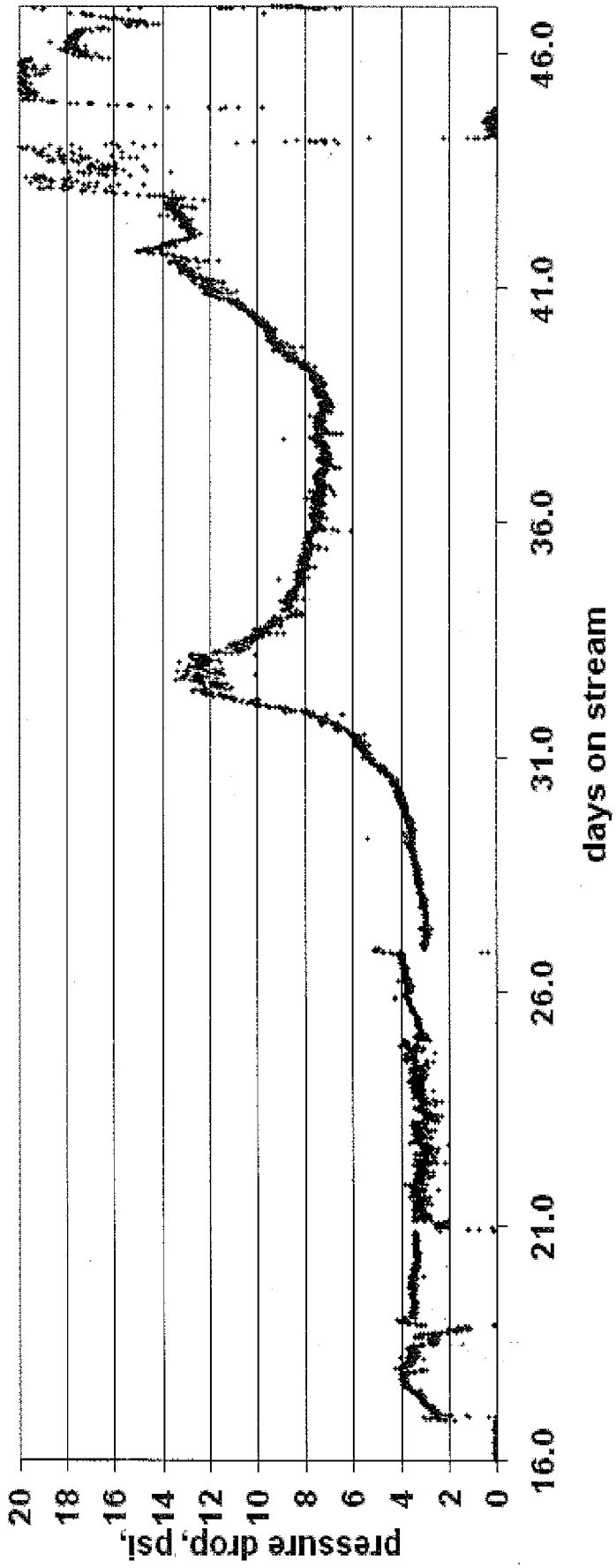

pressure drop, psi,
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
16.0
21.0
26.0
31.0
36.0
41.0
46.0
days on stream

Figure 12

- 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:** 0493775
9. **Sello:**



10. Firma:

Firmado
Secretario de Estado

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

En este día 11 del mes de abril del 2013, personalmente aparecieron ante mí Robert D. Fallon*;* 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 12 del mes de abril del 2013, personalmente aparecieron ante mí Edwin R. Hendrickson; Abigail K. Luckring 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 16 del mes de abril del 2013, personalmente apareció ante mí Scott Christopher Jackson a quien conozco y para mí es la persona_descrita y quien ejecuto 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.

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

En este día 17 del mes de abril del 2013, personalmente apareció ante mí Bethany C. Rees a quien conozco y para mí es la persona_descrita y quien ejecuto 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 -

PCT/US11/58729

PATENTE

EN LA OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS

EN LA SOLICITUD DE:

ROBERT D. FALLON et al.

CASO No.: CL5094USNA SOLICITUD No.:

CONFIRMACIÓN No: UNIDAD DE GRUPO TECNICO:

EXAMINADOR: PRESENTADA:

PARA: MÉTODOS, CEPAS Y COMPOSICIONES UTILES PARA LA RECUPERACIÓN MICROBIALMENTE MEJORADA DEL PETROLEO: PSEUDOMONAS STUTZERI

DECLARACION DEL DEPÓSITO DEL CULTIVO BIOLÓGICO

Via EFS-Web

Comisionado para patentes

P.O. Box1450

Alexandria, VA 22313-1450

Señor:

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

a) Soy el apoderado registrado en la solicitud antes identificada;
b) De acuerdo a la norma 37 CFR 1.804, los cultivos de los siguientes materiales biológicos han sido depositados con el (los) siguiente(s) depositario(s) internacional(es):

   American Type Culture Collection (ATCC)

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

Bajo condiciones que satisfacen los requerimientos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional de Depósitos de Microorganismos para el propósito de Procedimientos de patentes [“El Tratado”];

c) Se adjunta una copia del recibo emitido de acuerdo con las Reglas del Tratado 7.3 y 10.2; y

Identificación del depositante del organismo	Número de acceso de depósito Internacional	Fecha del depósito
Pseudomonas stutzeri BR5311	PTA-11283	Septiembre 9, 2010
Pseudomonas stutzeri 89AC1-3	PTA-11284	Septiembre 9, 2010

a) Todas las restricciones sobre la disponibilidad al público del cultivo serán removidas irrevocablemente luego del otorgamiento de la patente Estadounidense a la solicitud antes identificada.

Atentamente.

/Roger W. Herrell, Jr/

ROGER W. HERRELL, JR.

APODERADO DE LOS
SOLICITANTES

Registro No.: 62.228

Teléfono: (302) 992-5463

Fax: (302) 355-3982

Fechado: Octubre 25, 2011

Anexo: Recibo del Depósito

CERTIFICADO DE DEPÓSITO BAJO BUDAPEST

RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DE DEPÓSITOS DE MICROORGANISMOS PARA EL PROPÓSITO DE PROCEDIMIENTOS DE PATENTES

FORMA INTERNACIONAL

RECIBO EN EL CASO DE UN DEPOSITO ORIGINAL EMITIDO DE ACUERDO CON LA REGLA 7.3

Y DECLARACIÓN DE VIABILIDAD EMITIDA DE ACUERDO CON LA REGLA 10.2

La American Type Culture Collection (ATCC®) ha recibido su depósito de semillas/cepas relacionadas con la presentación de una solicitud de patente. La siguiente información se suministra para cumplir con los requerimientos de la Oficina de Patentes.

Robert S. Scott

E. I. DuPont de Nemours and Company, Inc.

200 Powder Mill Road

Experimental Station E301/317

Wilmington, DE 19880-0301

Depositado a nombre de: **E. I. DuPont de Nemours & Co**

Fecha de Recepción de las semillas/cepas por ATCC®: **Septiembre 8, 2010**

Referencia Identificación del Depositante	Designación del Depósito de Patente ATCC®	Cantidad Recibida
Pseudomonas stutzeri BR5311	PTA-11283	25 frascos
Pseudomonas stutzeri 89AC1-3	PTA-11410	25 frascos

La ATCC® entiende que:

1. El depósito de estas semillas/cepas no le otorga licencia a ATCC®, ni expresa ni implícita, para infringir la patente, y nuestra entrega de estas semillas/cepas a terceros no les otorga a estos una licencia, ni expresa ni implícita, para infringir la patente.
2. Si el depósito muriera o fuera destruido durante el término efectivo de vida de la patente, será su responsabilidad remplazarlo con material viable. También será su responsabilidad suministrar una cantidad suficiente para su distribución durante el término del depósito. ATCC® distribuirá y mantendrá el material durante 30 años o 5 años según la solicitud más reciente para el depósito, el que sea más largo. Los Estados Unidos y muchos otros países son signatarios del Tratado de Budapest.

Antes del otorgamiento de una Patente Estadounidense, la ATCC® está de acuerdo en considerar un cargo por una vez por el servicio, no distribuir estas semillas/cepas o cualquier información relacionada con estas o su depósito excepto por instrucción del depositante o de la Oficina de patentes relevante. Después que la patente haya sido otorgada, nosotros somos responsables de liberar las semillas/cepas y por lo tanto estarán disponibles para su distribución al público sin restricciones. Les informaremos de las solicitudes de semillas/cepas durante 30 años a partir de la fecha del depósito.

El depósito fue probado el **7 de octubre de 2010** y en esa fecha, las semillas/cepas fueron consideradas viables

Autoridad Depositaria Internacional: American Type Culture Collection (ATCC®), Manassas, VA, USA

Firma de la persona que tiene autoridad para representar a ATCC®:

Latha Ramakrishnan

Firmado digitalmente por Latha Ramakrishnan (Letra pequeña ilegible)

ATCC® Depositaria para patente **Octubre 8, 2010**

Fecha

Ref: Expediente o caso No.: CL5094

METODOS, CEPAS Y COMPOSICIONES UTILES PARA LA RECUPERACION MEJORADA DE PETROLEO POR VIA MICROBIANA: *Pseudomonas stutzeri*

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 61/408734, presentada el 1.° de noviembre de 2010, y se incorpora como referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

Esta descripción se relaciona con el campo de la microbiología ambiental y la modificación de las propiedades de pozos de petróleo crudo mediante el uso de microorganismos. Más específicamente, se presentan métodos para mejorar la recuperación de petróleo de un yacimiento subterráneo, y se identifican nuevos microorganismos que pueden usarse para la recuperación de petróleo.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Durante la recuperación de petróleo de yacimientos petroleros, típicamente, solamente se recupera una porción menor del petróleo original en los estratos que contienen petróleo por métodos de recuperación primaria que usan solo las fuerzas naturales presentes en un yacimiento de petróleo. Para mejorar la recuperación de petróleo, se ha usado una variedad de técnicas de recuperación complementarias, tales como la

inundación con agua, que involucra la inyección de agua a través de orificios en el pozo hacia el interior del yacimiento de petróleo. A medida que el agua entra en el yacimiento desde un pozo de inyección y se mueve a través de los estratos del yacimiento, el agua desplaza el petróleo a uno o más pozos de producción en donde se recupera el petróleo. Un problema que se presenta comúnmente en las operaciones de inundación con agua es la eficacia de barrido deficiente del agua de inyección. La eficacia de barrido deficiente se produce cuando el agua se canaliza, preferentemente, a través de zonas sumamente permeables del yacimiento petrolero a medida que se desplaza desde uno o más pozos de inyección hacia uno o más pozos de producción y pasa por alto, de este modo, estratos que tienen petróleo que son menos permeables. Por lo tanto, el petróleo de zonas menos permeables no se recupera. La eficacia de barrido deficiente puede deberse, además, a diferencias en la movilidad del agua en comparación con la del petróleo.

Se han usado microorganismos para mejorar la recuperación de petróleo de formaciones subterráneas mediante el uso de varios procesos que pueden mejorar la eficacia de barrido y/o la liberación de petróleo. Por ejemplo, pueden inyectarse microorganismos viables en un yacimiento petrolero, en donde estos organismos pueden crecer y adherirse a las superficies de poros y canales en las matrices de roca o arena en las zonas permeables para reducir la canalización del agua y, de este

modo, dirigir el flujo del agua de inyección hacia estratos menos permeables que tienen petróleo. Los procesos para promover el crecimiento de microbios autóctonos al inyectar soluciones nutrientes en formaciones subterráneas se describen en las patentes de los Estados Unidos núms. 4.558.739 y 5.083.611. La inyección de microorganismos aislados de sitios de recuperación de petróleo en formaciones subterráneas junto con soluciones nutrientes se ha descrito, incluso para *Pseudomonas putida* y *Klebsiella pneumoniae* (patente de los Estados Unidos núm. 4.800.959), para una cepa de *Bacillus* o cepa I-2 de *Pseudomonas* (ATCC 30304) aislada de agua de grifo (patente de los Estados Unidos núm. 4.558.739), y para *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium lepus*, *Mycobacterium rhodochrous*, y *Mycobacterium vaccae* (patente de los Estados Unidos núm. 5.163.510). La inyección de microorganismos aislados y un surfactante se describe en la patente de los Estados Unidos núm. 5.174.378.

La publicación de solicitud de patente copendiente y de propiedad mancomunada de los Estados Unidos núm. 2009/0263887 describe un microorganismo identificado como cepa LH4:15 de *Pseudomonas stutzeri* (núm. ATCC: PTA-8823), que se aisló de muestras combinadas de petróleo/agua de la cabeza de pozos de producción. Se describieron composiciones y métodos para mejorar la recuperación de petróleo con esta cepa. La patente de los Estados Unidos núm. 7.776.795 describe un microorganismo

identificado como cepa LH4:18 de *Shewanella putrefaciens*, que se aisló de muestras combinadas de petróleo/agua de la cabeza de pozos de producción. Se describieron composiciones y métodos para mejorar la recuperación de petróleo con esta cepa. La publicación de solicitud de patente copendiente y de propiedad mancomunada de los Estados Unidos núm. 2011/0030956 describe una superficie recubierta con hidrocarburos que se pone en contacto con un medio que comprende *Shewanella* sp. Para alterar la humectabilidad de una superficie recubierta con hidrocarburos y mejorar la recuperación de petróleo.

Se necesitan otras cepas microbianas y métodos útiles para mejorar la recuperación de petróleo y mejorar aún más la recuperación de petróleo de yacimientos petroleros.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La invención se relaciona con métodos para mejorar la recuperación de petróleo de un yacimiento petrolero así como con microorganismos aislados y composiciones que pueden usarse para mejorar la recuperación de petróleo.

Consecuentemente, la invención proporciona un método para mejorar la recuperación de petróleo de un yacimiento petrolero; el método comprende:

a) proporcionar una composición que comprende:

i) al menos una cepa de *Pseudomonas stutzeri*: y

ii) un medio de crecimiento mínimo que comprende por lo menos un aceptor de electrones;

b) proporcionar un yacimiento petrolero;

c) inocular el yacimiento petrolero con la composición de (a) para que la *Pseudomonas stutzeri* se reproduzca y crezca en el yacimiento petrolero; y

d) recuperar petróleo del yacimiento petrolero;

en donde el crecimiento de la *Pseudomonas stutzeri* en el yacimiento petrolero mejora la recuperación de petróleo.

En otra modalidad, la invención proporciona un microorganismo aislado seleccionado del grupo que consiste en BR5311 de *Pseudomonas stutzeri* (núm. ATCC: PTA 11283) y 89AC1-3 de *Pseudomonas stutzeri* (núm. ATCC: PTA-11284).

En aún otra modalidad, la invención proporciona una composición que mejora la recuperación de petróleo; la composición comprende:

a) por lo menos un microorganismo aislado de los mencionados anteriormente;

b) uno o más aceptores de electrones; y

c) por lo menos una fuente de carbono.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS Y SECUENCIAS

La presente invención se comprenderá más fácilmente a partir de la siguiente descripción detallada, las figuras y descripciones de secuencias que se acompañan, las cuales forman parte de esta solicitud.

La Figura 1 muestra un árbol filogenético para *Pseudomonas stutzeri* y especies relacionadas con *Pseudomonas* que está basado en diferencias en las secuencias génicas del ARNr 16S (ADNr).

La Figura 2 muestra un análisis de ribotipado automático, RIBOPRINTER®, de varias cepas de *Pseudomonas stutzeri*.

La Figura 3 muestra secuencias distintivas dominantes y degeneradas para la especie *Shewanella* en las regiones variables 2 (A), 5 (B) y 8 (C) del ADNr. Las posiciones variables están subrayadas. En la leyenda se dan nucleótidos alternativos para cada designación de posiciones variables.

La Figura 4 muestra un diagrama esquemático de la configuración experimental de tubos delgados usados para medir la obturación de paquetes de arena permeable.

La Figura 5 muestra gráficas de cambios observados en la concentración de nitratos (ppm) como una medida del crecimiento de BR5311 y *Vibrio harveyi* en mezclas de agua de producción (A) o agua de inyección (B) del pozo petrolero núm. 2 que incluyen nutrientes.

La Figura 6 muestra una gráfica de cambios observados en la concentración de nitratos (ppm) como una medida del crecimiento de BR5311 en agua de producción del pozo petrolero núm. 2 con adiciones limitadas de nutrientes.

La Figura 7 muestra una gráfica de la caída de presión a través de un tubo delgado de control (9a) sin inóculo o alimentación de nutrientes en él, medida por más de 50 días.

La Figura 8 muestra una gráfica de la caída de presión a través de un tubo delgado (9b) que fue inoculado con LH 4:15 de *Pseudomonas stutzeri* (núm. ATCC: PTA-8823) y que, después, fue alimentado con nutrientes continuamente, medida por más de 50 días.

La Figura 9 muestra una gráfica de la caída de presión a través de un tubo delgado (9c) que fue inoculado con LH 4:15 de *Pseudomonas stutzeri* (núm. ATCC: PTA-8823) y que, después, se alimentó por lotes periódicamente con nutrientes concentrados, medida por más de 50 días.

La Figura 10 muestra una gráfica de la caída de presión a través de un tubo delgado (9a-2) antes de la inoculación, medida durante 12 días.

La Figura 11 muestra una gráfica de la caída de presión a través de un tubo delgado (9a-2) que fue inoculado con BR5311 de *Pseudomonas stutzeri* (núm. ATCC: PTA-11283) y que, después, se alimentó por lotes periódicamente con nutrientes, medida por más de 46 días.

La Figura 12 muestra una gráfica de la caída de presión a través de un tubo delgado (9b-2) que fue inoculado con BR5311 de *Pseudomonas stutzeri* (núm. ATCC: PTA-11283) y que, después, se alimentó continuamente con nutrientes, medida por más de 46 días.

Las siguientes secuencias cumplen con el Título 37 del C.F.R., §§1.821-1.825 ("Requisitos para solicitudes de patentes que contienen descripciones de secuencias de nucleótidos y/o de secuencias de aminoácidos - reglas de las secuencias") según la norma ST.25 (2009) de la Organización Mundial de Propiedad Intelectual (WIPO, por sus siglas en inglés) y los requisitos para listados de secuencias de la EPO y el PCT (Reglas 5.2 y 49.5(a-bis), y Sección 208 y Anexo C de las Instrucciones Administrativas. Los símbolos y el formato que se usan para los datos de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos cumplen con las reglas que se exponen en el Título 37 del C.F.R., §1.822.

Las sec. con núms. de ident.:1 - 4 son iniciadoras.

La sec. con núm. de ident.:5 es la secuencia del ADNr 16S secuenciado de la cepa BR5311.

La sec. con núm. de ident.:6 es la secuencia del ADNr 16S secuenciado de la cepa 89AC1-3.

La sec. con núm. de ident.:7 es una secuencia consenso dominante del ADNr 16S para *Pseudomonas stutzeri*

La sec. con núm. de ident.:8 es una secuencia consenso degenerada del ADNr 16S para *Pseudomonas stutzeri*.

Tabla 1. Secuencias del ADNr 16S de cepas de *Pseudomonas* que incluyen las coordenadas 60 a 1400 en la secuencia del ADNr 16S de *E. coli*, incluidas como referencia.

ADNr 16S: coordenadas 60 a 1400	Genomovar o tipo*	Sec. con núm. de ident.
Escherichia coli K-12 W3110	NA[núm.]	9
Pseudomonas stutzeri BR5311	NA	10
Pseudomonas stutzeri 89AC1-3	NA	11
Pseudomonas stutzeri LH4:15	NA	12
Pseudomonas stutzeri DSM 50227	g3	13
Pseudomonas stutzeri AN10	g3	14
Pseudomonas stutzeri ATCC 17591	g2	15
Pseudomonas stutzeri ZoBell ATCC 14405	g2	16
Pseudomonas stutzeri ATCC 17588	g1	17
Pseudomonas stutzeri A1501	g1	18
Pseudomonas stutzeri 19smn4 DSM 6084	g4	19
Pseudomonas stutzeri DNSP21 DSM 6082	g5	20
Pseudomonas stutzeri DSM 50238	g7	21
Pseudomonas stutzeri JM300	g8	22
Pseudomonas stutzeri KC ATCC 55595	g9	23

Pseudomonas stutzeri CLN100	g10	24
Pseudomonas stutzeri CCUG 11256	g1	25
Pseudomonas balearica SP1402	Tipo g6	26
Pseudomonas balearica LS401	g6	27
Pseudomonas aeruginosa ATCC 10145	Tipo	28
Pseudomonas aeruginosa UCBPP-PA14	NA	29
Pseudomonas citronellolis DSM 50332	NA	30
Pseudomonas alcaligenes ATCC 14909	Tipo	31
Pseudomonas nitroreducens DSM 14399	Tipo	32
Pseudomonas mendocina ymp	Tipo	33
Pseudomonas agarici ATCC 25941	Tipo	34
Pseudomonas pseudoalcaligenes PR51	NA	35
Pseudomonas fluorescens Pf5	NA	36
Pseudomonas putida KT2440	NA	37

* Tipo: una cepa Tipo para esa especie
núm NA: no aplicable

La sec. con núm. de ident.:38 es la secuencia distintiva dominante de *Shewanella* para la región variable 2 del ADNr 16S.

La sec. con núm. de ident.:39 es la secuencia distintiva degenerada de *Shewanella* para la región variable 2 del ADNr 16S.

La sec. con núm. de ident.:40 es la secuencia distintiva dominante de *Shewanella* para la región variable 5 del ADNr 16S.

La sec. con núm. de ident.:41 es la secuencia distintiva degenerada de *Shewanella* para la región variable 5 del ADNr 16S.

La sec. con núm. de ident.:42 es la secuencia distintiva dominante de *Shewanella* para la región variable 8 del ADNr 16S.

La sec. con núm. de ident.:43 es la secuencia distintiva degenerada de *Shewanella* para la región variable 8 del ADNr 16S.

La sec. con núm. de ident.:44 es la secuencia del ADNr 16S secuenciado de la cepa LH4:15.

Los solicitantes han hecho los siguientes depósitos biológicos de conformidad con los términos del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para los fines del procedimiento en materia de patentes:

Tabla 2

Información sobre las cepas depositadas

Identificación del depositante Referencia	Designación de depósito internacional	Fecha de depósito
Pseudomonas stutzeri BR5311	núm. ATCC: PTA-11283	9/9/10

Pseudomonas stutzeri 89AC1-3	núm. ATCC: PTA-11284	9/9/10

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Los solicitantes incorporan específicamente todo el contenido de todas las referencias citadas en esta descripción. A menos que se establezca de cualquier otra forma, todos los 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 valores preferibles inferiores, esto se entenderá como que específicamente describe todos los intervalos formados a partir 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 describen separadamente. Cuando en la presente descripción se menciona 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 está previsto que el alcance de la invención esté limitado a los valores específicos mencionados al definir un intervalo.

La invención se relaciona con métodos para mejorar la recuperación de petróleo de un yacimiento petrolero al inocular el yacimiento petrolero con una cepa de *Pseudomonas stutzeri*: y un medio mínimo de crecimiento que ayuda al crecimiento de *Pseudomonas stutzeri* en condiciones desnitrificantes en la

ubicación subterránea. El crecimiento de *Pseudomonas stutzeri* en el yacimiento de petróleo puede formar biopelículas que obturan zonas más permeables en capas de arena o arenisca, lo que vuelve a dirigir el agua hacia áreas más ricas en petróleo que son menos permeables. De este modo, se mejora la eficacia de barrido y se incrementa la recuperación de petróleo.

Adicionalmente, la invención se relaciona con microorganismos anteriormente desconocidos aislados de muestras de agua de producción obtenidas de un yacimiento petrolero y con composiciones que contienen estos microorganismos, que son útiles en métodos de recuperación de petróleo. Mejorar la recuperación de petróleo mediante el uso de los métodos y microorganismos descritos incrementará el rendimiento de los pozos de petróleo activos.

Se proporcionan las siguientes definiciones para los términos y abreviaturas que se usan en esta solicitud:

El término “PCR” se refiere a la reacción en cadena de la polimerasa.

El término “dNTP” se refiere a los desoxirribonucleótidos trifosfato.

El término “ASTM” se refiere, por sus siglas en inglés, a la “American Society for Testing and Materials” (Sociedad Estadounidense para Pruebas y Materiales).

La abreviatura “NCBI” se refiere, por sus siglas en inglés, al “National Center for Biotechnology Information” (Centro Nacional de Información en Biotecnología).

La abreviatura “ARN” se refiere al ácido ribonucleico.

La abreviatura “ADN” se refiere al ácido desoxirribonucleico.

La abreviatura “ATCC” se refiere, por sus siglas en inglés, al “American Type Culture Collection International Depository” (Depósito Internacional de la Colección Estadounidense de Cultivos Tipo), Manassas, VA, EE. UU. “Núm. ATCC” se refiere al número de acceso a cultivos depositados en la ATCC.

La abreviatura “CCUG” se refiere a la “Culture Collection of the University of Göteborg” (Colección de Cultivos de la Universidad de Göteborg), Suecia, que es una colección de microorganismos.

La abreviatura “DSM” o “DSMZ” se refiere a “Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH”, que es una colección alemana de microorganismos y cultivos celulares (Braunschweig, Alemania).

Los términos “yacimiento de petróleo/petrolero” y “estrato que tiene petróleo” pueden usarse intercambiablemente en la presente descripción, y se refieren a una formación subterránea o del lecho marino a partir de la cual puede recuperarse el

petróleo. La formación es, generalmente, un cuerpo de rocas y suelo que tienen la porosidad y permeabilidad suficientes para almacenar y transmitir petróleo.

El término “orificio de pozo” se refiere a un canal desde la superficie hacia un estrato que tiene petróleo y que tiene el tamaño suficiente para permitir el bombeo de fluidos ya sea desde la superficie hacia el estrato que tiene petróleo (pozo de inyección) o a partir del estrato que tiene petróleo hacia la superficie (pozo de producción).

Los términos “desnitrificante” y “desnitrificación” significan reducir nitrato para uso en generación de energía respiratoria.

El término “eficacia de barrido” se refiere a la fracción de un estrato que tiene petróleo a través de la cual pasan fluidos o agua para mover el petróleo a los pozos de producción. Un problema que puede surgir con el proceso de inundación con agua es la eficacia de barrido relativamente ineficiente del agua, es decir, el agua puede canalizarse a través de ciertas porciones de un yacimiento a medida que se desplaza desde uno o más pozos de inyección hacia uno o más pozos de producción y pasar por alto, de este modo, otras porciones del yacimiento. La eficacia de barrido deficiente puede deberse, por ejemplo, a diferencias en la movilidad del agua en comparación con la movilidad del

petróleo, así como a variaciones en la permeabilidad dentro del yacimiento que promueven el flujo a través de algunas porciones del yacimiento y no a través de otras.

El término “cultivo puro” significa un cultivo derivado de un aislado de una sola célula de una especie microbiana. Los cultivos puros específicamente mencionados en la presente descripción incluyen los que se encuentran disponibles públicamente en un depósito y los que se identifican en la presente descripción.

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

El término “biopelícula obturadora” significa una biopelícula que tiene la capacidad de alterar la permeabilidad de un material poroso y retardar, de este modo, el movimiento de un fluido a través de un material poroso que está asociado con la biopelícula.

Los términos “nitratos simples” y “nitritos simples” se refieren a nitrato (NO_3^-) y nitrito (NO_2^-), respectivamente,

cuando aparecen en sales iónicas, tales como nitrato de potasio.

El término “agua de inyección” se refiere al fluido inyectado en yacimientos de petróleo para la recuperación secundaria de petróleo. El agua de inyección puede suministrarse desde cualquier fuente adecuada y puede incluir, por ejemplo, agua de mar, salmuera, agua de producción, agua recuperada de un acuífero subterráneo, que incluyen los acuíferos en contacto con el petróleo, o agua de la superficie de un arroyo, río, lago o laguna. Como se conoce en la técnica, puede ser necesario eliminar el material particulado que incluye polvo, trozos de roca o arena y subproductos de corrosión, tales como óxido del agua, antes de la inyección en uno o más orificios de pozos. Los métodos para eliminar este material particulado incluyen filtración, sedimentación y centrifugación.

El término “agua de producción” significa agua recuperada de los fluidos de producción extraídos de un yacimiento de petróleo. Los fluidos de producción contienen tanto agua usada en la recuperación secundaria de petróleo como petróleo crudo producido a partir del yacimiento de petróleo.

El término “inocular un pozo de petróleo” significa inyectar uno o más microorganismos o poblaciones microbianas o un consorcio microbiano en un pozo petrolero o yacimiento

de petróleo de manera que los microorganismos se suministren al pozo o yacimiento sin pérdida de viabilidad.

Los términos “tipificación filogenética”, “cartografía filogenética” o “clasificación filogenética” pueden usarse intercambiablemente en la presente descripción y se refieren a una forma de clasificación en la que los microorganismos se agrupan según su linaje genético evolutivo. La tipificación filogenética de la presente descripción es de cepas de microorganismos aislados de muestras ambientales y está basada en secuencias del gen que codifica el ARN ribosómico (ARNr) 16S (ADNr).

El término “regiones hipervariables”, como se usa en la presente descripción, se refiere a regiones de secuencias en el gen del ARNr 16S, en donde la secuencia de nucleótidos es muy variable. En la mayoría de los microbios, la secuencia del ADNr 16S consiste en nueve regiones hipervariables que demuestran una diversidad considerable de secuencias entre géneros y especies diferentes de bacterias y que pueden usarse para identificar el género y la especie.

El término “secuencias distintivas”, como se usa en la presente descripción, se refiere a nucleótidos específicos en posiciones específicas (posiciones distintivas) del gen que codifica el ARNr 16S (ADNr) que aparecen, usualmente, dentro de las regiones hipervariables, que son distintivas

para microorganismos en niveles diferentes. En las posiciones distintivas, los nucleótidos distintivos entre especies pueden ser una o más sustituciones, inserciones o deleciones de bases específicas. Tomadas en conjunto, las secuencias distintivas del ADNr 16S son útiles para describir microbios en el nivel de especies, cepas o aislados y pueden usarse para identificar un microbio.

El término “posición de base degenerada o degeneración” se refiere al caso en el que más de un nucleótido (A, G, C, o T) es posible en una posición particular en una secuencia. Una posición es un sitio “dos veces degenerado” si solo dos de cuatro nucleótidos posibles pueden estar en esa posición. Una posición es un sitio “tres veces degenerado” si tres de cuatro nucleótidos posibles pueden estar en esa posición. Una posición es un sitio “cuatro veces degenerado” si los cuatro nucleótidos pueden estar en esa posición.

El término “secuencia distintiva degenerada” se refiere a una secuencia distintiva que puede tener una o más posiciones posibles de bases degeneradas en la secuencia distintiva.

El término “filogenética” se refiere al campo de la biología que trata con la identificación y comprensión de las relaciones evolutivas entre organismos y, particularmente, la filogenética molecular usa las homologías de secuencias del ADN en este análisis. Particularmente, las similitudes o

diferencias en las secuencias del ADNr 16S, que incluyen secuencias distintivas, identificadas al usar algoritmos de similitud sirven para definir relaciones filogenéticas.

El término “árbol filogenético” se refiere a un diagrama ramificado que representa las relaciones evolutivas entre organismos. El árbol filogenético de la presente descripción está basado en las homologías de secuencias del ADN de los ADNr 16S, que incluyen las secuencias distintivas en el ADNr 16S, y muestra relaciones de las presentes cepas con cepas y especies relacionadas.

El término “clado filogenético” o “clado” se refiere a una rama en un árbol filogenético. Un clado incluye todos los organismos relacionados que se localizan en la rama, según el punto de la rama que se seleccione.

El término “genomovar” se usa para describir una clasificación de subespecies que se usa cuando un grupo de cepas de una especie puede diferenciarse por la secuencia del ADN, pero no puede distinguirse fenotípicamente. Los genomovares se definen e identifican por hibridación de ADN-ADN y/o por secuencias distintivas del ADNr 16S. Esta terminología ha sido usada para describir *Pseudomonas stutzeri* por Bennasar et al. ((1996) Int. J. of Syst. Bacteriol.46:200-205).

El término “ribotipificación” significa obtener la huella dactilar de los fragmentos de restricción del ADN genómico que

contienen la totalidad o parte de los genes que codifican para los ARN ribosómicos 16S y 23S. La ribotipificación se realiza por medio del uso del sistema RIBOPRINTER® de DuPont.

El término "RIBOPRINT™" se refiere a la huella dactilar genómica única de un aislado o cepa microbiana específica generada con el sistema RIBOPRINTER® de DuPont.

El término "cepa tipo" se refiere a la cepa de referencia para una especie particular, cuya descripción se usa para definir y caracterizar una especie particular.

El término "programa de análisis de secuencias" se refiere a cualquier programa informático o algoritmo computacional que sea útil para el análisis de secuencias de nucleótidos o de aminoácidos. El "programa de análisis de secuencias" puede estar disponible comercialmente o desarrollado de manera independiente. Los programas informáticos típicos para análisis de secuencias incluyen, pero no se limitan a: el conjunto de programas GCG (Wisconsin Package, Versión 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI), BLASTP, BLASTN, BLASTX (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.1990), DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, WI), y el programa FASTA que incorpora el algoritmo de Smith-Waterman (Pearson, W. R., *Comput. Methods Genome Res.*, Proc. Int. Symp, Meeting Date 1992, 111-120, Eds: Suhai, Sandor, Plenum Publishing, New York, NY, 1994). En el contexto de

esta solicitud, se entenderá que cuando el análisis se realiza con un programa de análisis de secuencias, los resultados del análisis estarán basados en los "valores predeterminados" del programa que se use, a menos que se especifique de cualquier otra forma. Como se usa en la presente descripción, "valor predeterminado" significa cualquier conjunto de valores o parámetros que se cargan originalmente con el programa la primera vez que se inicia.

El término "aceptor de electrones" se refiere a un compuesto que recibe o acepta uno o más electrones durante la respiración celular. Los microorganismos obtienen energía para crecer al transferir electrones de un "donante de electrones" a un aceptor de electrones. Durante este proceso, el aceptor de electrones se reduce y el donante de electrones se oxida. Los ejemplos de aceptores de electrones incluyen oxígeno, nitrato, fumarato, hierro (III), manganeso (IV), sulfato y dióxido de carbono. Los azúcares, ácidos orgánicos de peso molecular bajo, carbohidratos, ácidos grasos, el hidrógeno, y el petróleo crudo o sus componentes, tales como hidrocarburos de petróleo o hidrocarburos aromáticos policíclicos, son ejemplos de compuestos que pueden actuar como donantes de electrones.

"Darcy" es una unidad de permeabilidad. Un medio con una permeabilidad de 1 darcy permite un flujo de 1 cm^3/s de un fluido con una viscosidad de 1 cP (1 mPa·s) con un gradiente

de presión de 0,1 Mpa/cm (1 atm/cm) que actúa a través de un área de 1 cm^2. Un milidarcy (mD) es igual a 0,001 darcy.

Microorganismos aislados

Los microorganismos capaces de crecer en interfases de agua/petróleo en condiciones desnitrificantes se aislaron de aguas de producción y de inyección del Pozo núm. 1 que se ubica en el campo Senlac en la frontera de las provincias de Saskatchewan y Alberta en Canadá central. El Pozo núm. 1 tiene una salinidad de entre 30-35 partes por mil (ppt, por sus siglas en inglés) tanto en aguas de producción como de inyección, lo cual es equivalente a la salinidad del agua de mar. El proceso de aislamiento incluyó enriquecer el crecimiento de microorganismos mediante el uso de lactato como fuente de carbono y nitrato como aceptor de electrones.

Los microorganismos aislados se clasificaron por análisis de sus secuencias de ADN ribosómico 16S (ADNr) y por la huella dactilar de sus fragmentos de restricción del ADN genómico que contienen la totalidad o parte de los genes que codifican para los ARN ribosómicos 16S y 23S (ARNr; ribotipificación). Se identificaron dos cepas aisladas como cepas nuevas de *Pseudomonas stutzeri*.

En la presente descripción, los microorganismos que pertenecen a la especie *Pseudomonas stutzeri* se identificaron por secuencias distintivas halladas en sus ADNr 16S, que están presentes en la secuencia consenso degenerada para el

ADNr 16S de *Pseudomonas stutzeri* (sec. con núm. de ident.:8). Como se describe en el Ejemplo 3 de la presente descripción, las posiciones específicas en la secuencia del ADNr 16S se identifican en la presente descripción por tener nucleótidos que son característicos para *Pseudomonas stutzeri*, que pueden ser fijos o tener alguna degeneración, como se presenta en la Tabla 5. El conjunto (todas las posiciones juntas) de secuencias distintivas para *Pseudomonas stutzeri* que se presenta en la Tabla 5 difiere de cada conjunto de secuencias distintivas para las especies estrechamente relacionadas *Pseudomonas balearica*, *Pseudomonas nitroreducens* y *Pseudomonas agarici*, que se presenta, además, en la Tabla 5. La secuencia consenso dominante (más preponderante) del ADNr 16S de *Pseudomonas stutzeri* (que puede no ser de longitud completa), se proporciona como sec. con núm. de ident.:7. La secuencia consenso del ADNr 16S de *Pseudomonas stutzeri* (que puede no ser de longitud completa), que incluye degeneración, se proporciona como sec. con núm. de ident.:8. Los microorganismos que pertenecen a la especie *Pseudomonas stutzeri*, como se usan en la presente descripción, pueden identificarse por tener la secuencia consenso degenerada para el ADNr 16S de *Pseudomonas stutzeri* (sec. con núm. de ident.:8). Las secuencias del ADNr 16S de las dos cepas aisladas identificadas en la presente descripción tienen la secuencia consenso degenerada del ADNr 16S de *Pseudomonas* de

sec. con núm. de ident.:8 que incluye las secuencias distintivas identificadas en la presente descripción, lo que confirma su identidad como cepas de *Pseudomonas stutzeri*.

En una modalidad, es la cepa BR5311 de *Pseudomonas stutzeri* depositada en ATCC, conforme el tratado de Budapest, como ATCC PTA-11283. El gen del ARNr 16S (ADNr) secuenciado de la cepa BR5311 (sec. con núm. de ident.:5) tiene las secuencias distintivas, enumeradas en la Tabla 5, que son iguales a las secuencias distintivas consenso degeneradas de *Pseudomonas stutzeri* que se describieron anteriormente y se presentan en la Tabla 5. La secuencia del ADNr 16S de BR5311 tiene identidades de secuencia de entre 97,9 % y 99,9 % con secuencias del ADNr 16S de otras cepas conocidas de *Pseudomonas stutzeri* con sec. con núms. de ident.:13-25. Como se muestra en un árbol filogenético (Figura 1) descrito en el Ejemplo 3 en la presente descripción y preparado por alineamiento de secuencias del ADNr 16S de longitud casi completa de cepas representativas de *Pseudomonas stutzeri* y otras *Pseudomonads* (sec. con núms. de ident.:10 -37) con el alineamiento Clustal W, árbol filogenético y funciones de prueba de inicio del programa MegAlign del paquete de programas LaserGene de DNAstar (DNASTAR, Inc Madison, WI), según las secuencias del ADNr 16S, BR5311 es la más estrechamente relacionada con las siguientes cepas de *Pseudomonas stutzeri*: LH4:15 (núm. ATCC: PTA-8823; publicación de patente de los Estados Unidos núm. 20090263887;

ADNr 16S, sec. con núm. de ident.:12), DSM 50227 (ADNr 16S, sec. con núm. de ident.:13), y AN10 (ADNr 16S, sec. con núm. de ident.:14). Las cuatro cepas son miembros del agrupamiento filogenético conocido como genomovar 3 de *Pseudomonas stutzeri* (g3, Figura 1). El genomovar 3 incluye estas cepas mencionadas, así como cualquier otra cepa que se coloque en el mismo agrupamiento con estas cepas al usar el análisis filogenético como se describe en el Ejemplo 3 de la presente descripción.

Hay un nucleótido de diferencia entre los genes del ARNr 16S secuenciados de las cepas LH4:15 (sec. con núm. de ident.:44) y BR5311 (sec. con núm. de ident.:5), que está en la posición 265, como se presenta en la Tabla 5. LH4:15 se aisló de un pozo de petróleo de una zona mesotérmica en Alaska. BR5311 difiere fenotípicamente de LH4:15 en la capacidad para hidrolizar almidón y crecer en etilenglicol, según lo demostrado en la presente descripción en el Ejemplo 5. Adicionalmente, la ribotipificación de BR5311, en el Ejemplo 4 de la presente descripción, mostró que esta cepa tenía un patrón de RiboPrint™ diferente según lo comparado con otras cepas conocidas de *Pseudomonas stutzeri* sometidas a prueba: LH4:15, DSM 50227, KC (ATCC 55595), Zobell (ATCC 14405), ATCC 17588, y DSM 6082. Así, el análisis genómico y fenotípico de la presente descripción para BR5311 identificó esta cepa como una nueva cepa de *Pseudomonas stutzeri*.

En otra modalidad, es la cepa 89AC1-3 de *Pseudomonas stutzeri* depositada en ATCC, conforme el tratado de Budapest, como ATCC PTA-11284. El ADNr 16S secuenciado de la cepa 89AC1-3 (sec. con núm. de ident.:6) tiene secuencias distintivas, presentadas en la Tabla 5, que son iguales a las secuencias distintivas consenso degeneradas de *Pseudomonas stutzeri* que se describieron anteriormente y se presentan en la Tabla 5. En el árbol filogenético descrito anteriormente en la Figura 1, 89AC1-3 se relaciona más estrechamente con las siguientes cepas de *Pseudomonas stutzeri*: A1501 (ADNr 16S, sec. con núm. de ident.:18), ATCC 17588 (ADNr 16S, sec. con núm. de ident.:17), y CCUG11256 (ADNr 16S, sec. con núm. de ident.:25). El ADNr 16S secuenciado de 89AC1-3 tiene identidades de secuencia de entre 98,2 % y 100 % con las secuencias del ADNr 16S de otras cepas conocidas de *Pseudomonas stutzeri* con sec. con núms. de ident.:13-25. Si bien la identidad de secuencia es del 100 % entre las secuencias del ADNr 16S de las cepas 89AC1-3 y ATCC 17588, los patrones RiboPrint™ para estas dos cepas son diferentes, como se muestra en la Figura 2, lo que indica diferencias en el ADN genómico entre las dos cepas. Adicionalmente, el patrón RiboPrint™ de 89AC1-3 es diferente a los patrones de otras cepas conocidas de *Pseudomonas stutzeri* sometidas a prueba: LH4:15, DSM 50227, KC (ATCC 55595), Zobell (ATCC 14405), y DSM 6082. Así, el análisis genómico de la presente descripción

para 89AC1-3 identificó esta cepa como una nueva cepa de *Pseudomonas stutzeri*. Las cepas 89AC1-3 y ATCC 17588 son miembros del grupo filogenético conocido como genomovar 1 de *Pseudomonas stutzeri* (g1, Figura 1), que incluye, además, las cepas CCUG11256 y A1501, como se muestra en el diagrama de la Figura 1. El genomovar 1 incluye estas cepas mencionadas, así como cualquier otra cepa que se coloque en el mismo agrupamiento con estas cepas al usar el análisis filogenético, como se describe en el Ejemplo 3 de la presente descripción.

Como se muestra en los ejemplos de la presente descripción, se comprobó que las cepas BR5311 y 89AC1-3 de *Pseudomonas stutzeri* tienen propiedades que indican su capacidad para mejorar la recuperación de petróleo al crecer para formar biopelículas obturadoras. BR5311 creció en presencia de petróleo y demostró ser particularmente útil en condiciones de salinidad alta, al crecer bien en medios con salinidad de agua de mar (por ejemplo, 34 partes por mil (ppt) y de salinidad más alta (por ejemplo, una salinidad de 67 ppt) en condiciones anaerobias desnitrificantes. En condiciones de salinidad muy altas (por ejemplo, 67-70 ppt, usadas en los Ejemplos 7 y 9), BR5311 fue capaz de obturar filtros de vidrio al usar acetato como fuente de carbono en condiciones anaerobias desnitrificantes. En medio de salinidad baja (por ejemplo, 20 ppt, usado en el Ejemplo 8), BR5311 fue capaz de obturar filtros de vidrio al usar o bien acetato o lactato como

fuente de carbono en condiciones anaerobias desnitrificantes. La cepa 89AC1-3 fue capaz de obturar filtros de vidrio en condiciones de salinidad alta (por ejemplo, 35 ppt, usadas en el Ejemplo 10) al usar o bien acetato o lactato como fuente de carbono en condiciones anaerobias desnitrificantes. Adicionalmente, se demostró que la cepa 89AC1-3 aglomera granos de sílice cristalina en medio de salinidad alta (35 ppt) en condiciones anaerobias desnitrificantes al usar o bien lactato o acetato como fuente de carbono.

Además, se demostró que la cepa BR5311 reduce la permeabilidad de tubos llenos de arena y sílice que tienen una permeabilidad inicial alta de aproximadamente 1 darcy. La presión incrementada en los tubos se produjo en condiciones desnitrificantes de salinidad alta al usar condiciones de alimentación continua o discontinua.

Estas propiedades de las cepas aisladas BR5311 y 89AC1-3 de *Pseudomonas stutzeri* demuestran su uso para formar biopelículas y obturar zonas hiperpermeables en la arena o roca permeable de yacimientos de petróleo. Obturar las zonas hiperpermeables puede volver a dirigir el agua hacia áreas más ricas en petróleo que son menos permeables y mejorar, de este modo, la eficacia de barrido e incrementar la recuperación de petróleo.

Composiciones que mejoran la recuperación de petróleo

Las cepas BR5311 (ATCC PTA-11283) y 89AC1-3 (ATCC PTA-11284) de *Pseudomonas stutzeri* descritas anteriormente pueden incluirse como componentes en composiciones que mejoran la recuperación de petróleo, que son una modalidad de la presente invención. Las dos cepas pueden estar, cada una, en composiciones separadas que mejoran la recuperación de petróleo, o las dos cepas pueden combinarse en la misma composición.

Adicionalmente a una o ambas cepas, BR5311 y 89AC1-3, la presente composición que mejora la recuperación de petróleo incluye uno o más aceptores de electrones y por lo menos una fuente de carbono. En una modalidad, el aceptor de electrones es nitrato. El nitrato se reduce a nitrito y/o a nitrógeno durante el crecimiento de las cepas BR5311 y 89AC1-3. El nitrito puede servir, además, de aceptor de electrones en la composición. En varias modalidades, el aceptor de electrones es una o más sales iónicas de nitrato, una o más sales iónicas de nitrito o cualquier combinación de sales iónicas de nitrato y nitrito.

La fuente de carbono puede ser un compuesto simple o complejo que contiene carbono. La fuente de carbono puede ser una materia orgánica compleja, tal como peptona, licor de maceración del maíz o extracto de levadura. En otra

modalidad, la fuente de carbono es un compuesto simple, tal como succinato, acetato o lactato.

Las composiciones que mejoran la recuperación de petróleo pueden incluir componentes adicionales que promueven el crecimiento y/o formación de biopelículas a través de las cepas microbianas de la composición. Estos componentes pueden incluir, por ejemplo, vitaminas, metales traza, sales, nitrógeno, fósforo, magnesio, sustancias químicas como soluciones tampón, y/o extracto de levadura.

En una modalidad, las composiciones que mejoran la recuperación de petróleo incluyen uno o más microorganismos adicionales que crecen en presencia de petróleo. Los microorganismos pueden usar un componente de petróleo como fuente de carbono o, cuando se usa una fuente de carbono alternativa, su crecimiento no se inhibe en presencia de petróleo. Son particularmente útiles otros microorganismos que tienen propiedades que mejoran la recuperación de petróleo, tales como microorganismos que forman biopelículas o que liberan petróleo de las superficies. En una modalidad, un microorganismo adicional en la presente composición es un microorganismos de la especie *Shewanella*. *Shewanella* es un género bacteriano establecido, en parte, a través de la clasificación filogenética por ADNr y se describe detalladamente en la literatura (ver, por ejemplo, Fredrickson et al., Towards Environmental Systems Biology Of Shewanella,

Nature Reviews Microbiology (2008), 6(8), 592-603; Hau et al., Ecology And Biotechnology Of The Genus Shewanella, Annual Review of Microbiology (2007), 61, 237-258).

Hay al menos aproximadamente 89 % de identidad de secuencia de secuencias del ADNr 16S entre especies *Shewanella*. Las especies *Shewanella* tienen el ADNr 16S que tiene las secuencias distintivas de las regiones hipervariables 2 (las sec. con núms. de ident.:38 y 39 son secuencias dominantes y degeneradas, respectivamente), 5 (las sec. con núms. de ident.:40 y 41 son secuencias dominantes y degeneradas, respectivamente) y 8 (las sec. con núms. de ident.: 42 y 43 son secuencias dominantes y degeneradas, respectivamente) como se muestra en la Figura 3. La combinación de las secuencias distintivas degeneradas para cada región define especies *Shewanella* que incluyen algunas variaciones de posición, como se muestra en la Figura 3. Así, las *Shewanella sp.* útiles en la presente invención son las que comprenden dentro del ADNr 16S las secuencias distintivas degeneradas como se expone en las sec. con núms. de ident.:39, 41 y 43. En una modalidad, las *Shewanella sp.* útiles en la presente invención son las que comprenden dentro del ADNr 16S las secuencias distintivas dominantes, como se expone en las sec. con núms. de ident.:38, 40 y 42.

Las secuencias distintivas dominantes en la Figura 3 son aquellas con las posiciones variables designadas como

los nucleótidos encontrados más frecuentemente en la especie *Shewanella*. Las *Shewanella* son proteobacterias gamma gram negativas que tienen la capacidad de reducir metales y son capaces de reducir, adicionalmente, una amplia variedad de aceptores terminales de electrones. Estos microorganismos obtienen energía para soportar el crecimiento anaerobio al acoplar la oxidación de H_2 o materia orgánica a la reducción de una variedad de metales multivalentes, lo que conduce a la precipitación, transformación o disolución de minerales.

La capacidad de la especie *Shewanella* para alterar la humectabilidad de una superficie recubierta con hidrocarburos que conduce a la recuperación mejorada de petróleo se describe en la publicación de la solicitud de patente copendiente y de propiedad mancomunada de los Estados Unidos núm. 2011/0030956, que se incorpora en la presente descripción como referencia. En una modalidad, un microorganismo adicional es *Shewanella putrefaciens, Shewanella sp,* LH4:18 (núm. ATCC: PTA-8822; descrita en la patente de propiedad mancomunada de los Estados Unidos núm. 7,776.795 o *Shewanella sp* L3:3 (núm. ATCC: PTA-10980; descrita en la publicación de solicitud de patente copendiente y de propiedad mancomunada de los Estados Unidos núm. 2011/0030956).

Métodos para mejorar la recuperación de petróleo

Las presentes composiciones que mejoran la recuperación de petróleo pueden usarse para inocular un yacimiento de

petróleo con el fin de mejorar la recuperación de petróleo. Adicionalmente, las composiciones que incluyen por lo menos una cepa de *Pseudomonas stutzeri* y un medio mínimo de crecimiento que incluye por lo menos un aceptor de electrones pueden usarse para inocular un yacimiento de petróleo y mejorar la recuperación de petróleo. Típicamente, se usa una o más sales iónicas de nitrato y/o nitrito como aceptor de electrones. La cepa de *Pseudomonas stutzeri* en la composición incluye células viables que se reproducen y crecen en el yacimiento de petróleo.

Un medio mínimo de crecimiento incluye por lo menos una fuente de carbono y puede incluir otros componentes, tales como vitaminas, metales traza, sales, nitrógeno, fósforo, magnesio y sustancias químicas como soluciones tampón. La fuente de carbono puede ser un compuesto simple o complejo que contiene carbono, por ejemplo, 1) petróleo o un componente de petróleo, 2) materia orgánica compleja, tal como peptona, licor de maceración del maíz o extracto de levadura; o 3) compuestos simples, tales como succinato, acetato o lactato.

Puede usarse cualquier cepa de *Pseudomonas stutzeri* que forme biopelículas obturadoras en condiciones anaerobias desnitrificantes en presencia de aceite de petróleo. La *Pseudomonas stutzeri* pertenece a una categoría amplia de bacterias desnitrificantes y se encuentra en, y puede adaptarse a, muchos ambientes. Las cepas de microorganismos que son

Pseudomonas stutzeri que pueden usarse en los presentes métodos pueden identificarse por sus secuencias del ADNr 16S, que tienen las secuencias distintivas descritas anteriormente y que se presentan en la Tabla 5. En una modalidad, las cepas de *Pseudomonas stutzeri* usadas en los presentes métodos son las que tienen la secuencia del ADNr 16S de sec. con núm. de ident.:8, como se describió anteriormente. En otra modalidad, las cepas de *Pseudomonas stutzeri* usadas en los presentes métodos son las que pertenecen al genomovar 1 o 3, como se describió anteriormente. En aún otra modalidad, las cepas de *Pseudomonas stutzeri* usadas en los presentes métodos son cualquiera de BR5311 (núm. ATCC: PTA-11283), 89AC1-3 (núm. ATCC: PTA-11284), y LH4:15 (núm. ATCC: PTA-8823).

Adicionalmente, las cepas de *Pseudomonas stutzeri* útiles en los presentes métodos pueden ser identificadas por una persona con experiencia en la técnica mediante ensayos de formación de biopelículas, aglomeración de sílice y/o reducción de permeabilidad, tales como los descritos en los ejemplos de la presente descripción. Como ejemplos de cepas de *Pseudomonas stutzeri* capaces de formar biopelículas obturadoras, se demuestran estas propiedades de las cepas LH4:15 (núm. ATCC: PTA-8823), BR5311 (ATCC PTA-11283), y AC1-3 (ATCC PTA-11284) en la presente descripción. En una modalidad, cualquiera de estas cepas se usan en los presentes métodos. En una modalidad, la

cepa LH4:15 de *Pseudomonas stutzeri* no está incluida en las cepas de *Pseudomonas stutzeri* usadas en los presentes métodos.

En otra modalidad, uno o más microorganismos además de las cepas de *Pseudomonas stutzeri*, que crecen en presencia de petróleo en condiciones desnitrificantes, se incluyen en una composición usada en el presente método. Los microorganismos de la especie *Shewanella*, que se describieron anteriormente, son particularmente útiles.

En ciertos yacimientos de petróleo que tienen propiedades específicas, puede ser más adecuado usar cepas específicas de *Pseudomonas stutzeri* en los presentes métodos. Por ejemplo, en yacimientos de petróleo en donde por lo menos un fluido, tal como agua de inyección y/o agua de producción, tiene una concentración alta de sal, las cepas de *Pseudomonas stutzeri* que crecen y forman biopelículas obturadoras en medios de salinidad alta son particularmente adecuadas. Específicamente, las cepas de *Pseudomonas stutzeri* BR5311 (núm. ATCC: PTA-11283) y 89AC1-3 (núm. ATCC: PTA-11284) son particularmente adecuadas para yacimientos de petróleo con por lo menos un fluido que tiene salinidad alta, particularmente, una concentración de sal de aproximadamente 30 ppt o mayor.

Los yacimientos de petróleo pueden inocularse con composiciones que incluyen *Pseudomonas stutzeri* y un medio mínimo de crecimiento al usar cualquier método de introducción conocido para una persona con experiencia en la técnica.

Típicamente, la inoculación es por inyección de una composición en un yacimiento de petróleo. Los métodos de inyección son comunes y muy conocidos en la técnica, y puede usarse cualquier método adecuado (ver, por ejemplo, Nontechnical guide to petroleum geology, exploration, drilling, and production, 2.° edición. N. J. Hyne, PennWell Corp. Tulsa, OK, EE. UU., Freethey, G.W., Naftz, D.L., Rowland, R.C., &Davis, J.A. (2002); Deep aquifer remediation tools: Theory, design, and performance modeling, In: D.L. Naftz, S.J. Morrison, J.A. Davis, & C.C. Fuller (Eds.); y Handbook of groundwater remediation using permeable reactive barriers (págs. 133–161), Amsterdam: Academic Press). La inyección es, típicamente, a través de uno o más pozos de inyección, que están en comunicación subterránea con uno o más pozos de producción de los cuales se recupera el petróleo.

Recuperación mejorada de petróleo de un yacimiento de petróleo

En este contexto, la recuperación mejorada de petróleo puede incluir la recuperación secundaria o terciaria de hidrocarburos de petróleo de formaciones subterráneas. Específicamente, se recuperan hidrocarburos que no se recuperan fácilmente de un pozo de producción por inundación con agua u otras técnicas tradicionales de recuperación secundaria de petróleo.

Los métodos de recuperación primaria de petróleo, que usan solo las fuerzas naturales presentes en un yacimiento de

petróleo, obtienen, típicamente, solo una porción menor del petróleo original en los estratos que tienen petróleo de un yacimiento petrolero. Los métodos secundarios de recuperación de petróleo, tales como la inundación con agua, pueden mejorarse al usar métodos de la presente descripción que proporcionan microorganismos y medios de crecimiento para formación de biopelículas obturadoras en áreas de formaciones subterráneas en donde hay variaciones altas en la permeabilidad. La obturación con películas de las regiones sumamente permeables de un yacimiento redirige el agua usada en la inundación hacia áreas más ricas en petróleo que son menos permeables. Así, la recuperación mejorada de petróleo se obtiene, particularmente, de yacimientos de petróleo en donde la eficacia de barrido es baja debido a, por ejemplo, la intercalación en el estrato que tiene petróleo de capas rocosas que tienen una permeabilidad sustancialmente más alta en comparación con el resto de las capas rocosas. Las capas de permeabilidad más alta canalizarán el agua y evitarán que el agua penetre en otras partes del estrato que tiene petróleo. La formación de biopelículas obturadoras por parte de microorganismos reducirá esta canalización.

EJEMPLOS

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 ejemplos, una persona con experiencia en la técnica podrá determinar las características esenciales de esta invención y, sin apartarse del espíritu ni del alcance de ella, podrá introducir varios cambios y modificaciones en la invención para adaptarla a diversos usos y condiciones.

Métodos generales

Los significados de las abreviaturas usadas en esta solicitud son los siguientes: “h” significa hora(s), “min” significa minuto(s), “día” significa día(s), “ml” significa mililitro(s), “mg/ml” significa miligramo(s) por mililitro, “l” significa litro(s), “µl” significa microlitro(s), “mM” significa milimolar, “µM” significa micromolar, “nM” significa nano molar, “µg/l” significa microgramo(s) por litro, “pmol” significa picomol(es), “°C” significa grados centígrados, “°F” significa grados Fahrenheit, “pb” significa par(es) de bases, “mm” significa mililitro(s), “ppm” significa partes por millón, “g/l” significa gramo(s) por litro, “ml/min” significa mililitro(s) por minuto, “ml/h” significa mililitro(s) por hora, “ufc/ml” significa unidades formadoras de colonias por mililitro, “g” significa gramo(s), “mg/l” significa miligramo(s) por litro, “Kev” significa kilo

o miles de voltios eléctricos, “psi” significa libras (de fuerza) por pulgada cuadrada, “LB” significa medio de cultivo caldo Luria, “rpm” significa revoluciones por minuto, “ppt” es partes por mil, “ppm” es partes por millón, “DO600” significa densidad óptica a 600 nanómetros (nm), “IC” es cromatografía iónica, “MPN” es número más probable.

Crecimiento de microorganismos

Las técnicas de crecimiento y mantenimiento de cultivos anaerobios se describen en “Isolation of Biotechnological Organisms from Nature”, (Labeda, D. P. ed. 117-140, McGraw-Hill Publishers, 1990). El crecimiento anaerobio se mide por el agotamiento de nitrato del medio de crecimiento en el tiempo. El nitrato se usa como aceptor de electrones primario en las condiciones de crecimiento usadas en la presente descripción. La reducción de nitrato a nitrógeno se ha descrito anteriormente (Moreno-Vivian, C., et al., *J. Bacteriol.*, 181, 6573 – 6584, 1999). En algunos casos, los procesos de reducción de nitrato conducen a la acumulación de nitrito, que se reduce posteriormente aún más en nitrógeno. Por lo tanto, se considera que la acumulación de nitritos es, además, una prueba del metabolismo y crecimiento activo de microorganismos.

Medios comprados

Medio LB de Miller (MediTech, Inc, Manassas, VA)

Determinación del título de células viables (número más probable)

Con el fin de determinar el título de células viables, las muestras de cultivos o tubos delgados se diluyeron por dilución en serie de 1:10 en 8 filas por muestra de una placa de 96 pocillos con caldo Luria estándar o caldo Luria de Miller con la adición de 3,5 % de NaCl. La titulación se realizó con un pipetor robótico automatizado Biomek 2000. El crecimiento se determinó por turbidez visual y se registró para cada una de las 8 filas. Se usó el algoritmo del número más probable de Cochran (Biometrics (1950) 6:105-116) para determinar las células/ml viables y los límites de confianza de 95 % para este número en la muestra original.

Se usó la siembra en placas con el método de dilución en serie para determinar la titulación bacteriana de estos cultivos. Una serie de diluciones de 1:10 de estas muestras se sembró en placas, y se realizó el recuento de las colonias resultantes. Después, el número de colonias en una placa se multiplicó por el factor de dilución (el número de veces que se realizó la dilución de 1:10) para esa placa para obtener el recuento bacteriano en la muestra original.

Cromatografía iónica

Para cuantificar los iones de nitrato y nitrito en medios acuosos, se usó una unidad cromatográfica ICS2000 (Dionex, Banockburn, IL). Se realizó el intercambio iónico

en una columna de intercambio aniónico AS15 con un gradiente de 2 a 50 mM de hidróxido de potasio. Se generaron curvas estándar con las cantidades conocidas de las soluciones de nitrito de sodio o nitrato de sodio y se usaron para calibrar las concentraciones de nitratos y nitritos.

Muestras de aguas de inyección y de producción de yacimientos de petróleo

En este estudio, se tomaron muestras de dos sistemas de pozos de petróleo: El Pozo núm. 1 se localizó en el campo Senlac en la frontera de las provincias de Saskatchewan y Alberta, Canadá. El Pozo núm. 1 tiene una salinidad de 30-35 ppt tanto en aguas de inyección como de producción, que es la salinidad del agua de mar. 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 de mar, que está en el intervalo de 65 ppt. Se obtuvieron muestras de agua de cabezas de pozos de inyección y de producción como líquidos combinados de petróleo/agua en botellas de vidrio color café de 1,0 l, llenas hasta arriba, tapadas y selladas con cinta para evitar la fuga de gas. El gas de procesos inherentes anaerobios fue suficiente para mantener las condiciones anaerobias durante el transporte. Las botellas se transportaron en enfriadores plásticos grandes llenos de bloques de hielo hacia las instalaciones de prueba dentro de las 48 horas de tomadas las muestras.

Determinación del total de sales disueltas (salinidad) por refractómetro

El total de sales disueltas se determinó por medio del uso de un refractómetro manual (Modelo RHS 10ATC, Huake Instrument Co., Ltd, Shenzhen, China).

Preparación del ADN para análisis de secuencias

Se aisló el ADN genómico de colonias bacterianas al diluir colonias bacterianas en 50 µl de agua o solución tampón Tris-HCL con un pH de 7-8. Se amplificaron los ADN de las colonias diluidas con ADN polimerasa Phi 29 antes de la secuenciación (GenomiPHI Amplification Kit GE Life Sciences, New Brunswick, NJ). Se adicionó una alícuota (1,0 µl) de una colonia diluida a 9,0 µl del reactivo de Lysis (del kit de amplificación GenomiPHI) y se calentó a 95 °C durante 3 min seguido de enfriamiento inmediato a 4 °C. Se agregó 9,0 µl de la solución tampón de enzimas y 1,0 µl de la enzima Phi 29 a cada muestra lisada y, después, se incubó a 30 °C por 18 h. La polimerasa se inactivó por calentamiento a 65 °C durante 10 min seguido de enfriamiento a 4 °C.

Análisis de secuencias de ADN

Las reacciones de secuenciación de ADN se prepararon de la siguiente manera: Se agregó 8,0 µl de la muestra amplificada con GenomiPHI a 8,0 µl de reactivo de secuenciación BigDye v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) seguido de 3,0 µl de 10 µM de iniciadores de sec. con

núms. de ident.:1, 2, 3 o 4 (preparados por Sigma Genosys, Woodlands, TX), 4,0 µl de solución tampón BigDye, dilución 5X, (Applied Biosystems) y 17 µl de agua grado biología molecular (Mediatech, Inc., Herndon, VA).

Las reacciones de secuenciación se sometieron a calentamiento durante 3,0 min a 96 °C seguido de 200 termociclos (de 95 °C por 30 s; 55 °C por 20 s; 60 °C por 2 min) y se almacenaron a 4 °C. Los dNTP no incorporados se eliminaron con placas de depuración Edge Biosystems (Gaithersburg, MD). Las reacciones amplificadas se pipetearon en un pocillo de una placa de depuración de 96 pocillos previamente centrifugada. La placa se centrifugó durante 5,0 min a 5,000x g en un equipo Sorvall RT-7 (Sorvall, Newtown, CT) a 25 °C. Después, las reacciones depuradas se colocaron directamente sobre un secuenciador de ADN 3730 de Applied Biosystems y se secuenciaron con llamada automática de bases.

Cada una de las secuencias ensambladas del ADNr se comparó con la base de datos de ADNr del NCBI (~260,000 secuencias de ADNr) con el algoritmo de BLAST (Altschul et al., *supra*). El acierto de identidad de secuencia de mayor puntaje se usó como un identificador de la especie conocida más estrechamente relacionada para la identificación de cepas.

Alternativamente, para generar fragmentos amplificados del ADNr de cepas individuales, se seleccionan conjuntos de iniciadores de Grabowski et al. (FEMS Microbiology Ecology,

(2005) 3:427-443). Se seleccionó la combinación de iniciador de sec. con núm. de ident.: 1 e iniciador de sec. con núm. de ident.: 2 para amplificar específicamente las secuencias del ADNr de bacterias.

La mezcla de amplificación para PCR incluyó: solución tampón de PCR, 1,0X, GoTaq (Promega), 0,25 mM de dNTP, 25 pmol de cada iniciador, en un volumen de reacción de 50 µl. Se agregó 0,5 µl de polimerasa GoTaq (Promega) y 1,0 µl (20 ng) del ADN de la muestra. El protocolo de termociclado para la reacción de PCR fue de 5,0 min a 95 °C seguido de 30 ciclos de: 1,5 min a 95 °C, 1,5 min a 53 °C, 2,5 min a 72 °C y una extensión final durante 8 min a 72 °C en un termociclador Perkin Elmer 9600 (Waltham, MA). Los productos de amplificación de 1400 pares de bases se visualizaron sobre geles de agarosa al 1,0 %. La mezcla de reacción de PCR se usó directamente para clonación en el vector pCR -TOPO4 al usar el sistema de clonación TOPO TA (Invitrogen) según las recomendaciones del fabricante. El ADN se transformó en células TOP10 químicamente competentes seleccionadas por su resistencia a la ampicilina. Se seleccionaron colonias individuales (~48-96 colonias) y se cultivaron en placas de microtitulación para análisis de secuencias. La secuenciación de los fragmentos amplificados y la identificación de cepas fue como se describió anteriormente.

Ribotipificación automatizada

Se usó ribotipificación automatizada para la identificación concluyente de cepas seleccionadas con características filogenéticas de secuencias de ARNr 16S similares (Webster, John A (1988), patente de los Estados Unidos núm. 4,717,653; Bruce, J. L. (1996) *Food Technology*, 50:77-81; y Sethi, M. R. (1997) *Am. Lab*. 5: 31-35). La ribotipificación se realizó según las recomendaciones del fabricante (DuPont Qualicon Inc., Wilmington, DE). Para estos análisis, se tomó una colonia nueva, se resuspendió en la solución tampón de la muestra y se adicionó al módulo de procesamiento para la etapa de tratamiento térmico a 80 °C durante 10 min para inhibir las enzimas que degradan el ADN endógeno. Después, se redujo la temperatura y se agregaron dos enzimas líticas (lisostafina y N-acetilmuramidasa; provistas por el fabricante) a la muestra. Después, el portador de muestras se cargó en el sistema Riboprinter™ con los otros reactivos comerciales. Las etapas de digestión con enzimas de restricción del ADN cromosómico de la muestra con la enzima *Eco*RI, electroforesis en gel y transferencia estuvieron totalmente automatizadas. Brevemente, el ADN genómico bacteriano se digirió con la enzima de restricción *Eco*RI y se cargó sobre un gel de agarosa. Los fragmentos de restricción se separaron por electroforesis y se transfirieron simultáneamente a una membrana de nailon. Después de una etapa

de desnaturalización, los ácidos nucleicos se hibridaron con una sonda de ADN sulfonado que alojaba el operón del ARNr de *E. coli*, que incluye genes para las subunidades grandes y pequeñas del ARNr, el gen ARNr 5S y los separadores internos transcritos. La sonda hibridada se detectó por la captura de emisión de luz de un sustrato quimioluminiscente con una cámara con dispositivo de carga acoplada. La salida consistió en una exploración densitométrica de la huella que representa la distribución de los fragmentos de restricción genómicos de *Eco*RI que contienen secuencias de uno o más operones ribosómicos en el genoma, que se separaron electroforéticamente por sus pesos moleculares.

Selección de cepas por su capacidad para formar biopelículas sobre filtros de vidrio sinterizado

Se desarrolló un ensayo para seleccionar las cepas que podían formar biopelículas sobre superficies de sílice y evitar el flujo de agua a través de espacios con poros de ~10 micras (obturación) mediante el uso de filtros de vidrio sinterizado. Los filtros de vidrio sinterizado de 25 mm de grosor promedio (stock núm. 15254, Adams and Chittenden Scientific Glass, Berkeley CA) se pegaron en la base de soportes plásticos diseñados para filtración por membrana. Después del curado, las unidades de filtro se esterilizaron en un autoclave. Los filtros individuales en los soportes se colocaron en placas Petri estériles, y se agregó un medio de

crecimiento que contenía un inóculo de cultivos de toda la noche de varias cepas sobre los filtros de vidrio. Los cultivos de toda la noche se prepararon al hacer crecer los inóculos de microorganismos en medio LB de Miller durante toda la noche a 30 °C, aerobiamente, con vibración a 200 rpm. El medio de crecimiento para este ensayo de formación de biopelícula/obturación fue o bien un medio mínimo salino (Tabla 4 a continuación) o muestras de agua de producción o de inyección, que se complementan con nitrógeno, fosfato, elementos traza, vitaminas, fuente de carbono y nitrato como aceptor de electrones. Las fuentes de nitrato y carbono varían con los experimentos. Las placas se recubrieron e incubaron a temperatura ambiente en condiciones anaerobias por una a dos semanas. Después, se retiraron los filtros del medio de cultivo, y la pieza superior del soporte plástico se atornilló en su lugar. Una jeringa de 1 ml acoplada al puerto de entrada del soporte del filtro se llenó con 1,0 ml de agua y se midió el tiempo (en segundos) para drenar el agua en el tubo. Los filtros del control sin inoculación tardaron alrededor de 10 segundos para drenar. Los filtros que tardaron más de 10 segundos para drenar se consideraron obturados.

En un ensayo de obturación alternativo, los filtros de vidrio sinterizado se infiltraron con fluido antes del uso, se preseleccionaron para la velocidad de flujo antes de la incubación con el cultivo, y se determinó el cambio

porcentual en la velocidad de flujo después de la incubación al final del experimento.

Selección de cepas para aglomeración de sílice

Se sometieron a prueba cepas de *Pseudomonas stutzeri* para determinar su capacidad para aglomerar granos de sílice cristalina. La sílice cristalina representa un sustituto de los granos de arena comunes en muchas formaciones geológicas subterráneas. En cada tubo de muestra, se agregó una alícuota de 100 µl de 220 g/l de sílice cristalina (tamaño de grano en el intervalo de aproximadamente 2-20 micras; Sil-co-Sil 125 preparado por U.S. Silica, Berkeley Springs, WV). Adicionalmente, se agregó 8 ml de medio, y se taparon los tubos para restringir la entrada de oxígeno al medio.

Los tratamientos de prueba en vivo (inoculados) duplicados recibieron 200 µl de muestra de inoculación de varias cepas. Además, se prepararon tubos de control sin inocular que contenían todos los componentes, excepto el inóculo microbiano. Los tubos se incubaron estáticamente a 30 °C. Los tubos de prueba que contenían microorganismos se mezclaron vigorosamente durante 10 segundos con un mezclador de vórtice. La turbidez se incrementó drásticamente debido a la resuspensión de la sílice cristalina, que se había depositado en el fondo de los tubos durante la incubación. La disminución de la turbidez debido a la sedimentación de la sílice cristalina se controló en el tiempo después del mezclado por densidad celular óptica

(DO600). El comportamiento de sedimentación de las partículas de sílice demostró que algunas cepas formaban una interacción adhesiva fuerte con las partículas de sílice cristalinas adyacentes, lo que hizo que sedimentaran más rápidamente. En el campo de petróleo, el hacer que los granos de arena se adhieran entre sí aumenta la resistencia al flujo de líquido a través de la arena. Esto permite controlar la eficacia de barrido que conduce a una recuperación más eficaz del petróleo por vía de la inundación con agua.

Aparato de tubos delgados para el ensayo de reducción de permeabilidad

Se diseñó un aparato para medir la obturación de paquetes de arena permeable mediante el uso de tubos delgados. En la Figura 4 se muestra un diagrama esquemático de la configuración experimental de tubos delgados. Todos los números que aparecen en negrita a continuación se refieren a la Figura 4.

Una muestra de arena de la formación Schrader Bluff en la unidad Milne Point de la región de la Pendiente Norte de Alaska se depuró mediante el lavado con un solvente compuesto de una mezcla 50/50 (volumen/volumen) de metanol y tolueno. Posteriormente, se drenó el solvente y se eliminó por evaporación de la arena para producir arena limpia, seca y fluida. Se tamizó esta arena para eliminar las partículas de un tamaño menor que una micra. Esta arena sola, o una mezcla de esta arena combinada con la sílice lavada Sil-co-

Sil 125 (U.S. Silica, Berkeley Springs, WV) en una relación de 4:1, se envasó herméticamente en tubos delgados flexibles separados (**9a, 9b, 9c**) de cuatro pies de largo (121,92 cm) de aproximadamente 1 cm de diámetro interno y se compactó por vibración con un grabador de laboratorio.

Ambos extremos de cada tubo delgado se taparon con conectores del tipo de compresión comunes para mantener la arena en el tubo. A estos conectores se acoplaron tuberías flexibles de 1/8 de pulgada (0,32 cm) capaces de soportar las presiones usadas en la prueba. Los tubos delgados se montaron en un recipiente de presión, (**10**) con la tubería que pasa a través de los extremos del recipiente de presión (**11 y 12**) al usar conectores de presión comúnmente disponibles (tabique de unión de 1/8 de pulgada (0,32 cm)) (**18a, 18b, 18c** y **21a, 21b, 21c**). Se usaron conectores y tuberías adicionales para conectar la entrada a cada tubo delgado a una bomba de presión (**13a, 13b, 13c**) y depósito de alimentación (**14a, 14b, 14c**). Otros conectores de compresión comunes, que incluyen juntas acodadas y adaptadores en T, y la tubería conectaron la entrada de cada tubo delgado a un transductor que midió la presión por encima de la presión atmosférica (medidor de presión absoluta) (**20a, 20b, 20c**). Además, la entrada del tubo delgado se conectó con los mismos tipos de tuberías y conectores al lado de alta presión de un transductor de presión diferencial comúnmente disponible (**19a, 19b, 19c**).

Los conectores y las tuberías conectaron la salida de cada tubo delgado al lado de baja presión del transductor de presión diferencial (**19a, 19b, 19c**) y a un regulador de contrapresión (**16a, 16b, 16c**). Las señales de los transductores de presión absoluta y presión diferencial se transfirieron a una computadora, y estas lecturas de presión se monitorearon y registraron periódicamente. El recipiente de presión (**10**) alrededor de los tubos delgados se llenó con agua, que actuó como fluido hidráulico, a través de un puerto para agua (**15**). Esta agua se presurizó lentamente con aire a través del puerto **17** a una presión de aproximadamente 0,74 megapascales (107 libras por pulgada cuadrada (psi)) mientras la Salmuera núm. 1 (a continuación) fluía desde los depósitos de alimentación (**14a, 14b, 14c**) a través de los tubos delgados y salía a través del regulador de contrapresión (**16a, 16b, 16c**). Esta operación se realizó de manera tal que la presión en cada tubo delgado fuera siempre de 0,034 – 0,137 megapascales (de 5 a 20 psi) por debajo de la presión en el recipiente de presión (**10**).

Soluciones para los experimentos con tubos delgados:

Salmuera núm. 1: (salmuera sin nutrientes) – gramos por litro (g/l) de agua desionizada

$NaHCO_3$	1,38
$CaCl_2*6H_2O$	0,39

$MgCl_2*6H_2O$	0,220	
KCl	0,090	
NaCl	11,60	
Metales traza	1,0 ml	(Tabla 4)
Vitaminas traza	1,0 ml	(Tabla 4)
Na_2HPO_4	0,015	(=10 ppm PO_4
NH_4Cl	0,029	(=10 ppm NH_4)
Acetato de sodio	0,278	(200 ppm de acetato)

El pH se ajustó a 7,0 con HCl o NaOH, y la solución se esterilizó por filtración.

Salmuera núm. 2 (alimentación continua de nutrientes):

Salmuera núm. 1 + 100 ppm de nitrato

Salmuera núm. 3 (alimentación de nutrientes por pulsos):

Salmuera núm.1 + 1400 ppm de nitrato + 2600 ppm de acetato

Determinación de la caída de presión

La caída de presión en los tubos delgados se determinó con el transductor de presión diferencial descrito anteriormente. La caída de presión se determinó a través de cada tubo delgado a varias velocidades de fluido. Esta caída de presión fue aproximadamente proporcional a la velocidad de flujo. Para cada caída de presión determinada en cada velocidad de fluido, se calculó la permeabilidad base del paquete de arena.

La caída de presión sola puede compararse y usarse como una medida del cambio en la permeabilidad entre tubos

delgados, ya que todos los tubos fueron de dimensiones similares y recibieron las mismas velocidades de flujo de salmuera durante las pruebas.

El volumen vacío en los tubos delgados, denominado volumen de poro, fue de 40-50 ml. Este volumen de poro se calculó a partir del producto del volumen total del tubo delgado y un cálculo aproximado de la porosidad (~40 %).

Cálculo de la permeabilidad base

La permeabilidad base de cada tubo se determinó al usar la salmuera que fluye a presión máxima: aproximadamente 0,665 megapascales (95 psi) en el tubo delgado (controlado en el extremo de salida con el regulador de contrapresión) y aproximadamente 0,758 megapascales (110 psi) en el recipiente de presión (fuera del tubo delgado). La permeabilidad base se calculó con la ecuación de Darcy:

$$k = \frac{4{,}08 * Q * \mu * L}{A_x * \Delta P}$$

ΔP = La caída de presión a través de una roca o paquete poroso, [=]psi

Q = Velocidad de flujo volumétrico a través del paquete, [=]cc/h

μ = Viscosidad de fluido (una sola fase) a través del paquete [=] centipoise

L = Longitud del paquete (paralela al flujo), [=] cm

A_x = Área de sección transversal (perpendicular al flujo) [=] cm^2

k = Permeabilidad [=] milidarcy

4,08 = una constante de conversión para compatibilizar las unidades [=] $mD\text{-}h\text{-}psi/cp/cc^2$

La permeabilidad base y otras propiedades de cada tubo delgado compactado se dan en la Tabla 3.

Tabla 3. Propiedades de tubos delgados compactados

Tubo Núm.	Ejemplo núm.	DI del tubo, cm	Longitud, cm	Sil-co-Sil 125	Masa de arena, g	Permeabilidad, darcy
9a	12	0,980	121,92	0	187,5	13
9b	13	0,993	121,92	0	182	11
9c	14	0,975	121,92	0	176,3	13
9a -2	15, 16	0,978	121,9	20 % en peso	179,0	1,2
9b -2	15, 17	0,978	121,9	20 % en peso	177,9	0,8

Ejemplo 1

Aislamiento de microorganismos del agua de inyección de un pozo de petróleo a través del crecimiento en una interfase de petróleo/agua

Para enriquecer las especies que pueden interactuar en una interfase hidrófoba/acuosa que simula una interfase de petróleo/agua, se inoculó agua de las muestras de agua de producción o de inyección del Pozo núm. 1, según se describe en la sección de Métodos generales, en 18 ml de medios mínimos salinos (Tabla 4) en viales de 20 ml de suero anaerobio con 1,6 g/l de nitrato de sodio adicionado como aceptor de electrones, 0,1 % de extracto de levadura y con 2 ml de aceite de maíz esterilizado como fuente primaria de carbono. El medio se desoxigenó al inyectar gas en forma de microburbujas con una mezcla de nitrógeno y dióxido de carbono en los viales llenos seguido de esterilización en autoclave. Todas las manipulaciones de microorganismos se realizaron en una cámara anaerobia (Coy Laboratories Products, Inc., Grass Lake, MI), y los cultivos se incubaron a temperatura ambiente con vibración moderada (100 rpm) de varias semanas a varios meses, y se controló la presencia de nitrato, nitrito, la turbidez visible y modificaciones visibles en el petróleo. Cuando se agotó el nitrato en un cultivo, se agregó nitrato de sodio (solución de 50 g/l) al medio hasta la concentración final de 1,6 g/l.

Para poder tener acceso al aceite de maíz, las células deben poder ser capaces de interactuar en la interfase de

petróleo/agua. Con el tiempo, pudo visualizarse el crecimiento de limo microbiano en la capa de aceite de maíz. Se derivaron colonias aisladas por subcultivo de los medios líquidos o la capa de aceite de maíz sobre medio LB y agar con 2 g/l de nitrato de sodio. Los cultivos de colonias aisladas se mantuvieron anaerobiamente y se identificaron al usar marcadores de PCR del ARNr 16S, como se describió anteriormente.

Tabla 4. Medio mínimo salino

g/l	**Sustancia química**
1,0	NH_4Cl
0,5	KH_2PO_4
0,4	$MgCl_2.6H_2O$
0,2	$CaCL_2.2H_2O$
10	NaCl
0,69	NaH2PO4
2,5	$NaHCO_3$
0,073	KSO_4
1000X g/l	**Elementos traza**
1,5	$FeCl_2.4H_2O$
0,002	$CuCl_2.2H_2O$
0,1	$MnCL_2.4H_2O$
0,19	$CoCl_2.6H_2O$

0,07	$ZnCl_2$
0,006	H_3BO_3
0,036	$Na_2MoO_4.2H_2O$
0,024	$NiCl_2.6H_2O$
0,277	HCl
1000X g/l	**Selenio/tungstato**
0,006	$Na_2SeO_3.5H_2O$
0,008	$Na_2WO_4.2H_2O$
0,5	NaOH
1000X mg/l	Mezcla vitamínica
100	Vitamina B12
80	Ácido p-aminobenzoico
20	D(+)-biotina
200	Ácido nicotínico
100	Pantotenato de calcio
300	Clorhidrato de piridoxina
200	Tiamina-HCL.$2H_2O$
50	Ácido alfa-lipoico

El pH del medio se ajustó a 7,3.

Una cepa aislada de la muestra de agua de inyección al usar este enriquecimiento se denominó BR5311. El ARNr 16S de la cepa BR5311 se analizó como se describe en la sección de

Métodos generales y se identificó como una cepa de *Pseudomonas stutzeri*, como se describe en el Ejemplo 3.

Ejemplo 2

Aislamiento de la cepa 89AC1-3 de *pseudomonas stutzeri* de las aguas del pozo núm. 1

En este ejemplo, se muestra un proceso mediante el cual se aislaron microorganismos al usar enriquecimientos con nutrientes específicos de muestras de agua de producción y de inyección obtenidas del Pozo Núm. 1, según se describe en la sección de Métodos generales. Las cepas aisladas se obtuvieron por enriquecimientos anaerobios de muestras de agua de procesamiento de recuperación de petróleo crudo obtenidas del Pozo núm. 1. Se usó un medio mínimo salino (Tabla 4) como medio base en los enriquecimientos iniciales.

El medio mínimo salino se había desoxigenado al inyectar gas en forma de microburbujas con una mezcla de dióxido de carbono y nitrógeno (20 % y 80 %, respectivamente) en estos reactivos seguido de esterilización en autoclave. Todas las manipulaciones de microorganismos se realizaron en una cámara anaerobia (Coy Laboratories Products, Inc., Grass Lake, MI) (mezcla de gas: 5 % de hidrógeno, 10 % de dióxido de carbono y 85 % de nitrógeno). Se prepararon réplicas de las muestras enriquecidas mediante la adición de 10 ml del medio mínimo salino anaerobio estéril en botellas de suero estériles de

20 ml. Se agregó lactato (1000 ppm) como fuente de carbono y se agregó nitrato (2000 ppm) como aceptor de electrones. Cada uno de los enriquecimientos se inoculó con un fluido de procesamiento específico del crudo, ya sea emulsión oleosa de arena-agua de producción, recolectada en la base del pozo de producción, o agua de inyección, que es agua inyectada en el yacimiento para presurizar y desplazar hidrocarburos hacia los pozos de producción. Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente durante dos semanas.

Después de una incubación de siete días, se siembran por estriado muestras de 100 µl de cada uno de los enriquecimientos sobre placas con agar y caldo Marino (preparado por receta, Difco 2216, Becton-Dickenson, Sparks, MD) y se incuban a temperatura ambiente durante dos días. Se aislaron colonias representativas con morfologías únicas. Las muestras de estas colonias aisladas se seleccionaron para identificación por amplificación por PCR al usar el análisis directo de ADNr de colonias descrito en la sección de Métodos generales, con el iniciador inverso de PCR *1492R* (sec. con núm. de ident.:1) y el iniciador directo de PCR *8*F(sec. con núm. de ident.:2). Se usó la secuenciación de ADN y el análisis descrito para obtener la secuencia del ADNr 16S para identificación microbiana. Un aislado del primer enriquecimiento, 89AC1-3, y un aislado del segundo enriquecimiento, 89AF1-5, se identificaron por tener

similitud del ARNr 16S con la cepa A1501 de *Pseudomonas stutzeri* (núm. de acceso al GenBank: AF143245) y se confirmaron posteriormente como cepas de *Pseudomonas stutzeri*, como se describe en el Ejemplo 3.

Ejemplo 3

Análisis de cepas de *pseudomonas stutzeri* mediante el uso de secuencias distintivas identificadas

Para determinar la secuencia completa del ADNr 16S de las cepas BR5311 (Ejemplo 1), 89AC1-3, y 89AF1-5 (Ejemplo 2), se tomó una sola colonia pura de cada uno de los aislados, se aisló el ADN, y se amplificó por PCR el gen del ARNr 16S con el procedimiento de la sección de Métodos generales. Se clonaron las secuencias amplificadas y, después, se secuenciaron muchas veces para obtener la secuencia completa. Cada secuencia del ADNr 16S de la cepa se consultó contra la base de datos del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica, por sus siglas en inglés) por medio del uso del algoritmo del programa BLAST (Herramienta de Búsqueda Básica para Alineamientos Locales) provisto por el NCBI (Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403–410) para identificar las secuencias de nucleótidos más similares. Esto se ejecutó al comparar la secuencia de consulta con secuencias similares del ADNr 16S en la base de datos y determinar un puntaje de porcentaje de identidad relativa. Todas las

secuencias de consulta, una de cada BR5311, 89AC1-3, y 89AF1-5, devolvieron aciertos máximos como *Pseudomonas stutzeri* con un porcentaje igual o mayor que 98 %. Las secuencias del ADNr 16S de los aislados 89AC1-3 y 89AF1-5 fueron idénticas.

En función de la identidad inicial de *Pseudomonas stutzeri*, se seleccionaron 26 secuencias de referencia del ADNr 16S en la base de datos del NCBI del género *Pseudomonas*. Estas secuencias se presentan en la Tabla 1 con sus números de identificación de secuencia. Estas secuencias de referencia incluyeron 13 de *Pseudomonas stutzeri* (sec. con núms. de ident.:13-25), todas ellas fueron de cepas tipo para *Pseudomonas stutzeri* e incluyeron por lo menos una cepa que representaba cada uno de los 10 genomovares. El genomovar 6 de *Pseudomonas stutzeri* se ha reasignado como *Pseudomonas balearica*. Otras secuencias de referencia incluyeron 12 de cepas de *Pseudomonas* (sec. con núms. de ident.:26-37) que representaron 10 especies diferentes de *Pseudomonas* reconocidas por el “International Committee on Systematics of Prokaryotes” (Comité Internacional de Sistemática de Procariotas). Adicionalmente, la secuencia B del ADNr 16S de *E. coli* K12 (sec. con núm. de ident.:9) se usó para anclar un alineamiento de secuencias y para proporcionar el sistema de coordenadas de bases, reconocido como la posición de base estándar (Brosius, J., et al. (1981) J. of Molecular Biology, 148(2):107-127; Woese, (1987) *Bacterial Evolution*. Microbial Rev. 51: 221-271).

Las secuencias de prueba fueron las de las cepas BR5311 (sec. con núm. de ident.:10), 89AC1-3 (sec. con núm. de ident.:11), y la cepa LH4:15 de *Pseudomonas stutzeri* (núm. ATCC: PTA-8823; publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos núm. *20090263887*; sec. con núm. de ident.:12), que se aisló de un pozo de petróleo de una zona mesotérmica en Alaska.

Se creó un árbol filogenético al alinear secuencias del ARNr 16S de longitud casi completa (posición 60 a 1400) de sec. con núms. de ident.:9 -37 con un alineamiento Clustal W, el árbol filogenético y las funciones de inicio del programa MegAlign del paquete de programas LaserGene de DNAstar (DNASTAR, Inc Madison, WI). El árbol filogenético mostrado en la Figura 1 muestra todas las cepas de *P. stutzeri*, que incluyen las cepas BR5311 y 89AC1-3, agrupadas en tres clados que están separados de las otras *Pseudomonads*. La cepa 89AC1-3 es parte del clado filogenético que contiene la cepa A1501 de *Pseudomonas stutzeri* (Genoma completo: núm. de acceso al GenBank: CP000304). La cepa BR5311 y la cepa LH4:15 son parte del clado filogenético que contiene la cepa CLN100 de *Pseudomonas stutzeri* (ADNr 16S: núm. de acceso al GenBank AJ544240.1)

Con el alineamiento de secuencias global múltiple de la serie de programas Clustal, Clustal W (DNAstar, paquete de programas MegAlign, Madison WI; Chenna, R., (2003) Nucl. Acids Res. 31(13):3497-3500), se preparó un alineamiento global de

las secuencias del ADNr 16s de las cepas BR5311, 89AC1-3 y LH4:15, junto con las 13 *Pseudomonas stutzeri* (sec. con núms. de ident.:13-25) y 12 secuencias representativas que no son *stutzeri Pseudomonad* (sec. con núms. de ident.:26-37). A partir del análisis de este alineamiento, se identificaron las posiciones distintivas en las secuencias del ADNr 16S que pueden usarse para distinguir las *Pseudomonas stutzeri* de otras *Pseudomonas* por las secuencias distintivas en estas posiciones. Estas posiciones distintivas se presentan en la Tabla 5, con números de coordenadas de posición del alelo rrB de *E. coli* K12 W3110 para la secuencia del ADNr 16S. Se presenta la secuencia consenso para *Pseudomonas stutzeri* en cada una de las posiciones distintivas. En algunas posiciones distintivas aparece un solo nucleótido, en tanto que en otras posiciones hay degeneración, en donde S puede ser C o G, Y puede ser C o T, M puede ser A o C, K puede ser G o T, R puede ser A o G, D puede ser A, G o T y W puede ser A o T.

En la Tabla 5, los nucleótidos consenso de *Pseudomonas stutzeri* en cada posición distintiva se comparan con los nucleótidos consenso de cada *Pseudomonas balearica*, *Pseudomonas nitroreducens* y *Pseudomonas agarici*, que son especies estrechamente relacionadas con *Pseudomonas stutzeri*. Adicionalmente, en la Tabla 5 se muestran los nucleótidos presentes en cada posición distintiva en las cepas BR5311, 89AC1-3 y LH4:15. Los nucleótidos en todas las

posiciones distintivas en conjunto, para cada una de estas cepas, identifican estas cepas como *Pseudomonas stutzeri*, en tanto que hay diferencias de los nucleótidos consenso de *Pseudomonas stutzeri* entre las posiciones distintivas para especies que nos son *stutzeri*.

La mayoría de las posiciones distintivas identificadas se localizaron en las regiones hipervariables del ADNr 16S, con posiciones aproximadas designadas por nucleótidos de la secuencia del ADNr 16S de *E. coli*:

región hipervariable 1 entre posiciones 60 y 99;

región hipervariable 2 entre posiciones 118 y 290;

región hipervariable 3 entre posiciones 410 y 520;

región hipervariable 4 entre posiciones 578 y 760;

región hipervariable 5 entre posiciones 820 y 888;

región hipervariable 6 entre posiciones 980 y 1048;

región hipervariable 7 entre posiciones 1071 y 1179;

región hipervariable 8 entre posiciones 1215 y 1335;

región hipervariable 9 entre posiciones 1350 y 1480.

Las secuencias distintivas identificadas en la secuencia del ADNr 16S pueden usarse para identificar cepas de microorganismos como pertenecientes a *Pseudomonas stutzeri*. Las cepas aisladas BR5311 y 89AC1-3 tienen, ambas, las secuencias distintivas del ADNr 16S de *Pseudomonas stutzeri*, como se muestra en la Tabla 5. Las secuencias del ADNr 16S de las cepas BR5311 y 89AC1-3 tienen, ambas, la

secuencia consenso degenerada del ADNr 16S de *Pseudomonas stutzeri* (sec. con núm. de ident.:8). La secuencia del ADNr 16S más preponderante, o dominante, para el ADNr 16S de *Pseudomonas stutzeri* es la sec. con núm. de ident.:7.

Tabla 5. Secuencias distintivas del ADNr 16S para distinguir *Pseudomonas stutzeri* de otras *Pseudomonads* relacionadas, que incluyen nucleótidos para consenso de *Ps. stutzeri* y cepas para BR5311, LH4:15, y 89AC1-3 en las posiciones distintivas al usar las coordenadas del ADNr 16S de *E. coli*

E. coli[1], Núm. de coord.	BR5311	LH4:15	89AC3-1	Ps. stutzeri Consenso	Ps. balearica Consenso	Ps. nitroreducens Consenso	Ps. agarici Consenso
70-80	Deleción de 3 nt	Deleción de 3 nt	Deleción de 3 nt	Deleción de 3 nt	Deleción de 3 nt	Deleción de 3 nt	Deleción de 3 nt
72-73	AT	AT	AT	AT	CA	AT	AT
75-83	AAGAGAGC	AAGAGAGC	AGTAGAGC	ARKRGAGC	CGGGTCCT	AGAGGAGC	AAGAGGGC
89-100	Deleción de 3 nt	Deleción de 3 nt	Deleción de 3 nt	Deleción de 3 nt	Deleción de 3 nt	Deleción de 3 nt	Deleción de 3 nt
	CTCTCTGAT	CTCTCTGATT	CTCCATGAT				
90-103	TC	C	TC	CTSYMKGATTC	GGATGCCGGCG	CTCCTTGATTT	CCCTCGGATTC
122-123	GC	GC	GC	RC	GC	GC	GC

126	A	A	A	A	A	A	A
131	T	T	T	T	T	T	T
138-139	GA	GA	GG	RD	GG	GG	GG
141	A	A	A	A	A	A	A
143	T	T	T	T	T	T	T
150	C	C	C	C	T	T	C
154-158	GTTTC	GTTTC	GTTCC	GTTTC	TCGGG	GTTCC	GTCCG
164-168	GGAAC	GGAAC	GGAAC	GGAAC	CTCGA	GGAAC	GGAAC
182	Deleción de 1 nt	Deleción de 1 nt	Deleción de 1 nt	Deleción de 1 nt	Deleción de 1 nt	Deleción de 1 nt	Deleción de 1 nt
188-195	ACGGGAG	ACGGGAG	ACGGGAG	AMGGGAG	ACGGGAG	ACGGGAG	ACGGGAG
189	Inserción de 1 nt C	Inserción de 1 nt C	Inserción de 1 nt C	Inserción de 1 nt M	Inserción de 1 nt C	Inserción de 1 nt C	Inserción de 1 nt C
199-200	CA	CA	TG	YR (CA o TG)	CG	CA	CA
207	C	C	T	Y	T	C	C
213	G	G	A	R	A	G	G

217-219	TGC	TGC	CAC	YRC	CGC	TGC	TGC
224-226	TCA	TCA	TCA	WYA	CCA	TCA	TCA
231	A	A	A	A	A	A	A
235	T	T	T	T	T	T	T
238-240	GTC	GTC	GTC	GTC	GTC	GTC	GTC
253	T	T	T	T	T	T	T
256	T	T	T	Y	T	T	T
258	A	A	A	A	A	A	A
263-265	AAC	AAT*	AAA	AAH	AAA	AAT	AAA
268-269	TC	TC	TC	TC	TC	TC	TC
273	A	A	A	A	A	A	A
278	G	G	G	D	G	G	G
286	G	G	G	G	G	G	G
289	A	A	A	A	G	A	A
311	T	T	T	T	C	T	T
370	G	G	G	G	G	G	G
381	A	A	A	A	A	A	A

391	C	C	C	C	C	C	C
408	G	G	G	G	G	G	G
418	T	T	T	T	T	T	T
425	A	A	A	A	A	A	A
434	T	T	T	T	T	T	T
440-444	CAGCG	CAGCG	CAGCG	CAGCG	CAGCG	CAGCG	CAGCG
456-463	CATTAACC CGTTAGTGT	CATTAACC	CAGTAAGT CCTTGCTGT	CAKTAASY	CAGTAAGT	CATTAACC	CATTAACC
469-478	T	CGTTAGTGTT	T	CSTTRSTGTT	CCTTGCTGTT	CGTTAGTGTT	CGTTAGTGTT
490-491	GA	GA	AA	RA	GA	GA	GA
497	T	T	T	T	T	T	T
513-514	TC	TC	TC	TC	TC	TC	CT
537-538	GA	GA	GA	GA	GA	GA	AG
579	G	G	G	G	G	G	G
582	T	T	T	T	T	T	T
587	T	T	T	T	T	T	T
591-594	TTGTT	TTGTT	TCGTT	TYGTT	TTGAT	TCGTT	TGGTT

599-601	TGA	TGA	TGG	TGR	TGG	TGG	TGG
610	G	G	G	G	G	G	T
638-641	CAAA	CAAA	CAAA	CAAA	CAAA	CAAA	CAAA
644-650	GGCAAG	GGCAAG	GGCGAG	GGCRAG	GTCTGA	GGCGAG	GGCCAG
653	A	A	A	A	A	A	A
658-662	ATGGC	ATGGC	ATGGC	ATGGC	ATGGC	ACGGT	AGGGT
669-673	TGGTG	TGGTG	TGGTG	TGGTG	TGGTG	TGGTG	TGGTG
679-682	TCCT	TCCT	TCCT	TCCT	TCCT	TCCT	TCCT
705-711	TATAGGA	TATAGGA	TATAGGA	TATAGGA	TATAGGA	TATAGGA	TATAGGA
717-721	CACCA	CACCA	CACCA	CACCA	CACCA	CACCA	CACCA
734-737	ACCA	ACCA	ACCA	ACCA	ACCA	ACCA	ACCA
743-748	GCTAAT	GCTAAT	GCTAAT	GCTAAT	GCTAAT	ACTGAT	ACTGAT
755	A	A	A	A	A	A	A
758	G	G	G	G	G	G	G
824	G	G	G	G	G	A	A
	AGCCGTTGG	AGCCGTTGGG	AGCCGTTGG	AGCCGTTGGGA	AGCCGTTGGGA		
828-839	GAT	AT	GAT	T	T	AGCCGTTGGGTT	AGCCGTTGGGAA

		ATCTTAGTG		ATCTTAGTG			
	847-856	G	ATCTTAGTGG	G	ATCTTAGTGG	ATCTTAGTGG	ATTTTAGTGG	TTCTTAGTGG
	859	C	C	C	C	C	C	C
	865	A	A	A	A	A	G	A
	869-870	AT	AT	AT	AT	AT	AT	AT
	876	C	C	C	C	C	T	T
	960	T	T	T	T	T	C	T
	965	A	A	A	A	A	A	A
	986	A	A	A	A	A	T	A
	989	C	C	C	C	C	C	C
	998-1011	GCAGAGAAC TTTCC	GCAGAGAACT TTCC	GCAGAGAAC TTTCC	GCWGAGAACYT KCC	GCAGAGAACTT TCC	GCTGAGAACTTTCC	CCAATGAATCTT CC
	1019-1024	GGATTG	GGATTG	GGATTG	GGMKKG	GATTG	GATTG	GAGGA
	1036-1043	ACTCTGAC	ACTCTGAC	ACTCTGAC	RCTCWGAC	ACTCTGAC	ACTCAGAC	ACATTGAG
	1076	C	C	C	C	C	C	C

1081	G	G	G	G	G	G	G
1100	T	T	T	T	T	T	T
1117	G	G	G	G	G	G	G
1123	A	A	A	A	A	A	A
1127	A	A	A	A	A	A	A
1133-1134	ACGTTAAGG Inserción de 1 nt C	ACGTTAAGGT Inserción de 1 nt C	ACGTTAAGG T Inserción de 1 nt C	ACRTTAWGGT Inserción de 1 nt C	ACGTTAAGGT Inserción de 1 nt C	ACGTTATGGT Inserción de 1 nt C	ACGTGATGGT Inserción de 1 nt C
1141	T						
1145	C	C	C	C	C	C	C
1150	T	T	T	T	T	T	T
1163	G	G	G	G	G	G	G
1168	C	C	C	C	C	C	C
1173	C	C	C	C	C	C	C
1216	G	G	G	G	G	G	G
1219	T	T	T	T	T	A	T

1243-1246	TCGG	TCGG	TCGG	TCGG	TCGG	TCGG	TCGG
1254-1257	A	A	A	A	A	A	A
1260-1264	CAAGC	CAAGC	CAAGC	CAAGC	CAAGC	CAAGC	CAAGC
1271-1274	GTGG	GTGG	GTGG	GTGG	GTGG	GTGG	GTGG
1278-1286	TAATCCCAT	TAATCCCAT	TAATCCCAT	TAATCCCAT	TAATCCCAT	TAATCCCAT	TAATCCCAT
1290-1294	ACCGA	ACCGA	ACCGA	ACCGA	ACCGA	ACCGA	ACCGA
1308-1310	CGC	CGC	CGC	CGC	CGC	CGC	CGC
1327-1329	GCG	GCG	GCG	GCG	GCG	GCG	GCG
1354	T	T	T	T	T	T	T

1356	A	A	A	A	A	A	A
1366	T	T	T	T	T	T	T
1368	A	A	A	A	A	A	G
1381	T	T	T	Y	T	T	T
1393	C*	T	T	Y	T	T	T
1428-1430	TCC	TCC	TCC	TCC	TCC	TCC	ACC
1439	C	C	C	C	C	C	C
1443-1444	TC	TC	TC	TC	TC	TC	TC
1450-1453	TTCG	TTCG	TTCG	TTCG	TTCG	TTCG	TTCG
1456	G	G	G	G	G	G	G
1459	A	A	A	A	A	A	A
1462	G	G	G	G	G	G	G
1470-1472	GGA	GGA	GGA	GGA	GGA	GGA	GGT

1475	A	A	G	R	G	G	G
1484	C	C	C	C	C	C	S
R= A/G; K=G/T; S=C/G; Y=C/T; M=A/C; W=A/T; D =A/G/T/ no C; H=A/C/T/ no G; B=C/G/T no A; V = A/C/G no T							
* La posición distintiva distingue BR5311 de LH4:15							

[1] Alelo rrB de K12 W3110

Ejemplo 4

Técnica de ribotipificación (Riboprinting) para determinar la unicidad de la especie

La secuencia del ARNr 16S usada para determinar la taxonomía del aislado de BR5311 fue homólogo a un número de cepas de *Pseudomonas stutzeri* aisladas ambientalmente. Con el fin de determinar si las cepas BR5311 y 89AC1-3 de *Pseudomonas stutzeri* eran aislados nuevos, muchas cepas de *Pseudomonas stutzeri* se sometieron a un análisis automatizado RIBOPRINTER® como se describió anteriormente. Las cepas usadas para comparación fueron LH4:15 de *Pseudomonas stutzeri* (descrita en la publicación de la solicitud de patente copendiente y de propiedad mancomunada de los Estados Unidos núm. 20090263887), *Pseudomonas stutzeri* DSM 50227, *Pseudomonas stutzeri* Zobell ATCC 14405, *Pseudomonas stutzeri* ATCC 17588, y *Pseudomonas stutzeri* DSM 6082. Como se muestra en la Figura 2, al usar el protocolo de ribotipificación, fue evidente que el patrón de fragmentos de restricción de *Eco*RI que se hibridaron a sondas del ADNr 16S y 23S fue diferente para BR5311 y EH89AC1-3 en comparación con cualquiera de las demás cepas sometidas a prueba, así como entre sí. Este análisis confirmó que las secuencias genómicas que rodean los genes del ARNr 16S y 23 en estas cepas son sustancialmente diferentes a las seis cepas del comparador probadas.

Ejemplo 5

Diferencias fenotípicas entre cepas BR5311, 89AC1-3 Y LH4:15 de *P. stutzeri*

Las cepas recién aisladas BR5311 y AC1-3 se sometieron a prueba en ensayos fenotípicos comparándolas entre sí y con LH4:15 de *P. stutzeri* (núm. ATCC: PTA-8823; descrita en la publicación de patente de los Estados Unidos núm. 20090263887). Estas cepas se sometieron a prueba para hidrólisis de almidón en Agar R2A (Difco Laboratories, Detroit, MI) con 1 % de almidón sobre agar. Las cepas LH4:15 y 89AC1-3 dieron positivo para la hidrólisis de almidón, no así la cepa BR5311. Estas cepas se sometieron a prueba para crecimiento aerobio en medio de etilenglicol al 0,02 % (NaCl, 10 g/l, HEPES, 2,4 g/l, $Na_2HPO_4.7H_2O$, 1,4 g/l, KH_2PO_4, 0,69 g/l, NH_4Cl, 0,5 g/l, $MgSO_4.7H_2O$, 0,1 g/l, vitaminas, como en la Tabla 4, solución de selenio y tungsteno, como en la Tabla 4, 1 ml/l de solución de elementos traza [25 % HCl, 10 ml/l, $FeCl_2.4$ H2O, 1,50 g/l, $ZnCl_2$, 70 mg/l, $MnCl_2.4$ H2O, 100 mg/l, H_3BO_3, 6 mg/l, $CoCl_2.6$ H2O, 190 mg/l, $CuCl_2.2$ H2O, 2 mg/l, $NiCl_2.6$ H2O, 24 mg/l, $Na_2MoO_4.2$ H2O, 36 mg/l], 0,2 ml/l de etilenglicol). Las cepas BR5311 y 89AC1-3 dieron positivo para crecimiento en este medio, no así la cepa LH4:15. En resumen (Tabla 6), solo 89AC1-3 mostró ambos rasgos metabólicos característicos de la especie del tipo *P. stutzeri* (Order IX. Pseudomonadales, Bergey's Manual of Systematic

Bacteriology, págs. 323-444, V. 2, The Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria, Springer – Verlag, 2005).

Tabla 6. Comparación fenotípica de cepas de *P. stutzeri*

Cepa/característica	Crecimiento, etilenglicol	Hidrólisis de almidón
P. stutzeri típica	+	+
BR5311	+	-
LH4:15	-	+
AC1-3	+	+

Adicionalmente, la cepa BR5311 fue muy tolerante a la salinidad alta durante el crecimiento. La cepa LH4:15 no creció en salmuera con nutrientes a más de 35 ppt, en tanto que la BR5311 creció bien en salmuera con nutrientes con una salinidad de 60 ppt. La salmuera con nutrientes consistió de medio LB de Miller, 1/10 X,(Mediatech, Inc., Manassas, VA) + NaCl adicionado para lograr la salinidad deseada, 35 g/l (35 ppt) y 60 g/l (60 ppt).

Ejemplo 6

Selección de aislado bacteriano de BR5311 para crecimiento en condiciones de salinidad alta de pozos canadienses

Crecimiento en agua de inyección del Pozo núm. 1

Se analizó el agua de inyección del sitio del Pozo núm. 1 para determinar el contenido químico. La salinidad fue de 34 ppt (aproximadamente equivalente al agua de mar) con 625 ppm de cationes divalentes en total, principalmente, Ca^{++}. Debido a la alta salinidad de esta agua de inyección en comparación con los medios mínimos salinos (15 ppt), la cepa BR5311 se sometió a prueba para determinar su capacidad para crecer en agua de inyección filtrada del Pozo núm. 1 con una fuente de carbono simple, nitrato como aceptor de electrones y aditivos de crecimiento mínimo. El agua de inyección del Pozo núm. 1 se esterilizó por filtración y se adicionaron los siguientes componentes: vitaminas y metales traza, como se describe en la Tabla 4; 3 g/l de acetato de sodio y 1 g/l de nitrato de sodio. Adicionalmente, 0,5 g/l de NH_4Cl; 0,69 g/l de NaH_2PO_4; y 1,4 g/l de KH_2PO_4 se agregaron a la mezcla. Este medio se desgasificó con una mezcla de dióxido de carbono/nitrógeno. A viales de suero anaerobios de 20 ml, se agregó 18 ml del medio y 160 µl de cultivo aerobio de toda una noche. Los viales se incubaron a 30°, ya sea de manera estática o con mezclado moderado (225 rpm). El crecimiento de BR5311 se analizó por observaciones de turbidez y desarrollo de biopelícula/aglomeración de células. La cepa BR5311 creció

bien en la mezcla de agua de inyección y formó un sedimento de coagulación pegajoso que se depositó rápidamente en el fondo de los viales. El nitrato se consumió en el día 3, lo que indicó un crecimiento anaerobio sustancial de los cultivos.

Crecimiento en el agua de inyección/producción del Pozo núm. 2

Se diseñó un experimento de crecimiento anaerobio similar por separado al usar agua de inyección y agua de producción del Pozo núm. 2, descrito en la sección de Métodos generales. Estas muestras de agua contenían concentraciones sustancialmente más altas de cationes divalentes (~2500 ppm), principalmente, Ca^{++}, que el agua del Pozo núm. 1 (anterior). La salinidad total fue de 67 ppt, que es aproximadamente el doble de la salinidad del agua de mar. Debido a esta alta salinidad, no fue evidente si los microorganismos aislados del Pozo núm. 1 serían capaces de crecer en las aguas del Pozo núm. 2.

Las aguas de producción y de inyección del Pozo núm. 2 se esterilizaron separadamente por filtración, y se agregaron los siguientes componentes a cada una de ellas: 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 metales traza, como en la Tabla 4; 3 g/l de acetato de sodio, 1 g/l de nitrato de sodio. Se desgasificó cada medio, y se agregó 10 ml de medio a viales de vidrio de 20 ml con suero que se inocularon con BR5311 o *Vibrio harveyi*, núm. ATCC: 14126, que es una cepa halofílica conocida usada para comparación. Las

muestras se colocaron a 30 °C de manera inmóvil durante 3 días. Se observaron los niveles de nitrato para monitorear el crecimiento. La cepa BR5311 redujo el nitrato a 0 ppm en 10 días en medio de agua de producción (Figura 5A) y en cuatro días en medio de agua de inyección (Figura 5B). La cepa *Vibrio* no creció bien en estas mezclas de agua, lo que sugiere que las características halofílicas no son suficientes para establecer un crecimiento adecuado en estas aguas de pozos.

Un tercer experimento de crecimiento, realizado en duplicado, usó agua de producción y componentes similares, pero limitó el NH_4Cl a 0,1 g/l y el KH_2PO_4 a 0,02 g/l para evitar la precipitación de Ca^{++} de las aguas del Pozo núm. 2. En esta prueba, la cepa BR5311 redujo drásticamente el nitrato de 800 ppm a <200 ppm en 4 días (Figura 6).

Ejemplo 7

Selección de aislado bacteriano de BR5311 para crecimiento en presencia de petróleo del pozo núm. 1

Los cultivos de aislados que incluyen BR5311 se cultivaron en los medios mínimos salinos descritos en la Tabla 4, con los aditivos: 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 metales traza, como en la Tabla 4; (29,75 g/l de NaCl; 0,31 g/l de KCl; 0,05 g/l de Na_2SO_4; 1,6 g/l de $MgCl_2.6H_2O$; 1,08 g/l de $CaCl_2.2H_2O$); 1,4 g/l de $NaHCO_3$; 0,6 g/l de nitrato de sodio y 2,0 g/l de

acetato de sodio con un pH de 6.6 para simular el agua de inyección del Pozo núm. 1. Se desgasificaron los medios y se agregó 18 ml a viales de suero de 20 ml. A cada vial se agregó 1,0 ml de aceite de petróleo del Pozo núm 1, esterilizado en autoclave y desgasificado. Se agregó como inóculo 0,1 ml de un cultivo de toda la noche de BR5311. El nitrato se analizó por IC para observar el crecimiento en estos medios. BR5311 redujo el nitrato a nitrógeno dentro de los dos 2 días de incubación a 25 °C. La reducción de nitrato indica que la presencia de petróleo del Pozo núm. 1 no inhibió el crecimiento de este cultivo.

Ejemplo 8

Selección de aislados bacterianos por su capacidad para formar biopelículas

Se analizaron aislados individuales de los enriquecimientos con aceite de maíz del Ejemplo 1 para determinar su capacidad de formar biopelículas en filtros de vidrio sinterizado, como se describe en la sección de Métodos generales. Los medios que contienen inóculos fueron medios mínimos salinos (Tabla 4) complementados con acetato o lactato como única fuente de carbono y nitrato como aceptor de electrones, como se presenta en la Tabla 7. La mezcla se hizo anaerobia al colocarla en una cámara de plástico que contiene un sistema de depuración de oxígeno por ascorbato

(Becton, Dickinson Co, Sparks, Maryland). En función de esta selección, la cepa BR5311 de *Pseudomonas stutzeri* se seleccionó como positiva para obturación y, después, se seleccionó por su preferencia por fuentes de carbono.

El agua de inyección del Pozo núm. 2 (67 ppt) se esterilizó por filtración, y se agregaron los siguientes 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 metales traza, como en la Tabla 4. Se agregó nitrato de sodio y o bien acetato de sodio o lactato de sodio a muestras de prueba diferentes para dar las relaciones disponibles de donante/aceptor de electrones mostrada en la columna e de la Tabla 7. Se agregó 25 ml de los medios y 1 ml de cultivo de toda la noche a cada soporte con el filtro de vidrio. Después de una semana de incubación en cajas anaerobias, se retiraron los filtros y se analizaron para determinar la capacidad de obturación, como se describe en la sección de Métodos generales. Cada filtro se midió tres veces. Los resultados de los tiempos de flujo para cada muestra de prueba se dan en la Tabla 7.

Tabla 7. Aditivos del ensayo para biopelículas y resultados de flujo

Prueba	Acetato de sodio	Nitrato de sodio	Lactato de sodio	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

Los resultados mostraron que se observó una obturación significativa cuando se usó acetato como fuente de carbono independientemente de la relación de electrones. Se observó una obturación mínima con lactato con una relación de donante/aceptor de electrones de 4:1.

Ejemplo 9

Ensayo de biopelículas para la cepa BR5311 en medio de salinidad baja con acetato o lactato como fuente de carbono

Se analizó la cepa BR5311 para determinar la capacidad de formar biopelículas en filtros de vidrio sinterizado, como se describe en la sección de Métodos generales, por medio del uso de un medio de salinidad baja. BR5311 se inoculó en medio LB de Miller y se incubó aerobiamente durante toda la noche a 30 °C con vibración a 200 rpm. Para iniciar el experimento, se agregó 1 ml de un inóculo de toda la noche a 25 ml del medio a continuación por triplicado y se agregó a un soporte con filtro de vidrio. Estos cultivos

se cultivaron anaerobiamente en un incubador/agitador a 28 °C/100 rpm durante 2 semanas. Adicionalmente, se prepararon controles sin inocular por triplicado con un medio de igual formulación, pero sin el inóculo de la cepa, paralelamente con los tratamientos de prueba no inoculados.

Composición del medio de crecimiento de salinidad baja: NaCl, 10 g/l, $NaHCO_3$, 0,25 g/l, $NaNO_3$, 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 de calcio, 100 mg/l, clorhidrato de piridoxina, 300 mg/l, tiamina-HCl. 2 H_2O, 200 mg/l, ácido alfa-lipoico, 50 mg/l], solución de selenita/tungstato, 1 ml/l [NaOH, 0,5 g/l, $Na_2SeO_3.5H_2O$, 6,0 mg/l, $Na_2WO_4.2H_2O$, 8,0 mg/l], metales traza SL-10, 1 ml/l [25 % HCl, 10 ml/l, $FeCl_2.4\ H_2O$, 1,5 g/l, $ZnCl_2$, 70 mg/l, $MnCl_2.4\ H_2O$, 100 mg/l, H_3BO_3, 6 mg/l, $CoCl_2.6\ H_2O$, 190 mg/l, $CuCl_2.2\ H_2O$, 2 mg/l, $NiCl_2.6\ H_2O$, 24 mg/l, $Na_2MoO_4.2\ H_2O$, 36 mg/l], KH_2PO_4, 0,02 g/l, NH_4Cl, 0,1 g/l, $MgSO_4.7H_2O$, 0,1 g/l, y 0,1 g/l de extracto de levadura.

La fuente de carbono en el medio fue o bien acetato de sodio o lactato de sodio (a 1,0 g/l). La salinidad fue de 20 ppt. Se sellaron individualmente filtros de prueba por triplicado en recipientes de incubación de 125 ml en condiciones anaerobias y se colocaron en un incubador/vibrador a 28 °C y 100 rpm durante 2 semanas.

Después de dos semanas, se verificaron las velocidades de flujo, como se describe en la sección de Métodos generales. Se registró el tiempo para el paso de agua de cada uno de los filtros de prueba y de control, y cada filtro se sometió a prueba 3 veces. Se calcularon las velocidades de flujo, y los valores posteriores a la incubación se compararon con los valores anteriores a la incubación para cada filtro. Los resultados de la Tabla 8 demuestran que la cepa BR 5311 causó una disminución significativa en la velocidad de flujo en comparación con los tratamientos de control después de dos semanas de incubación. En los tratamientos de control con acetato y lactato, las velocidades de flujo se incrementaron. El incremento de la velocidad de flujo fue el resultado de una mejor saturación de agua de los poros del filtro después de dos semanas de incubación sumergida. Los tratamientos de prueba que contenían el inóculo de BR 5311 mostraron disminuciones en la velocidad de flujo. En el tratamiento de prueba con acetato, la velocidad de flujo disminuyó en aproximadamente 42 %. En el tratamiento de prueba con lactato, las velocidades de flujo disminuyeron aproximadamente 27 %.

Tabla 8. Cambios en la velocidad de flujo a través de los filtros de vidrio de porosidad media después de dos semanas de incubación

Tratamiento	Flujo, ml/s						
	Valor anterior a la incubación	Valores* posteriores a la incubación			Media	% de cambio en la velocidad de flujo[1]	Media del % de cambio en la velocidad de flujo
		Núm. 1	Núm. 2	Núm. 3			
Control 1 con acetato	0,083	0,100	0,100	0,100	0,100	+ 20	+16
Control 2 con acetato	0,091	0,125	0,111	0,111	0,116	+ 27	
Control 3 con acetato	0,091	0,091	0,091	0,091	0,091	0	
Prueba 1 con acetato	0,100	0,067	0,067	0,067	0,067	- 33	- 42
Prueba 2 con acetato	0,100	0,043	0,042	0,038	0,041	- 59	
Prueba 3 con acetato	0,091	0,059	0,059	0,063	0,060	- 34	
Control 1 con lactato	0,083	0,100	0,100	0,100	0,100	+20	+9
Control 2 con lactato	0,091	0,100	0,091	0,100	0,097	+7	
Control 3 con lactato	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0	

Prueba 1 con lactato	0,111	0,125	0,111	0,111	0,116	+ 4	
Prueba 2 con lactato	0,091	0,048	0,045	0,045	0,046	- 49	- 27
Prueba 3 con lactato	0,100	0,067	0,067	0,063	0,065	- 35	

* 3mediciones/réplicas sucesivas.

[1] Se calcula como ((media de valores posteriores a la incubación, ml/s / valores anteriores a la incubación, ml/s)-1) x 100

Ejemplo 10

Ensayo de biopelícula para la cepa BR5311 en medio de salinidad alta con acetato como fuente de carbono

Se analizó la cepa BR5311 para determinar la capacidad de formar biopelículas en filtros de vidrio sinterizado, como se describe en la sección de Métodos generales, por medio del uso de un medio de salinidad alta. La salinidad del medio fue de 70 ppt. La cepa BR5311 se cultivó anaerobiamente en un medio de crecimiento con la siguiente composición: NaCl, 40,5 g/l, NH_4Cl, 0,1 g/l, KH_2PO_4, 0,02 g/l, Na_2SO_4, 0,1 g/l, solución de selenita-tungstato [NaOH, 0,5 g/l, $Na_2SeO_3.5H_2O$, 6,0 mg/l, $Na_2WO_4.2H_2O$, 8,0 mg/l], 1 ml/l, $NaHCO_3$, 0,2 g/l, solución vitamínica [vitamina B12, 100 mg/l, ácido p-aminobenzoico, 80 mg/l, D(+)-Biotina, 20 mg/l, ácido nicotínico, 200 mg/l, pantotenato de calcio, 100 mg/l, clorhidrato de piridoxina, 300 mg/l, tiamina-HCl. 2 H_2O, 200 mg/l, ácido alfa lipoico, 50 mg/l], 1 ml/l, solución de metales traza SL-10 [25 % HCl, 10 ml/l, $FeCl_2.4\ H_2O$, 1,50 g/l, $ZnCl_2$, 70 mg/l, $MnCl_2.4\ H_2O$, 100 mg/l, H_3BO_3, 6 mg/l, $CoCl_2.6\ H_2O$, 190 mg/l, $CuCl_2.2\ H_2O$, 2 mg/l, $NiCl_2.6\ H_2O$, 24 mg/l, $Na_2MoO_4.2\ H_2O$, 36 mg/l], 1 ml/l, $CaCl_2.2H_20$, 8,8 g/l, extracto de levadura, 0,025 g/l, $NaNO_3$, 2,4 g/l, acetato de sodio, 1,2 g/l, KCl, 0,86 g/l, $MgCl_2.6H_2O$, 6,4 g/l, solución azul de bromotimol, 0,4 %, 3 ml.

El experimento y las pruebas de velocidad de flujo después de dos semanas de incubación se realizaron como se describe en

el Ejemplo 9. Si bien la velocidad de flujo se incrementó en los controles, como en el Ejemplo 9, la cepa BR5311 causó una disminución significativa en la velocidad de flujo (Tabla 9). Las velocidades de flujo en los tratamientos de control se incrementaron en un promedio de 20 %. Los tratamientos de prueba que contenían el inóculo de BR5311 mostraron una disminución promedio de 55 % en la velocidad de flujo.

Tabla 9. Cambios en la velocidad de flujo a través de los filtros de vidrio de porosidad media después de dos semanas de incubación.

	Flujo, ml/s						
	Valor anterior a la incubación	Valores* posteriores a la incubación			Media	% de cambio en la velocidad de flujo[1]	Media del % de cambio en la velocidad de flujo
Tratamiento		Núm. 1	Núm. 2	Núm. 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	
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	
PRUEBA 3	0,083	0,015	0,016	0,017	0,016	- 81	

* 3 mediciones sucesivas

1 Se calcula como ((media de valores posteriores a la incubación, ml/s / valores anteriores a la incubación, ml/s)-1) x 100

Ejemplo 11

Ensayo de biopelícula para la cepa 89AC1-3 en salmuera que simula el pozo núm. 1

Se analizó la cepa 89AC1-3 para determinar la capacidad de formar biopelículas en filtros de vidrio sinterizado, como se describe en la sección de Métodos generales y el Ejemplo 8 al usar salmuera que simula el Pozo núm. 1. La cepa 89AC1-3 se inoculó en medio LB de Miller y se incubó a 30 °C aerobiamente durante toda la noche (225 rpm). Se diluyó 500 µl del cultivo de toda la noche en 25 ml de los medios mínimos descritos en la Tabla 4 con 3,0 % en peso de NaCl para dar una salinidad que se aproxima a la salinididad del Pozo núm. 1 (35 ppt). Se agregó acetato de sodio o lactato de sodio para dar una concentración final de 2000 ppm. Se agregó nitrato de sodio a 500 ppm como aceptor de electrones para crecimiento anaerobio.

Las unidades de filtro se incubaron anaerobiamente a temperatura ambiente durante dos semanas y se analizó el flujo como se describe en la sección de Métodos generales y el Ejemplo 3. La cepa 89AC1-3 mostró obturación con lactato (flujo en s = 30,0 +/- 7,0) o acetato (flujo en s = 20 +/- 13,0) en esta concentración de salinidad de agua de mar (35 ppt).

Ejemplo 12

Aglomeración de partículas de sílice con la cepa 89AC1-3

La cepa 89AC1-3 de *Pseudomonas stutzeri* se sometió a prueba para determinar su capacidad para aglomerar granos de sílice cristalina, como se describe en la sección de Métodos generales. El medio usado en esta prueba contenía acetato como fuente de carbono y tenía una salinidad de aproximadamente 32 ppt.

Medio de prueba:

NaCl, 27 g/l, NH_4Cl, 0,05 g/l, KH_2PO_4, 0,025 g/l, Na_2SO_4, 0,05 g/l, solución de selenita-tungstato [NaOH, 0,5 g/l, $Na_2SeO_3.5H_2O$, 6,0 mg/l, $Na_2WO_4.2H_2O$, 8,0 mg/l], 0,5 ml/l, $NaHCO_3$, 0,1 g/l, solución vitamínica [vitamina B12, 100 mg/l, ácido p-aminobenzoico, 80 mg/l, D(+)-Biotina, 20 mg/l, ácido nicotínico, 200 mg/l, pantotenato de calcio, 100 mg/l, clorhidrato de piridoxina, 300 mg/l, tiamina-HCl. 2 H_2O, 200 mg/l, ácido alfa-lipoico, 50 mg/l], 0,5 ml/l, solución de metales traza SL-10 [25 % HCl, 10 ml/l, $FeCl_2.4$ H_2O, 1,50 g/l, $ZnCl_2$, 70 mg/l, $MnCl_2.4$ H_2O, 100 mg/l, H_3BO_3, 6 mg/l, $CoCl_2.6$ H_2O, 190 mg/l, $CuCl_2.2$ H_2O, 2 mg/l, $NiCl_2.6$ H_2O, 24 mg/l, $Na_2MoO_4.2$ H_2O, 36 mg/l], 0,5 ml/l, $CaCl_2.2H_20$, 4,4 g/l, 0,25 g/l de extracto de levadura, 0,5 g/l de peptona de caseína, KCl, 0,86 g/l, $MgCl_2.6H_2O$, 6,4 g/l, $NaNO_3$, 2 g/l, acetato de sodio, 1 g/l.

Después de siete días, la DO600 media de los tubos duplicados inoculados con la cepa 89AC1-3 y de los tubos de

control duplicados sin inocular fue de aproximadamente 0,04. Cuando los tubos de tratamiento se mezclaron vigorosamente por 10 segundos de mezclado en vórtice, la turbidez se incrementó drásticamente debido a la resuspensión de la sílice cristalina que se había depositado en el fondo de los tubos durante siete días de incubación (Tabla 10). La disminución de la turbidez debido a la sedimentación de la sílice cristalina se controló en el tiempo después del mezclado por densidad celular óptica (DO600). La turbidez disminuyó mucho más rápidamente en los tratamientos inoculados que en los de control, según lo indicado por la reducción porcentual en la OD600 para el cultivo inoculado frente al control a 1 min y 10 min después del mezclado (Tabla 10).

Esto resulta de las partículas de sílice que forman aglomeraciones grandes, de hasta 100 micras de diámetro, según lo determinado por examen microscópico, en los tratamientos inoculados, que se sedimentan rápidamente en comparación con las partículas dispersas no aglomeradas de 2-20 µm en los tubos de control sin inocular. El comportamiento contrastante de las partículas de sílice demostró que la cepa 89AC1-3 formó una interacción adhesiva fuerte con las partículas de sílice cristalinas y produjo la aglomeración de las partículas.

Tabla 10. Sedimentación de granos de sílice debido a la aglomeración de partículas inducida microbianamente por la cepa 89AC1-3 en medio con acetato

Tratamiento	DO600 nm, antes del mezclado	DO600 nm, 1 minuto después del mezclado	DO600 nm, 10 minutos después del mezclado
Control no inoculado núm. 1	0,047	6,311	5,954
Control no inoculado núm. 2	0,034	6,152	5,412
Media	0,04	6,23	5,68
Prueba inoculada núm. 1	0,07	2,767	2,742
Prueba inoculada núm. 2	0,005	3,841	3,622
Media	0,04	3,3	3,18
% de reducción en la DO	No aplicable	48 %	44 %

La cepa 89AC1-3 de *Pseudomonas stutzeri* se sometió a prueba para determinar su capacidad para aglomerar granos de sílice cristalina en el siguiente medio que contiene lactato de sodio (g/l) en lugar de acetato de sodio:

NaCl, 27 g/l, NH_4Cl, 0,05 g/l, KH_2PO4, 0,025 g/l, Na_2SO_4, 0,05 g/l, solución de selenita-tungsteno [NaOH,

0,5 g/l, $Na_2SeO3.5H2O$, 6,0 mg/l, $Na_2WO_4.2H_2O$, 8,0 mg/l], 0,5 ml/l, $NaHCO_3$, 0,1 g/l, solución vitamínica [Vitamina B12, 100,00 mg/l, ácido p-aminobenzoico, 80 mg/l, D(+)-Biotina, 20 mg/l, ácido nicotínico, 200,00 mg/l, pantotenato de calcio, 100 mg/l, clorhidrato de piridoxina, 300 mg/l, tiamina-HCl. 2 H_2O, 200 mg/l, ácido alfa-lipoico, 50 mg/l], 0,5 ml/l, solución de metales traza SL-10 [25 % HCl, 10 ml/l, $FeCl_2.4\ H_2O$, 1,50 g/l, $ZnCl_2$, 70 mg/l, $MnCl_2.4\ H_2O$, 100 mg/L, H_3BO_3, 6 mg/l, $CoCl_2.6\ H_2O$, 190 mg/l, $CuCl_2.2\ H_2O$, 2 mg/l, $NiCl_2.6\ H_2O$, 24 mg/l, $Na_2MoO_4.2\ H_2O$, 36 mg/l], 0,5 ml/l, $CaCl_2.2H_20$, 4,4 g/l, 0,25 g/l de extracto de levadura, 0,5 g/l de peptona de caseína, KCl, 0,86 g/l, $MgCl_2.6H_2O$, 6,4 g/l, $NaNO_3$, 4 g/l, lactato de sodio, 2 g/l.

Después de siete días, la DO600 promedio de los tubos inoculados duplicados y de los tubos de control duplicados sin inocular fue de 0 y 0,07, respectivamente. Los resultados de la sedimentación después del mezclado fueron similares a los del medio que contenía acetato que se mencionó anteriormente (Tabla 11).

Tabla 11. Sedimentación de granos de sílice debido a la aglomeración de partículas inducida microbianamente por la cepa 89AC1-3 en medio con lactato

Tratamiento	DO600 nm, antes del mezclado	DO600 nm, 1 minuto después del mezclado	DO600 nm, 10 minutos después del mezclado
Control no inoculado núm. 1	0,045	5,419	5,113
Control no inoculado núm. 2	0,094	5,197	4,829
Media	0,07	5,31	4,97
Prueba inoculada núm. 1	0	2,665	2,609
Prueba inoculada núm. 2	0	3,133	3,188
Media	0	2,90	2,90
% de reducción en la DO	No aplicable	45 %	42 %

Ejemplo 13

Caída de presión medida en tubo delgado de control que contiene petróleo/arena

Se usó la configuración de tubos delgados descrita en la sección de Métodos generales para medir los cambios de presión en el tiempo de una muestra de arena/petróleo como control. Un tubo delgado (Figura 4, 9a) se llenó de arena de la formación de Schrader Bluff en la unidad de Milne Point de la región de la Pendiente Norte de Alaska, como se describe en la sección de

Métodos generales. El tubo se inundó bajo una presión de aproximadamente 0,66 megapascales (95 psi) con la Salmuera núm. 1 (Métodos generales), con 0,74 megapascales (107 psi) de presión en el recipiente de presión. Después de reducir la presión a aproximadamente 0,14 megapascales (20 psi), se inundó el tubo delgado con aproximadamente 50 cc o aproximadamente 1 volumen de poro de petróleo crudo obtenido de un yacimiento de petróleo de la unidad Milne Point de la región de la Pendiente Norte de Alaska. Se dejó que la mezcla de petróleo y arena del tubo delgado se depositara o madurara por aproximadamente 2 semanas sin que ningún fluido fluyera a través del tubo.

Después, se alimentó la Salmuera núm. 1 (Métodos generales) continuamente durante 55 días en el tubo delgado y se comenzó con una velocidad de flujo de 0,06 ml/min, lo que da un tiempo de permanencia de aproximadamente 0,5 días en el tubo. La caída de presión a través del tubo delgado se midió en el tiempo (Figura 7). En varios puntos de tiempo, tuvieron que usarse velocidades de flujo más altas debido a problemas de funcionamiento del sistema. En esos momentos, la caída de presión se ajustó por la relación de las velocidades de flujo para que esta caída de presión pudiera seguirse comparando con la caída de presión medida en otros tubos delgados. Inicialmente, la caída de presión fue de 0,0069 a 0,0137 megapascales (de 1 a 2 psi), que disminuyó posteriormente cuando el tubo delgado se inundó con la

Salmuera núm. 1. La caída observada en la presión se debió al hecho de que el petróleo se estaba eliminando del tubo delgado, según lo demostrado por el hecho de que el petróleo apareció en el efluente del tubo delgado. Después de 40 días, la presión había continuado cayendo a aproximadamente 0,69 kiloPascales (0,1 psi), a lo que siguió un ligero incremento en la presión. Se tomó una muestra del efluente, y se determinaron los títulos de células viables (el número más probable o MPN), como se describe en la sección de Métodos generales. Los resultados de los análisis se muestran a continuación en la Tabla 12. El incremento ligero en la presión se debió, probablemente, al metabolismo del acetato, presente en la Salmuera núm. 1, a través de la microflora natural presente en la arena dentro del tubo delgado.

Ejemplo 14

Tubo delgado inoculado alimentado continuamente y mediciones de la caída de presión

Se preparó un tubo delgado como en el Ejemplo 13, excepto que después de la maduración de la muestra de arena y petróleo en el tubo y la inundación con varios volúmenes de poro de la Salmuera núm. 1 a 0,6 ml/min, el tubo (muestra 9b) se inoculó con la cepa LH4:15 de *Pseudomonas stutzeri* (núm. ATCC: PTA-8823). Esta es una cepa aislada de muestras de agua de producción de un yacimiento de petróleo, como se

describe en la publicación de patente copendiente y de propiedad mancomunada de los Estados Unidos núm. 20090263887. Para inocular el tubo delgado, se diluyó 1,0 ml de una muestra congelada de la cepa LH4:15 de *Pseudomonas stutzeri* en una relación de 1:20 en la Salmuera núm. 3 (Métodos generales) y se agitó. La solución con el inóculo diluido se diluyó aún más, 200:1, (2,5 ml adicionados a 497,5 ml) en la Salmuera núm. 1, se tomó una muestra de esto y se determinaron los títulos de células viables (número más probable o MPN), como se describe en la sección de Métodos generales. Este valor de MPN se presenta en la Tabla 12 como "inoculación de MPN". Se cargó una jeringa de 50 ml con esta solución de inóculo diluido, y la solución se bombeó con una bomba de jeringa dentro del tubo delgado a una velocidad de aproximadamente 0,2 ml/min. El proceso de inoculación del tubo delgado tardó aproximadamente 4 horas para completarse.

Después de la inoculación, se tomó una muestra del efluente y se determinaron los títulos de células viables (número más probable o MPN), como se describe en la sección de Métodos generales. Los resultados de los análisis se muestran a continuación en la Tabla 12 identificados como los "MPN en el efluente".

La Salmuera núm. 2 se alimentó continuamente a través del tubo delgado 9b a 0,06 ml/min durante 55 días mientras se medía

la caída de presión a través del tubo (Figura 8). Inicialmente, la caída de presión fue de 0,0069 a 0,0137 megapascales (de 1 a 2 psi) y cayó por debajo de 0,0069 megapascales (1 psi) en aproximadamente 8 días. A los 10 días, hubo un incremento definitivo en la caída de presión. A los 20 días, el sistema experimentó un pico de presión seguido por una caída inexplicable y muy marcada en la presión. El pico de presión a los 22 días (Figura 8) fue una perturbación debido a un problema de funcionamiento del sistema. Otro pico inexplicable de presión se produjo a los 35 días. Más drásticamente, se produjo un incremento en la presión a los 45 días seguido de otra caída de presión inexplicable a aproximadamente 47 días. El incremento en la presión a través del tubo delgado, en comparación con el control del Ejemplo 13, demuestra el potencial de LH4:15 de *Pseudomonas stutzeri* (núm. ATCC:PTA-8823) para modificar la permeabilidad de rocas porosas.

Ejemplo 15

Tubo delgado inoculado alimentado por lotes y mediciones de la caída de presión

Se preparó un tubo delgado como en el Ejemplo 14, con la inoculación de la cepa LH4:15 de *Pseudomonas stutzeri* (núm. ATCC: PTA-8823). Después de la inoculación, se tomó una muestra del efluente y se determinaron los títulos de células viables (número más probable o MPN), como se

describe en la sección de Métodos generales. Los resultados de los análisis se muestran a continuación en la Tabla 12.

Inmediatamente después de inocular el tubo delgado, se alimentó la Salmuera núm. 1 durante toda la noche a 0,06 ml/min. A la mañana siguiente, se alimentó la Salmuera núm. 3 (Métodos generales) durante 6 h a una velocidad de 0,06 ml/min. Después, se alimentó la Salmuera núm. 1 a 0,06 ml/min. Típicamente, se alimentó un lote de Salmuera núm. 3 durante 6 horas cada tercer o cuarto día por la duración de la prueba, y se alimentó la Salmuera núm. 1 continuamente entre lotes. La cantidad total de nutrientes alimentados en el tubo delgado 9c fue igual que la alimentada en el tubo delgado 9b del Ejemplo 14.

Inicialmente, la caída de presión fue de 0,0069 a 0,0137 megapascales (de 1 a 2 psi) y, después, disminuyó a aproximadamente 0,0069 megapascales (1 psi) en 8 días. A los 10 días, hubo un incremento en la caída de presión, y este se incrementó consistente y linealmente en el tiempo (Figura 9). Los picos observados a los 22 y 29 días fueron perturbaciones debido a un problema de funcionamiento del sistema. Notablemente, al término del día 55, la caída de presión fue de un orden de magnitud mayor que el control en el Ejemplo 13. Esto demuestra el potencial de LH4:15 de *Pseudomonas stutzeri* (núm. ATCC: PTA-8823) para modificar eficazmente la permeabilidad de rocas porosas.

Tabla 12. Análisis del MPN de tubos delgados después de la inoculación

Análisis	Tubo delgado 9a	Tubo delgado 9b	Tubo delgado 9c
Inoculación de MPN	Sin inóculo	~1 $x10^8$ UFC/ml	~1$x10^8$ UFC/ml
MPN en el efluente	4,2 $x10^5$	1,1 $x10^7$ UFC/ml	7,9 $x10^6$ UFC/ml

MPN = números más probables

Ejemplo 16

Caída de presión medida en el tubo delgado de control que contiene arena en medio de salinidad alta

Se usó la configuración de tubos delgados descrita en la sección de Métodos generales para medir los cambios de presión en el tiempo de muestras de arena en agua de salinidad alta (70 ppt) como control. Se llenaron dos tubos delgados (tubos 9a-2 y 9b-2) con una mezcla de arena más Sil-co-Sil 125 (U.S. Silica, Berkeley Springs, WV) en una relación de 4:1 en peso (20 % en peso). Cada tubo delgado se inundó, con una presión de aproximadamente 0,66 megapascales (95 psi), con la Salmuera núm. 4 (a continuación), con 0,74 megapascales (107 psi) de presión en el recipiente de presión.

Salmuera núm. 4: Se usó agua de inyección esterilizada por filtración en un pozo petrolero de Alberta, Canadá. El

contenido total de sal disuelta fue de 70 ppt. El pH de esta solución se ajustó de ~6,2 a 6,4 con HCl o NaOH.

Con solamente la Salmuera núm. 4 que fluye en los tubos (sin petróleo presente), se realizaron mediciones y se calculó la permeabilidad base de aproximadamente 1 darcy, según lo informado en la sección Métodos generales.

Los tubos delgados 9a-2 y 9b-2 se inocularon previamente con 60 ml de inyección en vivo de salmuera (Salmuera núm. 4 que no se esterilizó por filtración) a una velocidad de 15 ml/hora durante 4 horas. Después de esta inoculación previa, se tomó una muestra del efluente y se realizaron los recuentos de células, como se describe en la sección de Métodos generales, y se proporcionan en la Tabla 13.

La Salmuera núm. 4 se alimentó continuamente a una velocidad de 3,6 ml/h durante 11 días en los tubos delgados 9a y 9b mientras se determinaba la caída de presión a través del tubo delgado. Los resultados para el tubo 9a-2 se muestran en la Figura 10. Los resultados fueron similares para ambos tubos. La caída de presión permaneció entre 0,0069 y 0,0137 megapascales (de 1 a 2 psi). Esto ilustra la estabilidad de la arena compactada en el tubo delgado mientras se inundaba con la salmuera de la inyección.

Ejemplo 17

Caída de presión medida en el tubo delgado inoculado alimentado por lotes que contiene arena en medio de salinidad alta

Un día después, el tubo delgado 9a-2 del Ejemplo 16 se inoculó con BR5311 de *Pseudomonas stutzeri* (núm. ATCC: PTA-11283). Para inoculación, una muestra congelada de BR5311 de *Pseudomonas stutzeri* se diluyó 1:20 en la Salmuera núm. 7 (a continuación), se agitó y, después, se dejó reposar durante toda la noche. Se tomó una muestra del inóculo, se realizaron los recuentos de células, como se describe en la sección de Métodos generales, y se presentan en la Tabla 13. Se cargó una jeringa con la solución del inóculo y se bombeó en el tubo delgado con una bomba de jeringa a una velocidad de aproximadamente 0,25 ml/min. El proceso de inoculación del tubo delgado tardó aproximadamente 4 horas para completarse. Después de completada la inoculación, el tubo delgado se dejó madurar durante 5 días.

Al finalizar el período de maduración, se alimentó la Salmuera núm. 6 (a continuación) en el tubo delgado 9a-2 a una velocidad de 3,6 ml/h durante 4 h. En este punto, se tomó una muestra del efluente y se determinaron los recuentos de células, como se describe en la sección de Métodos generales, y se presentan en la Tabla 13. Se continuó el bombeo de la Salmuera núm. 4 a una velocidad de 3,6 ml/h en este tubo delgado. Se tomó una muestra del efluente después de un total

de 46 días, y se realizó el recuento de células. Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 13.

La Salmuera núm. 6 se alimentó en el tubo delgado 9a-2 en pulsos de 4 a 8 horas dos veces por semana (una vez cada 3 o 4 días) durante aproximadamente 30 días, y se midió la caída de presión a través del tubo delgado. La Salmuera núm. 6 se alimentó en pulsos de 4 horas en el día 17, 20 y 24. La Salmuera núm. 6 se alimentó en pulsos de 8 horas en el día 27, 32, 34, 38, 41 y 44. Inicialmente, la caída de presión fue de 0,0069 a 0,0137 megapascales (de 1 a 2 psi). Después de 10 días, hubo un aumento apreciable en la caída de presión que se hizo más pronunciado con el tiempo (Figura 11). La caída de presión fue casi 6 veces mayor que el control (Ejemplo 16). Esto demuestra el potencial de BR5311 de *Pseudomonas stutzeri* (núm. ATCC: PTA11283) para modificar eficazmente la permeabilidad de rocas porosas aun cuando se alimente de manera discontinua en un medio acuoso de salinidad alta.

Salmuera núm. 6: alimentación discontinua de nutrientes

	Cantidad por litro
$NaNO_3$	300,5 g
Acetato de sodio	152,5 g
NH_4Cl	3,6 g
KH_2PO_4	0,72 g
Extracto de levadura	18 g

pH=6,5

Se diluye 1 parte en 36 partes de Salmuera núm. 4

Salmuera núm. 7:

en agua de grifo,

	Cantidad por litro
NaCl	10 mg
Lactato y NH4	1 g
Na NO3	2 g
NH4Cl	0,1 g
KH2PO4	0,02 g
Extracto de levadura	0,1 g

Se ajusta el pH de ~6,2 a 6,4 con HCl.

Ejemplo 18

Caída de presión determinada en el tubo delgado inoculado alimentado continuamente que contiene arena en medio de salinidad alta

El tubo delgado 9b-2 del Ejemplo 16 se inoculó con BR5311 de *Pseudomonas stutzeri* (núm. ATCC: PTA-11283), se dejó madurar, y se tomaron muestras como se describe en el Ejemplo 17. Al finalizar el período de maduración, se alimentó continuamente la Salmuera núm. 5 en el tubo delgado 9b-2 a una velocidad de 3,6 ml/hora, se tomó una muestra del efluente, y se determinaron los recuentos de células, que se

presentan en la Tabla 13. La Salmuera núm. 5 tiene la misma concentración de componentes por litro que la dada para la Salmuera núm. 6 mencionada anteriormente, pero se diluyó 1 parte en 327 partes de la Salmuera núm. 4. Se continuó la alimentación de la Salmuera núm. 5 por la duración del experimento mientras se medía la caída de presión en este experimento (Figura 12). Se tomó una muestra del efluente después de 46 días, y se determinó el recuento de células. Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 13.

Inicialmente, la caída de presión fue de 0,0137 a 0,0274 megapascales (de 2 a 4 psi). Para el día 32, la caída de presión observada se había incrementado en aproximadamente un factor de 4 en comparación con la caída de presión inicial en el día 17. En el día 32,8, se detuvo la alimentación de la Salmuera núm. 5 que contiene nutrientes, y se alimentó en su lugar la Salmuera núm. 4 (agua de inyección esterilizada por filtración usada en un pozo petrolero en Alberta) hasta el día 38,7. Durante este período de 6 días, hubo una disminución en la caída de presión, aunque la presión permaneció significativamente mayor que la caída de presión inicial en el día 17. En el día 38,7, se alimentó nuevamente la Salmuera núm. 5 en el tubo delgado 9b. Entre los días 45 y 46, la caída de presión volvió a subir nuevamente, por lo que tuvo aproximadamente un factor de 6 más alto en comparación con la caída de presión inicial en el día 17. El pico de

presión a aproximadamente 44 días (Figura 12) fue una perturbación debido a un problema de funcionamiento del sistema. Esto demuestra el potencial de BR5311 de *Pseudomonas stutzeri* (núm. ATCC: PTA-11283) para modificar eficazmente la permeabilidad de rocas porosas cuando se alimenta continuamente en un medio acuoso de salinidad alta.

Tabla 13. Análisis de células en vivo del inóculo y muestras de tubos delgados

Recuentos de células	Tubo delgado 9a-2	Tubo delgado 9b-2
Después de la inoculación previa con salmuera de inyección en vivo	8,1 x10^4 ufc/ml	1,1 x10^4 UFC/ml
Inóculo de BR5311 de P. stutzeri	4 x10^6 ufc/ml	9,8 x10^5 ufc/ml
Efluente después de una maduración de 5 días	2,2 x10^6 ufc/ml	7,2 x10^5 ufc/ml
Efluente después de 46 días	4,2 x10^5 ufc/ml	1,1 x10^7 UFC/ml

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: Reivindicaciones:

1. Un método para mejorar la recuperación de petróleo de un yacimiento de petróleo; el método comprende:

a) proporcionar una composición que comprende:

i) por lo menos una cepa de *Pseudomonas stutzeri*; y

ii) un medio de crecimiento mínimo que comprende por lo menos un aceptor de electrones;

b) proporcionar un yacimiento de petróleo;

c) inocular el yacimiento de petróleo con la composición de (a) para que la *Pseudomonas stutzeri* se reproduzca y crezca en el yacimiento de petróleo; y

d) recuperar petróleo del yacimiento de petróleo;

en donde el crecimiento de la *Pseudomonas stutzeri* en el yacimiento petrolero mejora la recuperación de petróleo.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde la cepa de *Pseudomonas stutzeri* comprende una secuencia del ADNr 16S de sec. con núm. de ident.:8.

3. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde el yacimiento de petróleo comprende al menos un fluido

que tiene una concentración de sal que es de por lo menos de aproximadamente 30 partes por mil.

4. El método de conformidad con la reivindicación 1 o 3, en donde la cepa de *Pseudomonas stutzeri* es una cepa que pertenece al genomovar 1 o 3.

5. El método de conformidad con la reivindicación 1 o 3, en donde la cepa de *Pseudomonas stutzeri* se selecciona del grupo que consiste en BR5311 (núm. ATCC: PTA-11283), 89AC1-3 (núm. ATCC: PTA-11284) y LH4:15 (núm. ATCC: PTA-8823) de *Pseudomonas stutzeri*.

6. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde la composición de (a) comprende, además, uno o más microorganismos adicionales que crecen en presencia de petróleo en condiciones desnitrificantes.

7. El método de conformidad con la reivindicación 6, en donde uno o más microorganismos adicionales comprenden una especie *Shewanella*.

8. El método de conformidad con la reivindicación 7, en donde la especie *Shewanella* comprende un ADNr 16S que comprende las secuencias distintivas degeneradas de sec. con núms. de ident.: 39, 41 y 43.

9. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde el aceptor de electrones es por lo menos una sal iónica de nitrato.

10. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde el aceptor de electrones es por lo menos una sal iónica de nitrito o una combinación de por lo menos una sal de nitrito y por lo menos una sal de nitrato.

11. Un microorganismo aislado seleccionado del grupo que consiste en BR5311 de *Pseudomonas stutzeri* (núm. ATCC: PTA-11283) y 97AC1-3 de *Pseudomonas stutzeri* (núm. ATCC: PTA-11284).

12. Una composición que mejora la recuperación de petróleo; la composición comprende:

a) por lo menos un microorganismo aislado de conformidad con la reivindicación 11;

b) uno o más aceptores de electrones; y

c) por lo menos una fuente de carbono.

13. La composición de conformidad con la reivindicación 12, en donde el microorganismo de la reivindicación 11 produce una biopelícula obturadora.

14. La composición de conformidad con la reivindicación 12, en donde al menos una fuente de carbono se selecciona del grupo que consiste en lactato, acetato y succinato.

15. La composición de conformidad con la reivindicación 12, que comprende, además, uno o más microorganismos adicionales.

16. La composición de conformidad con la reivindicación 15, en donde uno o más microorganismos adicionales crecen en presencia de petróleo en condiciones desnitrificantes.

17. La composición de conformidad con la reivindicación 16, en donde uno o más microorganismos adicionales comprenden una especie *Shewanella*.

18. El método de conformidad con la reivindicación 17, en donde la especie *Shewanella* comprende un ADNr 16S que comprende las secuencias distintivas degeneradas de sec. con núms. de ident.:39, 41 y 43.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Se proporcionan métodos, microorganismos y composiciones que se caracterizan porque los yacimientos de petróleo se inoculan con microorganismos que pertenecen a *Pseudomonas stutzeri* y un medio que incluye un aceptor de electrones. La *Pseudomonas stutzeri* crece en el yacimiento de petróleo para formar biopelículas obturadoras que reducen la permeabilidad en áreas de formaciones subterráneas e incrementan, de este modo, la eficacia de barrido y mejoran, por lo tanto, la recuperación de petróleo.

Figura 1

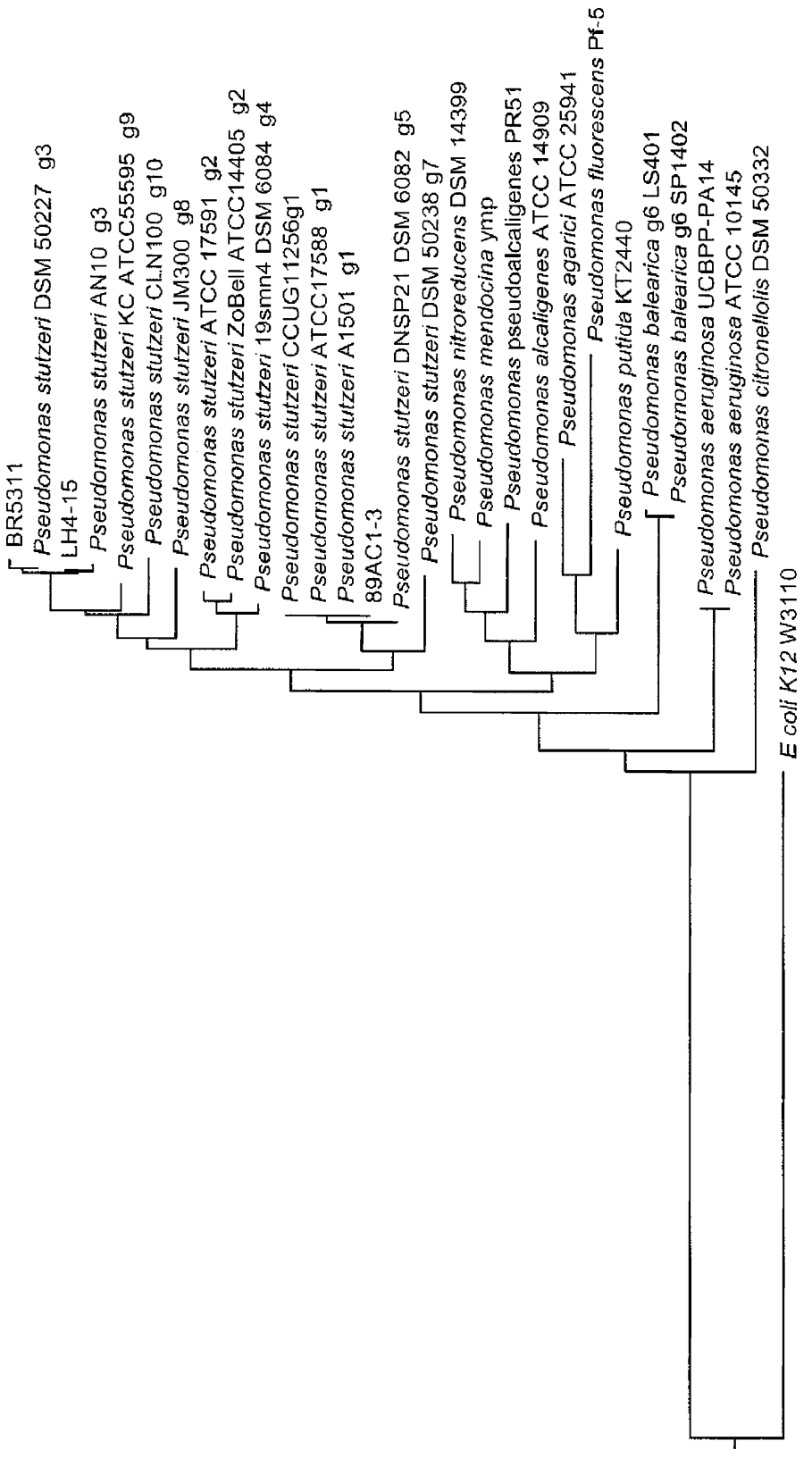

BR5311
Pseudomonas stutzeri DSM 50227 g3
LH4-15
Pseudomonas stutzeri AN10 g3
Pseudomonas stutzeri KC ATCC55595 g9
Pseudomonas stutzeri CLN100 g10
Pseudomonas stutzeri JM300 g8
Pseudomonas stutzeri ATCC 17591 g2
Pseudomonas stutzeri ZoBell ATCC14405 g2
Pseudomonas stutzeri 19smn4 DSM 6084 g4
Pseudomonas stutzeri CCUG11256g1
Pseudomonas stutzeri ATCC17588 g1
Pseudomonas stutzeri A1501 g1
89AC1-3
Pseudomonas stutzeri DNSP21 DSM 6082 g5
Pseudomonas stutzeri DSM 50238 g7
Pseudomonas nitroreducens DSM 14399
Pseudomonas mendocina ymp
Pseudomonas pseudoalcaligenes PR51
Pseudomonas alcaligenes ATCC 14909
Pseudomonas agarici ATCC 25941
Pseudomonas fluorescens Pf-5
Pseudomonas putida KT2440
Pseudomonas balearica g6 LS401
Pseudomonas balearica g6 SP1402
Pseudomonas aeruginosa UCBPP-PA14
Pseudomonas aeruginosa ATCC 10145
Pseudomonas citronellolis DSM 50332
E coli K12 W3110

Figura 2

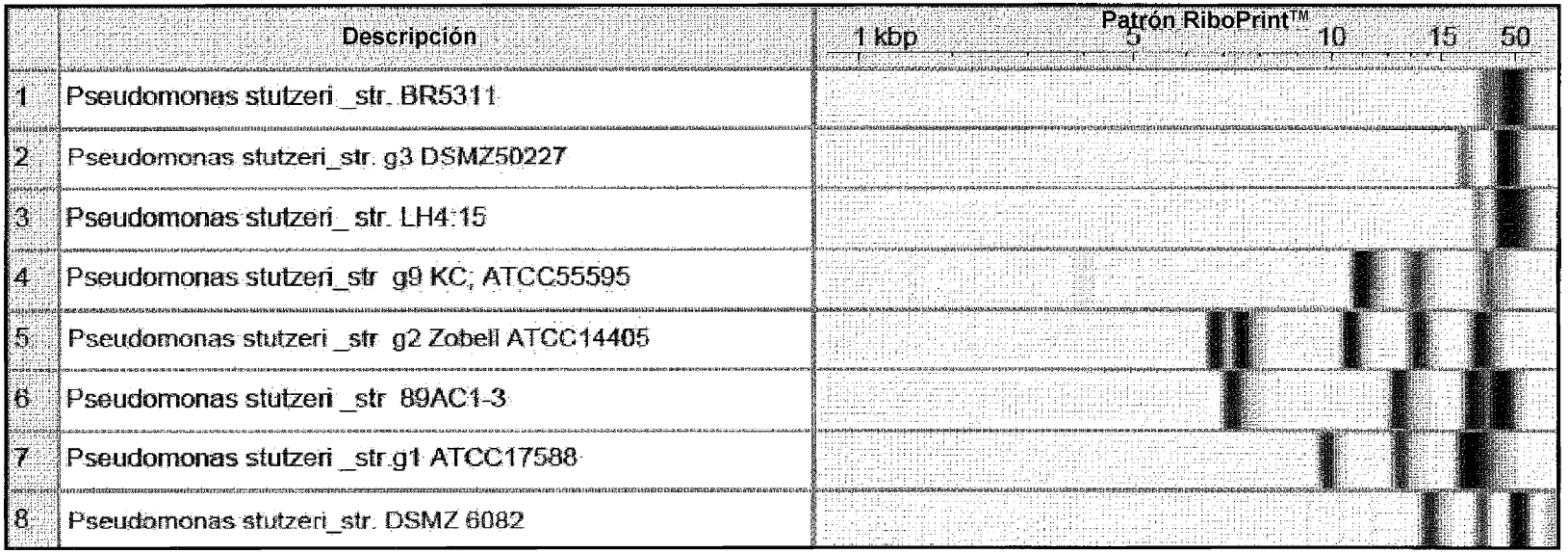

Descripción
Patrón RiboPrint™
1 kbp
5
10
15
50
1 Pseudomonas stutzeri _str. BR5311
2 Pseudomonas stutzeri_str. g3 DSMZ50227
3 Pseudomonas stutzeri_ str. LH4:15
4 Pseudomonas stutzeri_str g9 KC; ATCC55595
5 Pseudomonas stutzeri _str g2 Zobell ATCC14405
6 Pseudomonas stutzeri _str 89AC1-3
7 Pseudomonas stutzeri _str.g1 ATCC17588
8 Pseudomonas stutzeri_str. DSMZ 6082

Figura 3

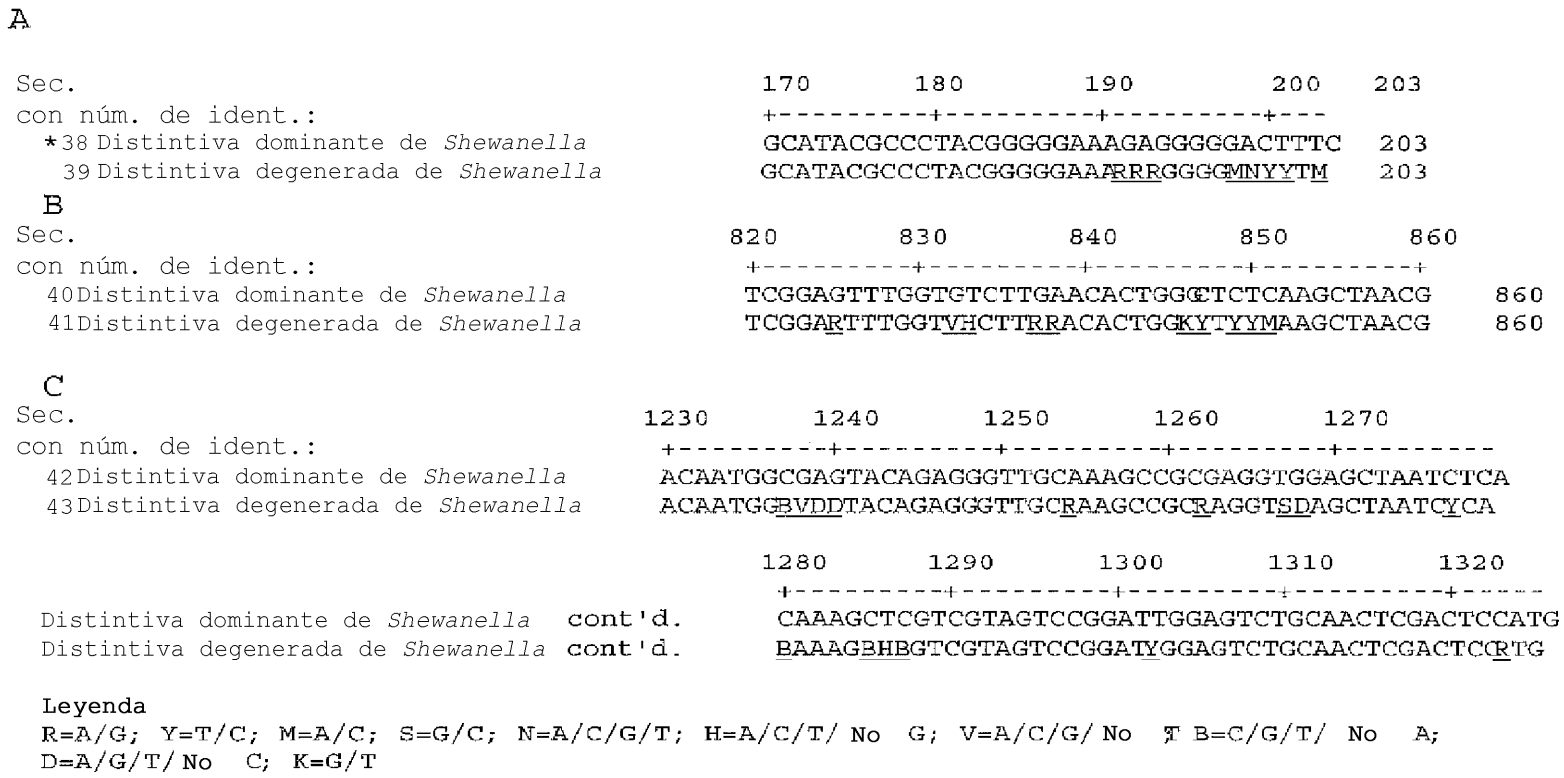

A
Sec.
con núm. de ident.:
170 180 190 200 203
*38 Distintiva dominante de Shewanella
GCATACGCCCTACGGGGGAAAGAGGGGGACTTTC 203
39 Distintiva degenerada de Shewanella
GCATACGCCCTACGGGGGAAARRRGGGGMNYYTM 203
B
Sec.
con núm. de ident.:
820 830 840 850 860
40 Distintiva dominante de Shewanella
TCGGAGTTTGGTGTCTTGAACACTGGGCTCTCAAGCTAACG 860
41 Distintiva degenerada de Shewanella
TCGGARTTTGGTVHCTTRRACACTGGKYTYYMAAGCTAACG 860
C
Sec.
con núm. de ident.:
1230 1240 1250 1260 1270
42 Distintiva dominante de Shewanella
ACAATGGCGAGTACAGAGGGTTGCAAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCTCA
43 Distintiva degenerada de Shewanella
ACAATGGBVDDTACAGAGGGTTGCRAAGCCGCRAGGTSDAGCTAATCYCA
1280 1290 1300 1310 1320
Distintiva dominante de Shewanella cont'd.
CAAAGCTCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATG
Distintiva degenerada de Shewanella cont'd.
BAAAGBHBGTCGTAGTCCGGATYGGAGTCTGCAACTCGACTCCRTG
Leyenda
R=A/G; Y=T/C; M=A/C; S=G/C; N=A/C/G/T; H=A/C/T/ No G; V=A/C/G/ No T B=C/G/T/ No A;
D=A/G/T/ No C; K=G/T

Figura 4

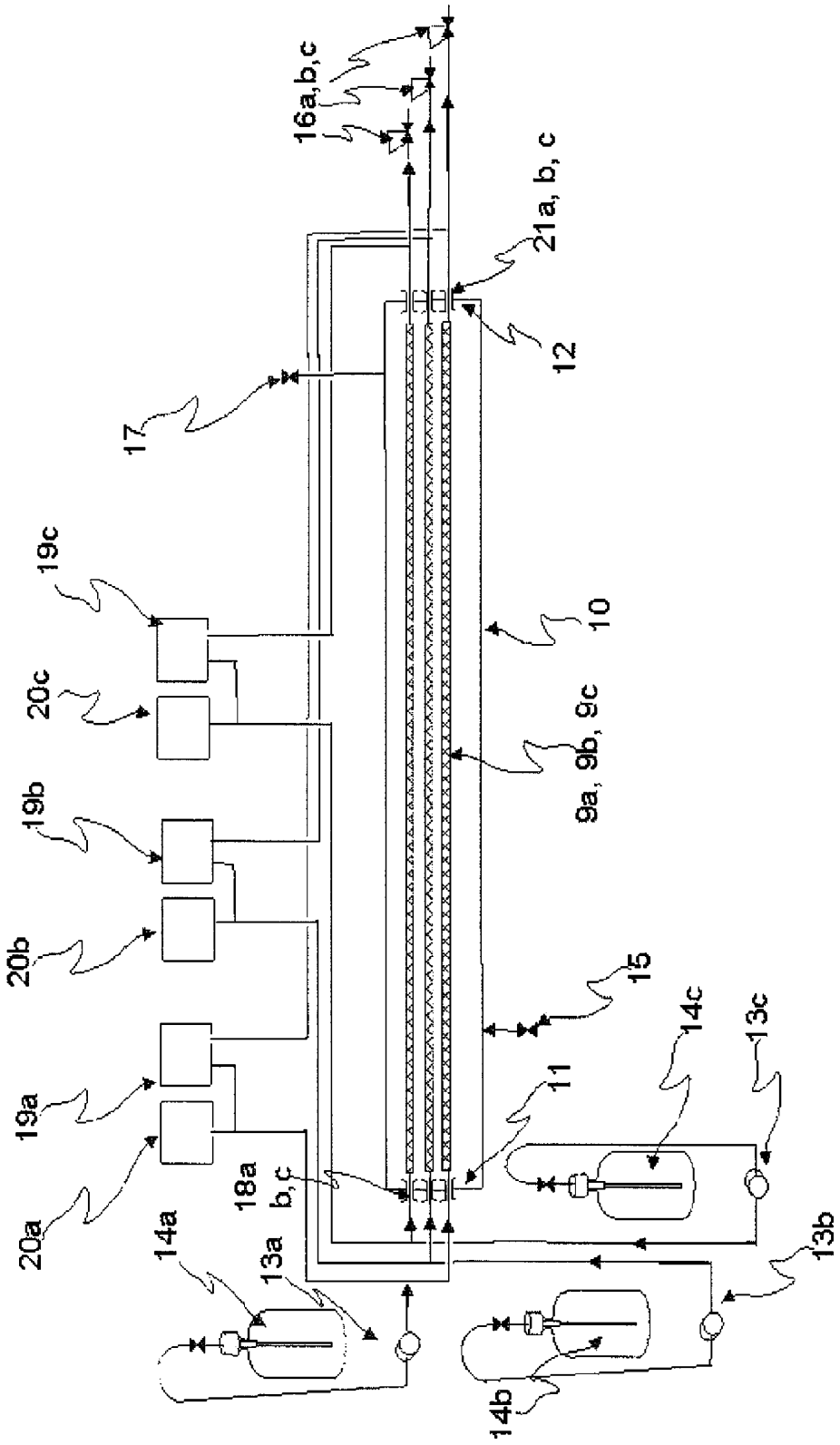

16a,b,c
21a, b, c
12
17
19c
20c
19b
20b
19a
20a
10
9a, 9b, 9c
15
14c
13c
11
18a b,c
14a
13a
13b
14b

Figura 5A

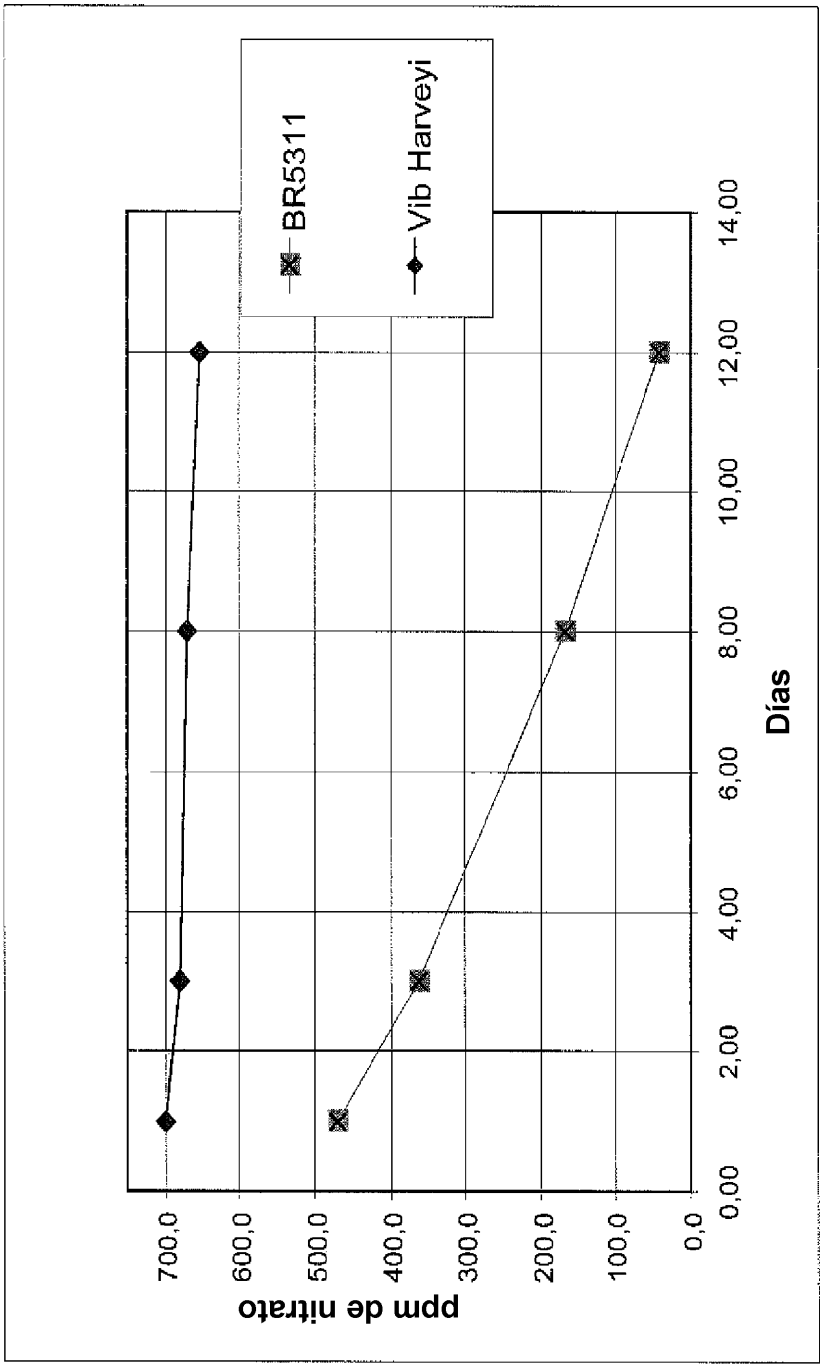

BR5311
Vib Harveyi
ppm de nitrato
700,0
600,0
500,0
400,0
300,0
200,0
100,0
0,0
0,00
2,00
4,00
6,00
8,00
10,00
12,00
14,00
Días

Figura 5B

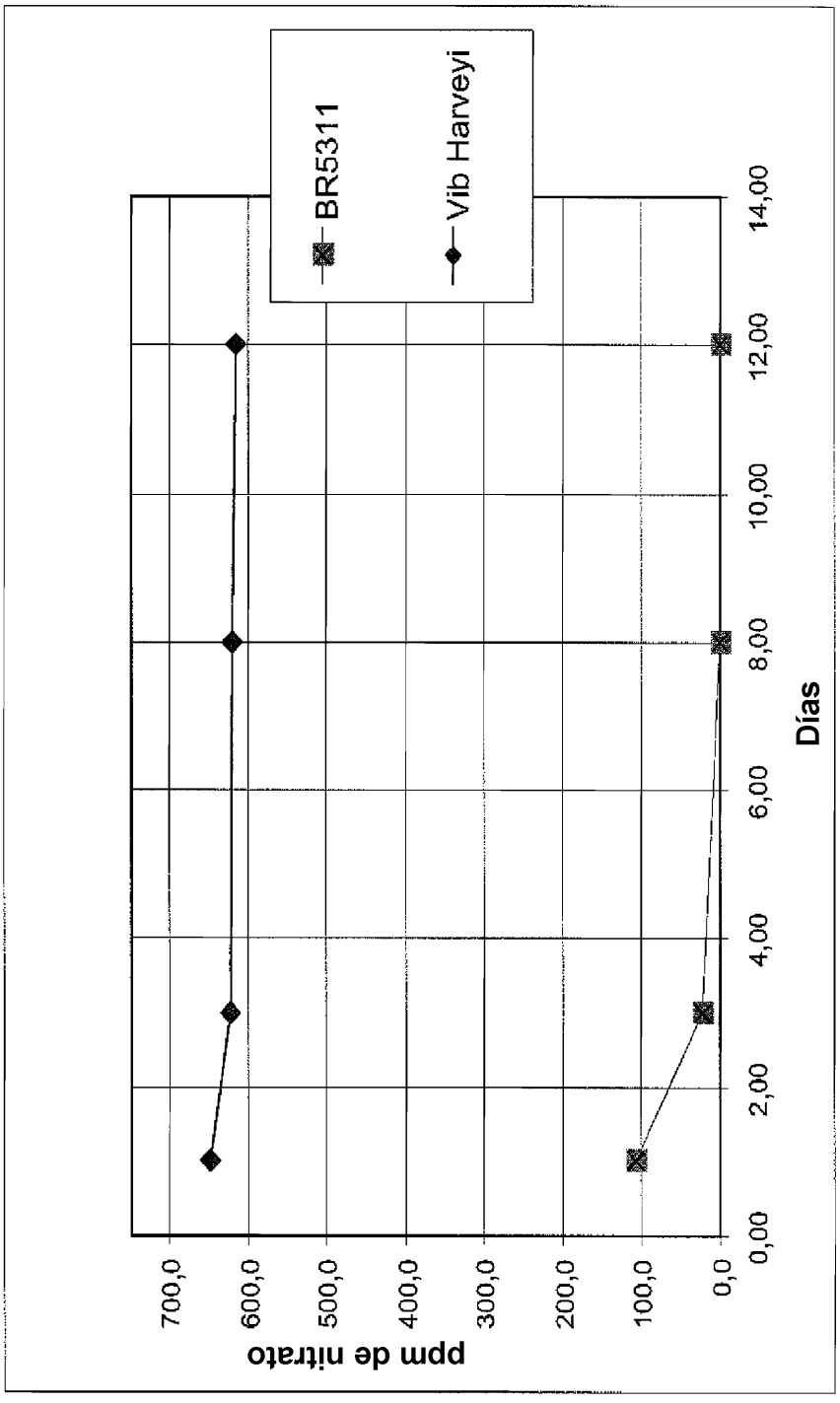

BR5311
Vib Harveyi
ppm de nitrato
Días
700,0
600,0
500,0
400,0
300,0
200,0
100,0
0,0
0,00
2,00
4,00
6,00
8,00
10,00
12,00
14,00

Figura 6

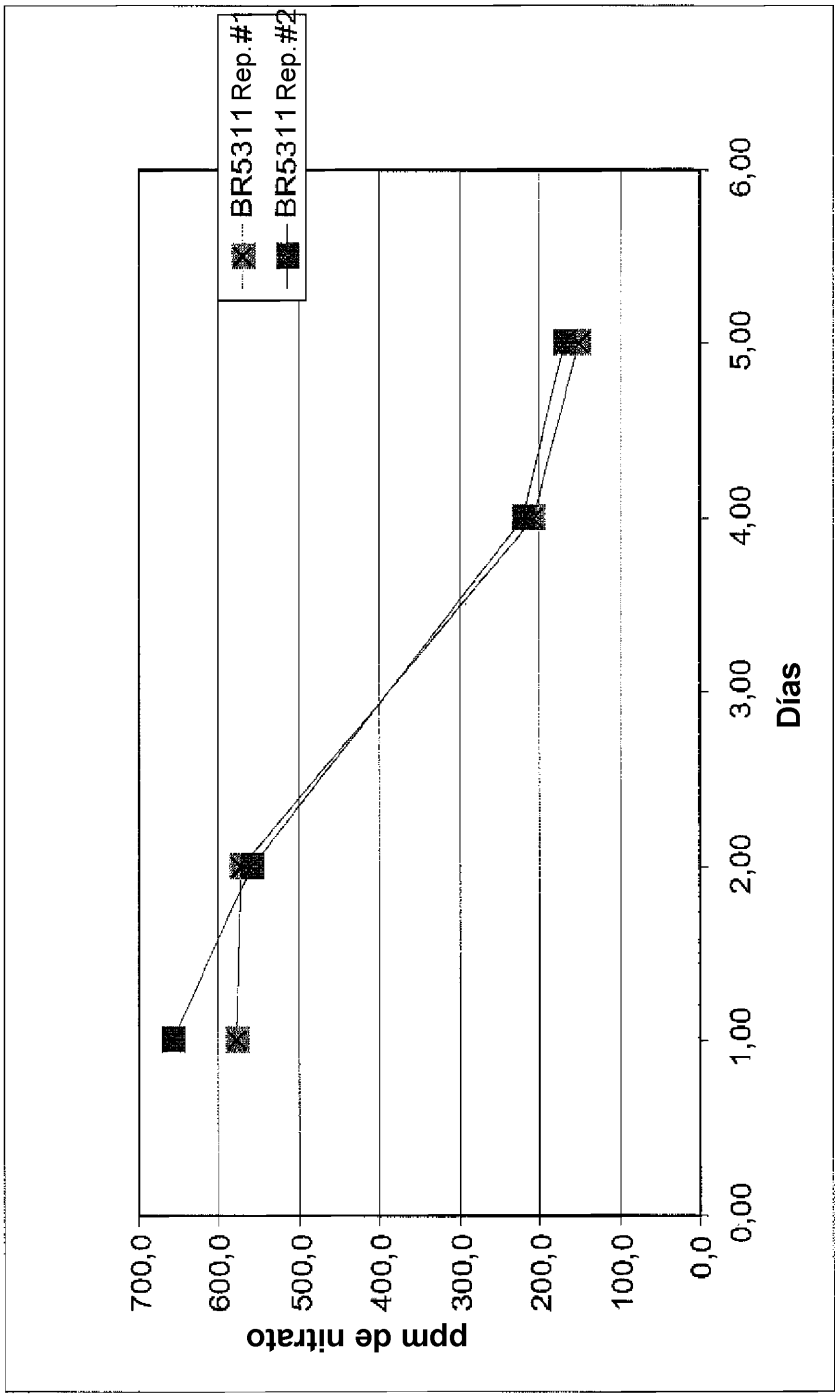
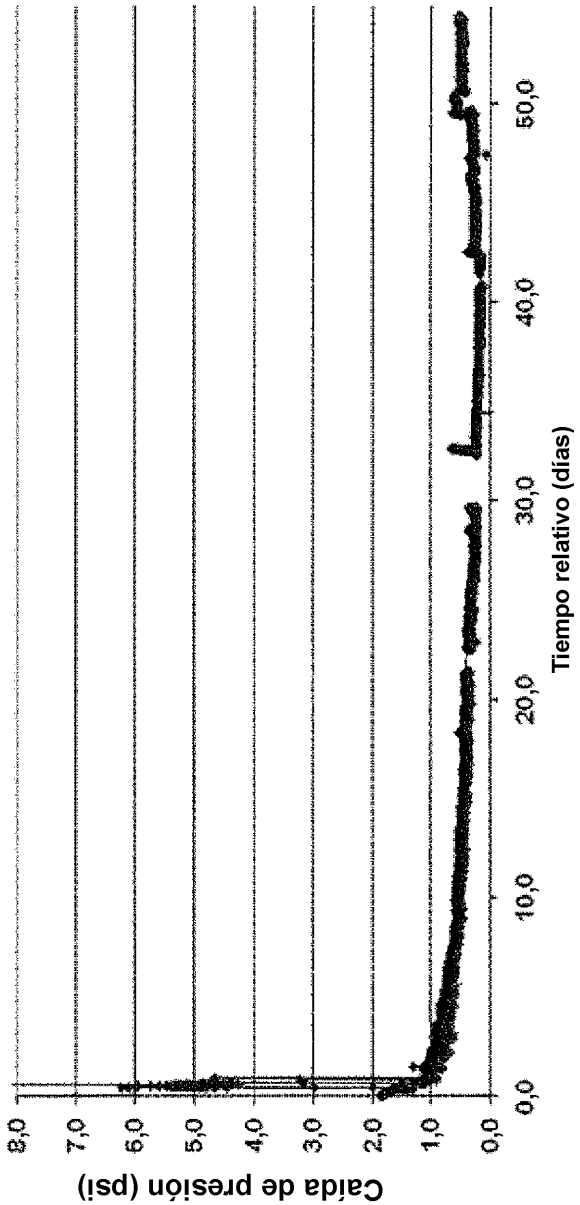

BR5311 Rep.#1
BR5311 Rep.#2
ppm de nitrato
700,0
600,0
500,0
400,0
300,0
200,0
100,0
0,0
0,00
1,00
2,00
3,00
4,00
5,00
6,00
Días

Figura 7


Caída de presión (psi)
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
0,0
10,0
20,0
30,0
40,0
50,0
Tiempo relativo (días)

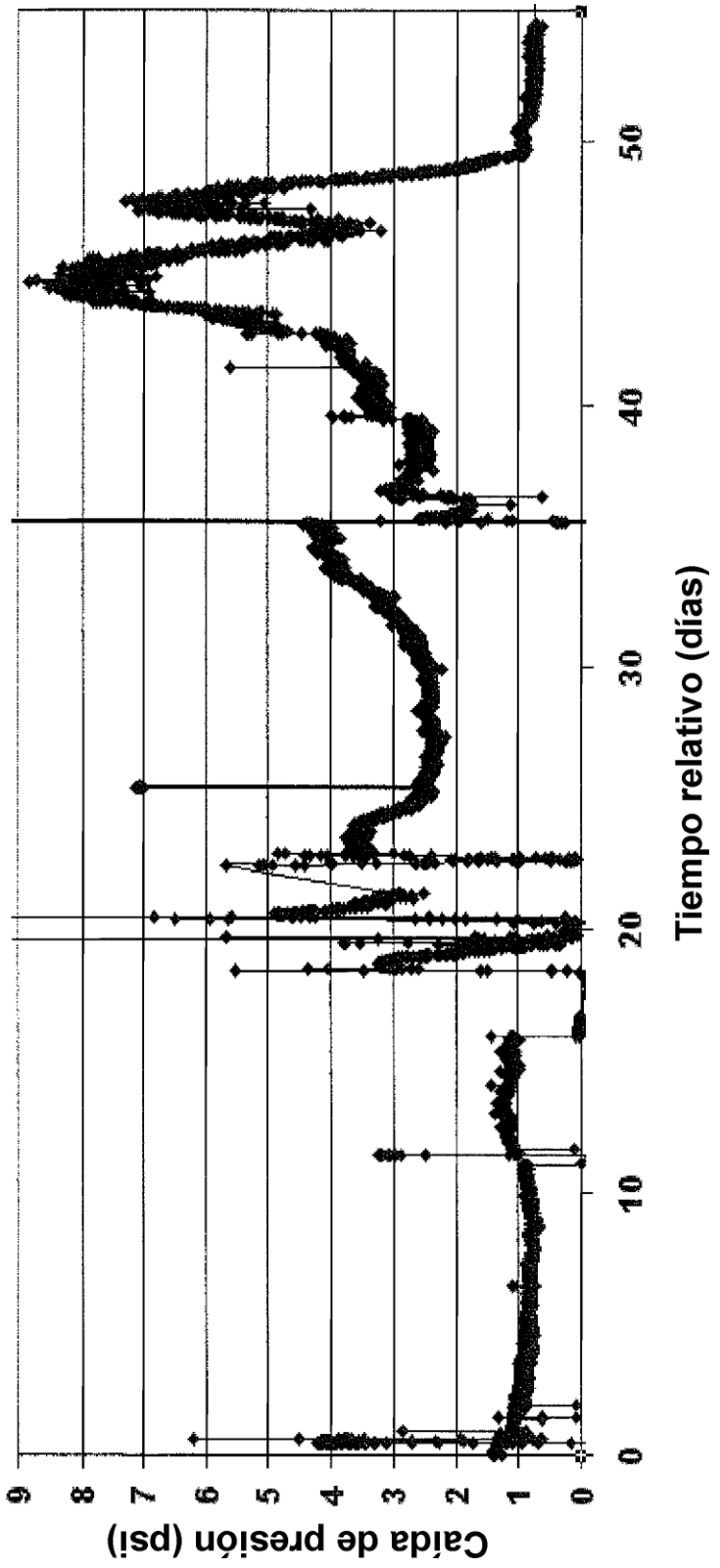

Caída de presión (psi)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
0
10
20
30
40
50
Tiempo relativo (días)

Figura 8

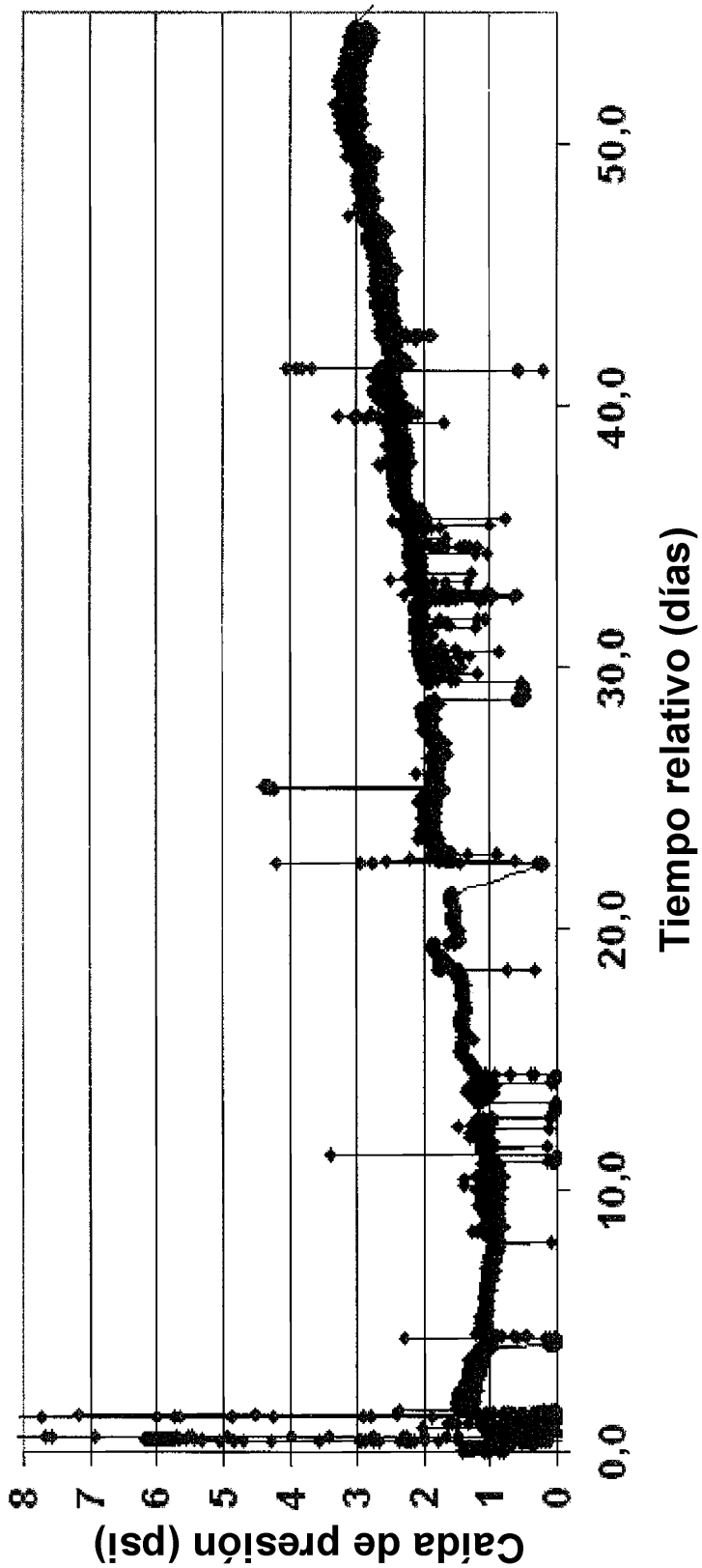

Caída de presión (psi)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
0,0
10,0
20,0
30,0
40,0
50,0
Tiempo relativo (días)

Figura 9

Figura 10

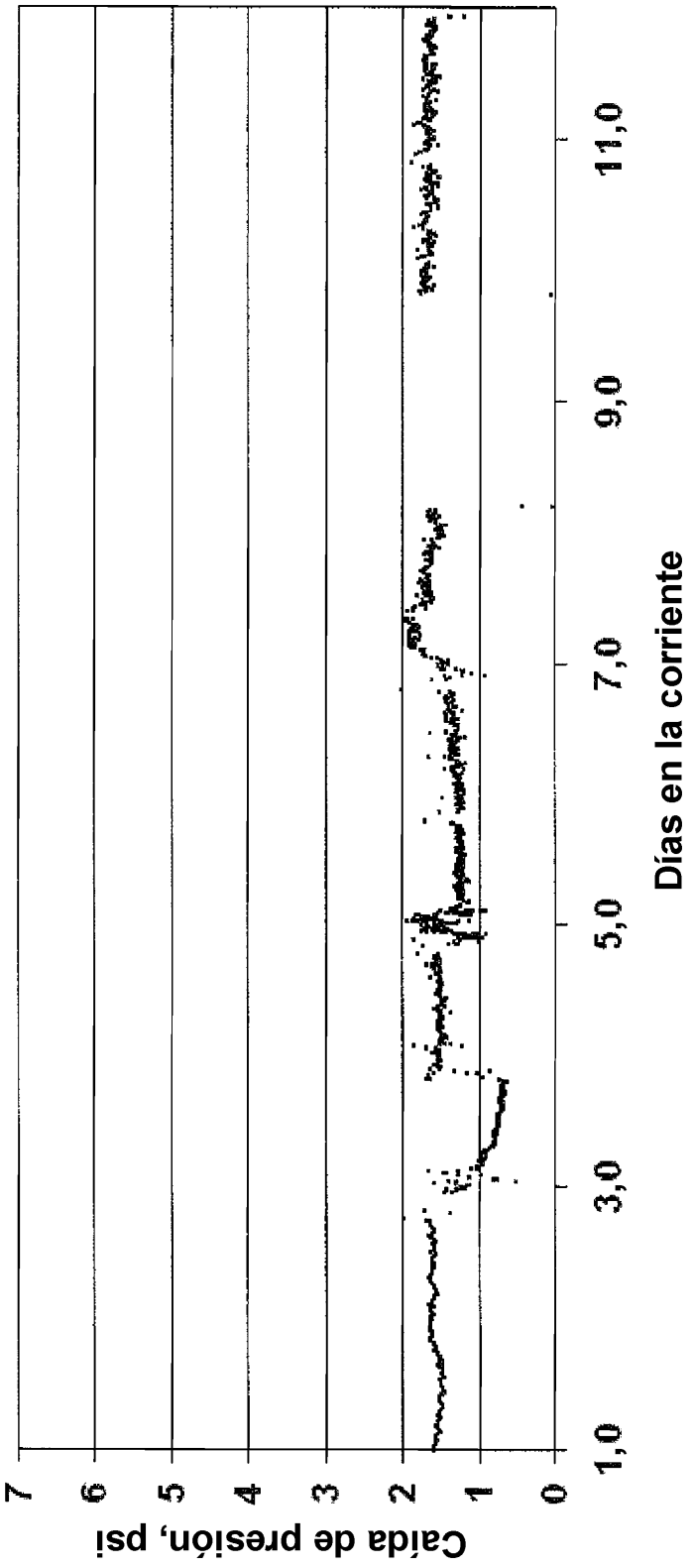
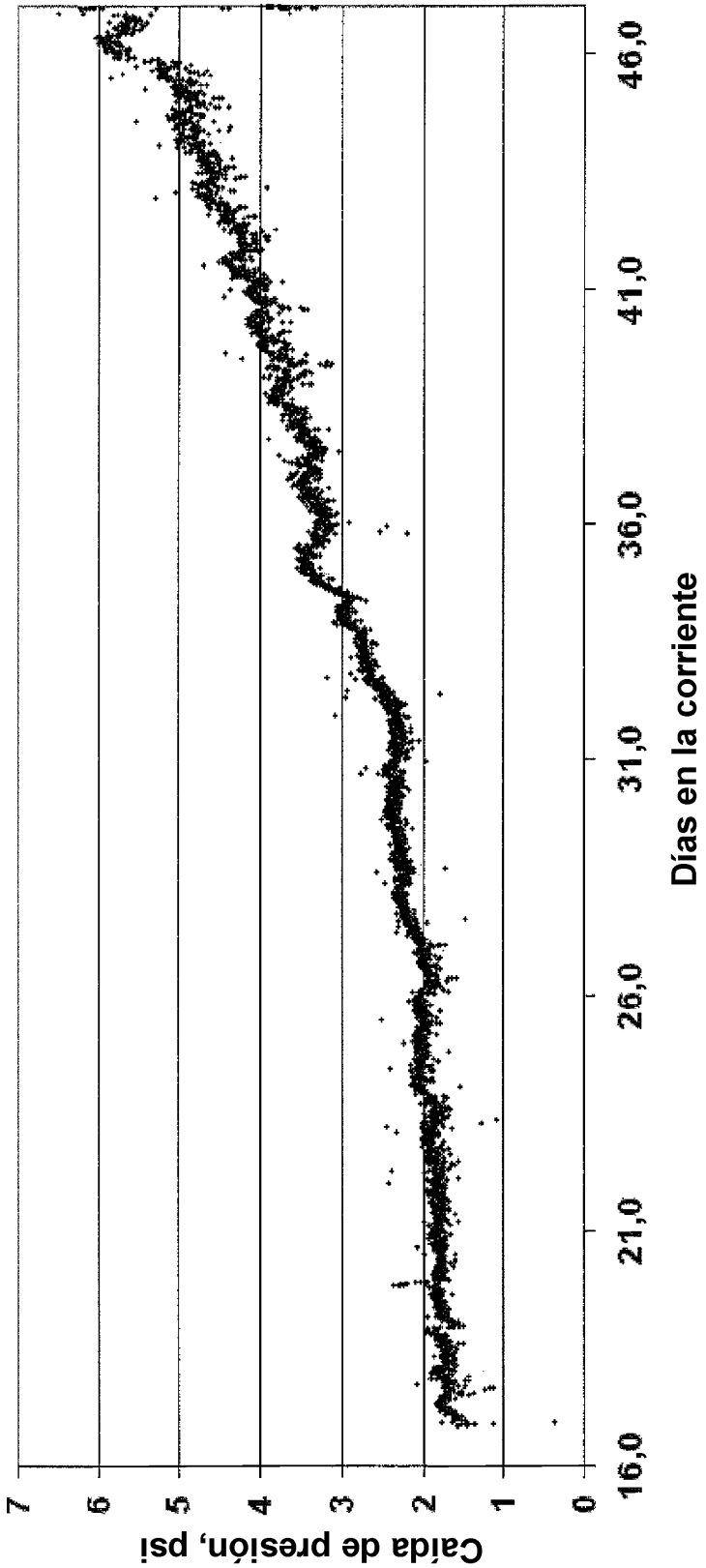

Caída de presión, psi
0
1
2
3
4
5
6
7
1,0
3,0
5,0
7,0
9,0
11,0
Días en la corriente

Figura 11


Caída de presión, psi
0
1
2
3
4
5
6
7
16,0
21,0
26,0
31,0
36,0
41,0
46,0
Días en la corriente

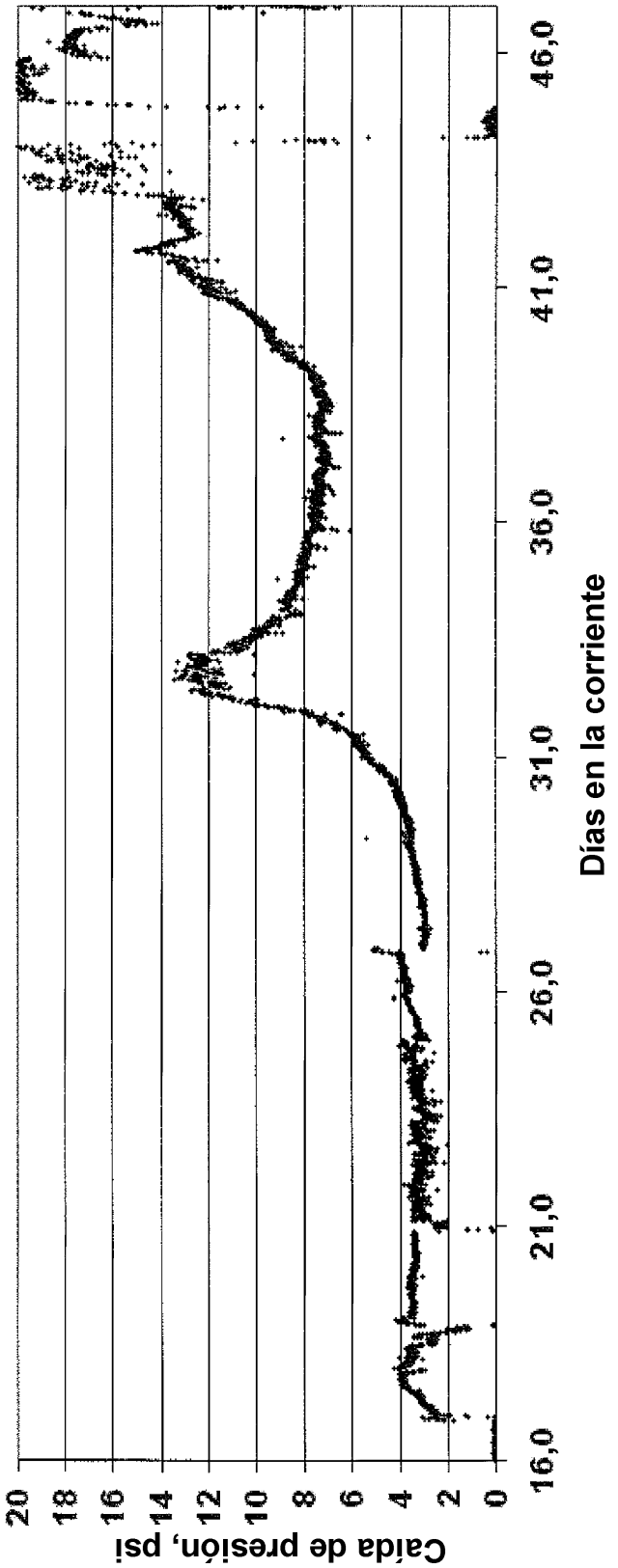

Caída de presión, psi
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
16,0
21,0
26,0
31,0
36,0
41,0
46,0
Días en la corriente

Figura 12

LISTA DE SECUENCIAS

<110> DuPont Company

Hendrickson, Edwin

Jackson, Scott

Fallon, Robert

Keeler, Sharon

Rees, Bethany

<120> MÉTODOS, CEPAS Y COMPOSICIONES ÚTILES PARA LA RECUPERACIÓN MEJORADA DE PETRÓLEO POR VÍA MICROBIANA: PSEUDOMONAS STUTZERI

<130> CL5094

<160> 44

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 1

cggttacctt gttacgactt 20

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 2

agagtttgat ymtggctcag 20

<210> 3

<211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 3

aacagctatg accatg 16

<210> 4

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 4

gtaaaacgac ggccagt 17

<210> 5

<211> 1436

<212> ADN

<213> Pseudomonas stutzeri

<400> 5

agtcgagcgg atgaagagag cttgctctct gattcagcgg cggacgggtg agtaatgcct 60

aggaatctgc ctgatagtgg gggacaacgt ttcgaaagga acgctaatac cgcatacgtc 120

ctacgggaga aagcagggga ccttcgggcc ttgcgctatc agatgagcct aggtcggatt 180

agctagttgg tgaggtaacg gctcaccaag gcgacgatcc gtaactggtc tgagaggatg 240

atcagtcaca ctggaactga gacacggtcc agactcctac gggaggcagc agtggggaat 300

attggacaat gggcgaaagc ctgatccagc catgccgcgt gtgtgaagaa ggtcttcgga 360

ttgtaaagca ctttaagttg ggaggaaggg cattaaccta atacgttagt gttttgacgt 420

taccgacaga ataagcaccg gctaacttcg tgccagcagc cgcggtaata cgaagggtgc 480

aagcgttaat cggaattact gggcgtaaag cgcgcgtagg tggtttgtta agttgaatgt 540

gaaagccccg ggctcaacct gggaactgca tccaaaactg gcaagctaga gtatggcaga 600

gggtggtgga atttcctgtg tagcggtgaa atgcgtagat ataggaagga acaccagtgg 660

cgaaggcgac cacctgggct aatactgaca ctgaggtgcg aaagcgtggg gagcaaacag 720

gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgtcga ctagccgttg ggatccttga 780

gatcttagtg gcgcagctaa cgcattaagt cgaccgcctg gggagtacgg ccgcaaggtt 840

aaaactcaaa tgaattgacg ggggcccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa 900

gcaacgcgaa gaaccttacc aggccttgac atgcagagaa ctttccagag atggattggt 960

gccttcggga actctgacac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt 1020

tgggttaagt cccgtaacga gcgcaaccct tgtccttagt taccagcacg ttaaggtggg 1080

cactctaagg agactgccgg tgacaaaccg gaggaaggtg gggatgacgt caagtcatca 1140

tggcccttac ggcctgggct acacacgtgc tacaatggtc ggtacaaagg gttgccaagc 1200

cgcgaggtgg agctaatccc ataaaaccga tcgtagtccg gatcgcagtc tgcaactcga 1260

ctgcgtgaag tcggaatcgc tagtaatcgt gaatcagaat gtcacggtga atacgttccc 1320

gggccttgca cacaccgccc gtcacaccat gggagtgggt tgctccagaa gtagctagtc 1380

taaccttcgg ggggacggtt accacggagt aattcatgac tggggtgaag tcgtaa 1436

<210> 6

<211> 1436

<212> ADN

<213> Pseudomonas stutzeri

<400> 6

agtcgagcgg atgagtggag cttgctccat gattcagcgg cggacgggtg agtaatgcct 60

aggaatctgc ctggtagtgg gggacaacgt ttcgaaagga acgctaatac cgcatacgtc 120

ctacgggaga aagtggggga tcttcggacc tcacgctatc agatgagcct aggtcggatt 180

agctagttgg tgaggtaaag gctcaccaag gcgacgatcc gtaactggtc tgagaggatg 240

atcagtcaca ctggaactga gacacggtcc agactcctac gggaggcagc agtggggaat 300

attggacaat gggcgaaagc ctgatccagc catgccgcgt gtgtgaagaa ggtcttcgga 360

ttgtaaagca ctttaagttg ggaggaaggg cagtaagtta ataccttgct gttttgacgt 420

taccaacaga ataagcaccg gctaacttcg tgccagcagc cgcggtaata cgaagggtgc 480

aagcgttaat cggaattact gggcgtaaag cgcgcgtagg tggttcgtta agttggatgt 540

gaaagccccg ggctcaacct gggaactgca tccaaaactg gcgagctaga gtatggcaga 600

gggtggtgga atttcctgtg tagcggtgaa atgcgtagat ataggaagga acaccagtgg 660

cgaaggcgac cacctgggct aatactgaca ctgaggtgcg aaagcgtggg gagcaaacag 720

gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgtcga ctagccgttg ggatccttga 780

gatcttagtg gcgcagctaa cgcattaagt cgaccgcctg gggagtacgg ccgcaaggtt 840

aaaactcaaa tgaattgacg ggggcccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa 900

gcaacgcgaa gaaccttacc aggccttgac atgcagagaa ctttccagag atggattggt 960

gccttcggga actctgacac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt 1020

tgggttaagt cccgtaacga gcgcaaccct tgtccttagt taccagcacg ttaaggtggg 1080

cactctaagg agactgccgg tgacaaaccg gaggaaggtg gggatgacgt caagtcatca 1140

tggcccttac ggcctgggct acacacgtgc tacaatggtc ggtacaaagg gttgccaagc 1200

cgcgaggtgg agctaatccc ataaaaccga tcgtagtccg gatcgcagtc tgcaactcga 1260

ctgcgtgaag tcggaatcgc tagtaatcgt gaatcagaat gtcacggtga atacgttccc 1320

gggccttgta cacaccgccc gtcacaccat gggagtgggt tgctccagaa gtagctagtc 1380

taaccttcgg ggggacggtt accacggagt gattcatgac tggggtgaag tcgtaa 1436

<210> 7

<211> 1435

<212> ADN

<213> Pseudomonas stutzeri

<400> 7

agtcgagcgg atgagtggag cttgctccat gattcagcgg cggacgggtg agtaatgcct 60

aggaatctgc ctggtagtgg gggacaacgt ttcgaaagga acgctatacc gcatacgtcc 120

tacgggagaa agtgggggat cttcggacct cacgctatca gatgagccta ggtcggatta 180

gctagttggt gaggtaaagg ctcaccaagg cgacgatccg taactggtct gagaggatga 240

tcagtcacac tggaactgag acacggtcca gactcctacg ggaggcagca gtggggaata 300

ttggacaatg ggcgaaagcc tgatccagcc atgccgcgtg tgtgaagaag gtcttcggat 360

tgtaaagcac tttaagttgg gaggaagggc agtaagttaa taccttgctg ttttgacgtt 420

accaacagaa taagcaccgg ctaacttcgt gccagcagcc gcggtaatac gaagggtgca 480

agcgttaatc ggaattactg ggcgtaaagc gcgcgtaggt ggttcgttaa gttggatgtg 540

aaagccccgg gctcaacctg ggaactgcat ccaaaactgg cgagctagag tatggcagag 600

ggtggtggaa tttcctgtgt agcggtgaaa tgcgtagata taggaaggaa caccagtggc 660

gaaggcgacc acctgggcta atactgacac tgaggtgcga aagcgtgggg agcaaacagg 720

attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgtcgac tagccgttgg gatccttgag 780

atcttagtgg cgcagctaac gcattaagtc gaccgcctgg ggagtacggc cgcaaggtta 840

aaactcaaat gaattgacgg gggcccgcac aagcggtgga gcatgtggtt taattcgaag 900

caacgcgaag aaccttacca ggccttgaca tgcagagaac tttccagaga tggattggtg 960

ccttcgggaa ctctgacaca ggtgctgcat ggctgtcgtc agctcgtgtc gtgagatgtt 1020

gggttaagtc ccgtaacgag cgcaaccctt gtccttagtt accagcacgt taaggtgggc 1080

actctaagga gactgccggt gacaaaccgg aggaaggtgg ggatgacgtc aagtcatcat 1140

ggcccttacg gcctgggcta cacacgtgct acaatggtcg gtacaaaggg ttgccaagcc 1200

gcgaggtgga gctaatccca taaaaccgat cgtagtccgg atcgcagtct gcaactcgac 1260

tgcgtgaagt cggaatcgct agtaatcgtg aatcagaatg tcacggtgaa tacgttcccg 1320

ggccttgtac acaccgcccg tcacaccatg ggagtgggtt gctccagaag tagctagtct 1380

aaccttcggg gggacggtta ccacggagtg attcatgact ggggtgaagt cgtaa 1435

<210> 8

<211> 1435

<212> ADN

<213> Pseudomonas stutzeri

<400> 8

agtcgagcgg atgarkrgag cttgctsymk gattcagcgg cggacgggtg agtaatrcct 60

aggaatctgc ctrdtagtgg gggacaacgt ttcgaaagga acgctatacc gcatacgtcc 120

tacgggagaa agyrggggay cttcggrcct yrcgctahya gatgagccta ggtcggatta 180

gctagttggt gaggtaahgg ctcaccaagg cdacgatccg taactggtct gagaggatga 240

tcagtcacac tggaactgag acacggtcca gactcctacg ggaggcagca gtggggaata 300

ttggacaatg ggcgaaagcc tgatccagcc atgccgcgtg tgtgaagaag gtcttcggat 360

tgtaaagcac tttaagttgg gaggaagggc agtaasytaa tacsttrstg ttttgacgtt 420

accracagaa taagcaccgg ctaacttcgt gccagcagcc gcggtaatac gaagggtgca 480

agcgttaatc ggaattactg ggcgtaaagc gcgcgtaggt ggttygttaa gttgratgtg 540

aaagccccgg gctcaacctg ggaactgcat ccaaaactgg cragctagag tatggcagag 600

ggtggtggaa tttcctgtgt agcggtgaaa tgcgtagata taggaaggaa caccagtggc 660

gaaggcgacc acctgggcta atactgacac tgaggtgcga aagcgtgggg agcaaacagg 720

attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgtcgac tagccgttgg gatccttgag 780

atcttagtgg cgcagctaac gcattaagtc gaccgcctgg ggagtacggc cgcaaggtta 840

aaactcaaat gaattgacgg gggcccgcac aagcggtgga gcatgtggtt taattcgaag 900

caacgcgaag aaccttacca ggccttgaca tgcwgagaac ytkccagaga tggmkkggtg 960

ccttcgggar ctcwgacaca ggtgctgcat ggctgtcgtc agctcgtgtc gtgagatgtt 1020

gggttaagtc ccgtaacgag cgcaaccctt gtccttagtt accagcacrt tawggtgggc 1080

actctaagga gactgccggt gacaaaccgg aggaaggtgg ggatgacgtc aagtcatcat 1140

ggcccttacg gcctgggcta cacacgtgct acaatggtcg gtacaaaggg ttgccaagcc 1200

gcgaggtgga gctaatccca taaaaccgat cgtagtccgg atcgcagtct gcaactcgac 1260

tgcgtgaagt cggaatcgct agtaatcgtg aatcagaatg tcacggtgaa tacgtycccg 1320

ggccttgyac acaccgcccg tcacaccatg ggagtgggtt gctccagaag tagctagtct 1380

aaccttcggg gggacggtta ccacggagtg attcatgact ggggtgaagt cgtaa 1435

<210> 9

<211> 1341

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 9

agtcgaacgg taacaggaag aagcttgctt ctttgctgac gagtggcgga cgggtgagta 60

atgtctggga aactgcctga tggagggggga taactactgg aaacggtagc taataccgca 120

taacgtcgca agaccaaaga gggggacctt cgggcctctt gccatcggat gtgcccagat 180

gggattagct agtaggtggg gtaacggctc acctaggcga cgatccctag ctggtctgag 240

aggatgacca gccacactgg aactgagaca cggtccagac tcctacggga ggcagcagtg 300

gggaatattg cacaatgggc gcaagcctga tgcagccatg ccgcgtgtat gaagaaggcc 360

ttcgggttgt aaagtacttt cagcggggag gaagggagta aagttaatac ctttgctcat 420

tgacgttacc cgcagaagaa gcaccggcta actccgtgcc agcagccgcg gtaatacgga 480

gggtgcaagc gttaatcgga attactgggc gtaaagcgca cgcaggcggt ttgttaagtc 540

agatgtgaaa tccccgggct caacctggga actgcatctg atactggcaa gcttgagtct 600

cgtagagggg ggtagaattc caggtgtagc ggtgaaatgc gtagagatct ggaggaatac 660

cggtggcgaa ggcggccccc tggacgaaga ctgacgctca ggtgcgaaag cgtggggagc 720

aaacaggatt agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga tgtcgacttg gaggttgtgc 780

ccttgaggcg tggcttccgg agctaacgcg ttaagtcgac cgcctgggga gtacggccgc 840

aaggttaaaa ctcaaatgaa ttgacggggg cccgcacaag cggtggagca tgtggtttaa 900

ttcgatgcaa cgcgaagaac cttacctggt cttgacatcc acggaagttt tcagagatga 960

gaatgtgcct tcgggaaccg tgagacaggt gctgcatggc tgtcgtcagc tcgtgttgtg 1020

aaatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aacccttatc ctttgttgcc agcggtccgg 1080

ccgggaactc aaaggagact gccagtgata aactggagga aggtggggat gacgtcaagt 1140

catcatggcc cttacgacca gggctacaca cgtgctacaa tggcgcatac aaagagaagc 1200

gacctcgcga gagcaagcgg acctcataaa gtgcgtcgta gtccggattg gagtctgcaa 1260

ctcgactcca tgaagtcgga atcgctagta atcgtggatc agaatgccac ggtgaatacg 1320

ttcccgggcc ttgtacacac c 1341

<210> 10

<211> 1336

<212> ADN

<213> Pseudomonas stutzeri

<400> 10

agtcgagcgg atgaagagag cttgctctct gattcagcgg cggacgggtg agtaatgcct 60

aggaatctgc ctgatagtgg gggacaacgt ttcgaaagga acgctaatac cgcatacgtc 120

ctacgggaga aagcagggga ccttcgggcc ttgcgctatc agatgagcct aggtcggatt 180

agctagttgg tgaggtaacg gctcaccaag gcgacgatcc gtaactggtc tgagaggatg 240

atcagtcaca ctggaactga gacacggtcc agactcctac gggaggcagc agtggggaat 300

attggacaat gggcgaaagc ctgatccagc catgccgcgt gtgtgaagaa ggtcttcgga 360

ttgtaaagca ctttaagttg ggaggaaggg cattaaccta atacgttagt gttttgacgt 420

taccgacaga ataagcaccg gctaacttcg tgccagcagc cgcggtaata cgaagggtgc 480

aagcgttaat cggaattact gggcgtaaag cgcgcgtagg tggtttgtta agttgaatgt 540

gaaagccccg ggctcaacct gggaactgca tccaaaactg gcaagctaga gtatggcaga 600

gggtggtgga atttcctgtg tagcggtgaa atgcgtagat ataggaagga acaccagtgg 660

cgaaggcgac cacctgggct aatactgaca ctgaggtgcg aaagcgtggg gagcaaacag 720

gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgtcga ctagccgttg ggatccttga 780

gatcttagtg gcgcagctaa cgcattaagt cgaccgcctg gggagtacgg ccgcaaggtt 840

aaaactcaaa tgaattgacg gggcccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa 900

gcaacgcgaa gaaccttacc aggccttgac atgcagagaa ctttccagag atggattggt 960

gccttcggga actctgacac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt 1020

tgggttaagt cccgtaacga gcgcaaccct tgtccttagt taccagcacg ttaaggtggg 1080

cactctaagg agactgccgg tgacaaaccg gaggaaggtg gggatgacgt caagtcatca 1140

tggcccttac ggcctgggct acacacgtgc tacaatggtc ggtacaaagg gttgccaagc 1200

cgcgaggtgg agctaatccc ataaaaccga tcgtagtccg gatcgcagtc tgcaactcga 1260

ctgcgtgaag tcggaatcgc tagtaatcgt gaatcagaat gtcacggtga atacgttccc 1320

gggccttgca cacacc 1336

<210> 11

<211> 1336

<212> ADN

<213> Pseudomonas stutzeri

<400> 11

agtcgagcgg atgagtggag cttgctccat gattcagcgg cggacgggtg agtaatgcct 60

aggaatctgc ctggtagtgg gggacaacgt ttcgaaagga acgctaatac cgcatacgtc 120

ctacgggaga aagtggggga tcttcggacc tcacgctatc agatgagcct aggtcggatt 180

agctagttgg tgaggtaaag gctcaccaag gcgacgatcc gtaactggtc tgagaggatg 240

atcagtcaca ctggaactga gacacggtcc agactcctac gggaggcagc agtggggaat 300

attggacaat gggcgaaagc ctgatccagc catgccgcgt gtgtgaagaa ggtcttcgga 360

ttgtaaagca ctttaagttg ggaggaaggg cagtaagtta ataccttgct gttttgacgt 420

taccaacaga ataagcaccg gctaacttcg tgccagcagc cgcggtaata cgaagggtgc 480

aagcgttaat cggaattact gggcgtaaag cgcgcgtagg tggttcgtta agttggatgt 540

gaaagccccg ggctcaacct gggaactgca tccaaaactg gcgagctaga gtatggcaga 600

gggtggtgga atttcctgtg tagcggtgaa atgcgtagat ataggaagga acaccagtgg 660

cgaaggcgac cacctgggct aatactgaca ctgaggtgcg aaagcgtggg gagcaaacag 720

gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgtcga ctagccgttg ggatccttga 780

gatcttagtg gcgcagctaa cgcattaagt cgaccgcctg gggagtacgg ccgcaaggtt 840

aaaactcaaa tgaattgacg gggcccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa 900

gcaacgcgaa gaaccttacc aggccttgac atgcagagaa ctttccagag atggattggt 960

gccttcggga actctgacac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt 1020

tgggttaagt cccgtaacga gcgcaaccct tgtccttagt taccagcacg ttaaggtggg 1080

cactctaagg agactgccgg tgacaaaccg gaggaaggtg gggatgacgt caagtcatca 1140

tggcccttac ggcctgggct acacacgtgc tacaatggtc ggtacaaagg gttgccaagc 1200

cgcgaggtgg agctaatccc ataaaaccga tcgtagtccg gatcgcagtc tgcaactcga 1260

ctgcgtgaag tcggaatcgc tagtaatcgt gaatcagaat gtcacggtga atacgttccc 1320

gggccttgta cacacc 1336

<210> 12

<211> 1336

<212> ADN

<213> Pseudomonas stutzeri

<400> 12

agtcgagcgg atgaagagag cttgctctct gattcagcgg cggacgggtg agtaatgcct 60

aggaatctgc ctgatagtgg gggacaacgt ttcgaaagga acgctaatac cgcatacgtc 120

ctacgggaga aagcagggga ccttcgggcc ttgcgctatc agatgagcct aggtcggatt 180

agctagttgg tgaggtaatg gctcaccaag gcgacgatcc gtaactggtc tgagaggatg 240

atcagtcaca ctggaactga gacacggtcc agactcctac gggaggcagc agtggggaat 300

attggacaat gggcgaaagc ctgatccagc catgccgcgt gtgtgaagaa ggtcttcgga 360

ttgtaaagca ctttaagttg ggaggaaggg cattaaccta atacgttagt gttttgacgt 420

taccgacaga ataagcaccg gctaacttcg tgccagcagc cgcggtaata cgaagggtgc 480

aagcgttaat cggaattact gggcgtaaag cgcgcgtagg tggtttgtta agttgaatgt 540

gaaagccccg ggctcaacct gggaactgca tccaaaactg gcaagctaga gtatggcaga 600

gggtggtgga atttcctgtg tagcggtgaa atgcgtagat ataggaagga acaccagtgg 660

cgaaggcgac cacctgggct aatactgaca ctgaggtgcg aaagcgtggg gagcaaacag 720

gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgtcga ctagccgttg ggatccttga 780

gatcttagtg gcgcagctaa cgcattaagt cgaccgcctg gggagtacgg ccgcaaggtt 840

aaaactcaaa tgaattgacg ggggcccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa 900

gcaacgcgaa gaaccttacc aggccttgac atgcagagaa ctttccagag atggattggt 960

gccttcggga actctgacac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt 1020

tgggttaagt cccgtaacga gcgcaaccct tgtccttagt taccagcacg ttaaggtggg 1080

cactctaagg agactgccgg tgacaaaccg gaggaaggtg gggatgacgt caagtcatca 1140

tggcccttac ggcctgggct acacacgtgc tacaatggtc ggtacaaagg gttgccaagc 1200

cgcgaggtgg agctaatccc ataaaaccga tcgtagtccg gatcgcagtc tgcaactcga 1260

ctgcgtgaag tcggaatcgc tagtaatcgt gaatcagaat gtcacggtga atacgttccc 1320

gggccttgta cacacc 1336

<210> 13

<211> 1336

<212> ADN

<213> Pseudomonas stutzeri

<400> 13

agtcgagcgg atgaagagag cttgctctct gattcagcgg cggacgggtg agtaatgcct 60

aggaatctgc ctgatagtgg gggacaacgt ttcgaaagga acgctaatac cgcatacgtc 120

ctacgggaga aagcagggga ccttcgggcc ttgcgctatc agatgagcct aggtcggatt 180

agctagttgg tgaggtaacg gctcaccaag gcgacgatcc gtaactggtc tgagaggatg 240

atcagtcaca ctggaactga gacacggtcc agactcctac gggaggcagc agtggggaat 300

attggacaat gggcgaaagc ctgatccagc catgccgcgt gtgtgaagaa ggtcttcgga 360

ttgtaaagca ctttaagttg ggaggaaggg cattaaccta atacgttagt gttttgacgt 420

taccgacaga ataagcaccg gctaacttcg tgccagcagc cgcggtaata cgaagggtgc 480

aagcgttaat cggaattact gggcgtaaag cgcgcgtagg tggtttgtta agttgaatgt 540

gaaagccccg ggctcaacct gggaactgca tccaaaactg gcaagctaga gtatggcaga 600

gggtggtgga atttcctgtg tagcggtgaa atgcgtagat ataggaagga acaccagtgg 660

cgaaggcgac cacctgggct aatactgaca ctgaggtgcg aaagcgtggg gagcaaacag 720

gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgtcga ctagccgttg ggatccttga 780

gatcttagtg gcgcagctaa cgcattaagt cgaccgcctg gggagtacgg ccgcaaggtt 840

aaaactcaaa tgaattgacg ggggcccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa 900

gcaacgcgaa gaaccttacc aggccttgac atgcagagaa ctttccagag atggattggt 960

gccttcggga actctgacac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt 1020

tgggttaagt cccgtaacga gcgcaaccct tgtccttagt taccagcacg ttaaggtggg 1080

cactctaagg agactgccgg tgacaaaccg gaggaaggtg gggatgacgt caagtcatca 1140

tggcccttac ggcctgggct acacacgtgc tacaatggtc ggtacaaagg gttgccaagc 1200

cgcgaggtgg agctaatccc ataaaaccga tcgtagtccg gatcgcagtc tgcaactcga 1260

ctgcgtgaag tcggaatcgc tagtaatcgt gaatcagaat gtcacggtga atacgttccc 1320

gggccttgta cacacc 1336

<210> 14

<211> 1336

<212> ADN

<213> Pseudomonas stutzeri

<400> 14

agtcgagcgg atgaagagag cttgctctct gattcagcgg cggacgggtg agtaatgcct 60

aggaatctgc ctgatagtgg gggacaacgt ttcgaaagga acgctaatac cgcatacgtc 120

ctaagggaga aagcagggga ccttcgggcc ttgcgctatc agatgagcct aggtcggatt 180

agctagttgg tgaggtaatg gctcaccaag gcgacgatcc gtaactggtc tgagaggatg 240

atcagtcaca ctggaactga gacacggtcc agactcctac gggaggcagc agtggggaat 300

attggacaat gggcgaaagc ctgatccagc catgccgcgt gtgtgaagaa ggtcttcgga 360

ttgtaaagca ctttaagttg ggaggaaggg cattaaccta atacgttagt gttttgacgt 420

taccgacaga ataagcaccg gctaacttcg tgccagcagc cgcggtaata cgaagggtgc 480

aagcgttaat cggaattact gggcgtaaag cgcgcgtagg tggtttgtta agttgaatgt 540

gaaagccccg ggctcaacct gggaactgca tccaaaactg gcaagctaga gtatggcaga 600

gggtggtgga atttcctgtg tagcggtgaa atgcgtagat ataggaagga acaccagtgg 660

cgaaggcgac cacctgggct aatactgaca ctgaggtgcg aaagcgtggg gagcaaacag 720

gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgtcga ctagccgttg ggatccttga 780

gatcttagtg gcgcagctaa cgcattaagt cgaccgcctg gggagtacgg ccgcaaggtt 840

aaaactcaaa tgaattgacg ggggcccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa 900

gcaacgcgaa gaaccttacc aggccttgac atgcagagaa ctttccagag atggattggt 960

gccttcggga actctgacac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt 1020

tgggttaagt cccgtaacga gcgcaaccct tgtccttagt taccagcacg ttaaggtggg 1080

cactctaagg agactgccgg tgacaaaccg gaggaaggtg gggatgacgt caagtcatca 1140

tggcccttac ggcctgggct acacacgtgc tacaatggtc ggtacaaagg gttgccaagc 1200

cgcgaggtgg agctaatccc ataaaaccga tcgtagtccg gatcgcagtc tgcaactcga 1260

ctgcgtgaag tcggaatcgc tagtaatcgt gaatcagaat gtcacggtga atacgttccc 1320

gggccttgta cacacc 1336

<210> 15

<211> 1336

<212> ADN

<213> Pseudomonas stutzeri

<400> 15

agtcgagcgg atgaagagag cttgctctct gattcagcgg cggacgggtg agtaatgcct 60

aggaatctgc ctattagtgg gggacaacgt ttcgaaagga acgctaatac cgcatacgtc 120

ctacgggaga aagcagggga ccttcgggcc ttgcgctaat agatgagcct aggtcggatt 180

agctagttgg tgaggtaaag gctcaccaag gcgacgatcc gtaactggtc tgagaggatg 240

atcagtcaca ctggaactga gacacggtcc agactcctac gggaggcagc agtggggaat 300

attggacaat gggcgaaagc ctgatccagc catgccgcgt gtgtgaagaa ggtcttcgga 360

ttgtaaagca ctttaagttg ggaggaaggg cagtaagtta ataccttgtt gttttgacgt 420

taccgacaga ataagcaccg gctaacttcg tgccagcagc cgcggtaata cgaagggtgc 480

aagcgttaat cggaattact gggcgtaaag cgcgcgtagg tggttcgtta agttggatgt 540

gaaagccccg ggctcaacct gggaactgca tccaaaactg gcgagctaga gtatggcaga 600

gggtggtgga atttcctgtg tagcggtgaa atgcgtagat ataggaagga acaccagtgg 660

cgaaggcgac cacctgggct aatactgaca ctgaggtgcg aaagcgtggg gagcaaacag 720

gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgtcga ctagccgttg ggatccttga 780

gatcttagtg gcgcagctaa cgcattaagt cgaccgcctg gggagtacgg ccgcaaggtt 840

aaaactcaaa tgaattgacg ggggcccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa 900

gcaacgcgaa gaaccttacc aggccttgac atgcagagaa ctttccagag atggattggt 960

gccttcggga gctctgacac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt 1020

tgggttaagt cccgtaacga gcgcaaccct tgtccttagt taccagcacg ttatggtggg 1080

cactctaagg agactgccgg tgacaaaccg gaggaaggtg gggatgacgt caagtcatca 1140

tggcccttac ggcctgggct acacacgtgc tacaatggtc ggtacaaagg gttgccaagc 1200

cgcgaggtgg agctaatccc ataaaaccga tcgtagtccg gatcgcagtc tgcaactcga 1260

ctgcgtgaag tcggaatcgc tagtaatcgt gaatcagaat gtcacggtga atacgttccc 1320

gggccttgta cacacc 1336

<210> 16

<211> 1336

<212> ADN

<213> Pseudomonas stutzeri

<400> 16

agtcgagcgg atgaagagag cttgctgtct gattcagcgg cggacgggtg agtaatgcct 60

aggaatctgc ctattagtgg gggacaacgt ttcgaaagga acgctaatac cgcatacgtc 120

ctacgggaga aagcagggga ccttcgggcc ttgcgctaat agatgagcct aggtcggatt 180

agctagttgg tgaggtaaag gctcaccaag gcgacgatcc gtaactggtc tgagaggatg 240

atcagtcaca ctggaactga gacacggtcc agactcctac gggaggcagc agtggggaat 300

attggacaat gggcgaaagc ctgatccagc catgccgcgt gtgtgaagaa ggtcttcgga 360

ttgtaaagca ctttaagttg ggaggaaggg cagtaagtta ataccttgct gttttgacgt 420

taccgacaga ataagcaccg gctaacttcg tgccagcagc cgcggtaata cgaagggtgc 480

aagcgttaat cggaattact gggcgtaaag cgcgcgtagg tggttcgtta agttggatgt 540

gaaagccccg ggctcaacct gggaactgca tccaaaactg gcgagctaga gtatggcaga 600

gggtggtgga atttcctgtg tagcggtgaa atgcgtagat ataggaagga acaccagtgg 660

cgaaggcgac cacctgggct aatactgaca ctgaggtgcg aaagcgtggg gagcaaacag 720

gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgtcga ctagccgttg ggatccttga 780

gatcttagtg gcgcagctaa cgcattaagt cgaccgcctg gggagtacgg ccgcaaggtt 840

aaaactcaaa tgaattgacg ggggcccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa 900

gcaacgcgaa gaaccttacc aggccttgac atgcagagaa ctttccagag atggattggt 960

gccttcggga gctctgacac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt 1020

tgggttaagt cccgtaacga gcgcaaccct tgtccttagt taccagcacg ttatggtggg 1080

cactctaagg agactgccgg tgacaaaccg gaggaaggtg gggatgacgt caagtcatca 1140

tggcccttac ggcctgggct acacacgtgc tacaatggtc ggtacaaagg gttgccaagc 1200

cgcgaggtgg agctaatccc ataaaaccga tcgtagtccg gatcgcagtc tgcaactcga 1260

ctgcgtgaag tcggaatcgc tagtaatcgt gaatcagaat gtcacggtga atacgttccc 1320

gggccttgta cacacc 1336

<210> 17

<211> 1340

<212> ADN

<213> Pseudomonas stutzeri

<400> 17

atccagtcga gcggatgagt ggagcttgct ccatgattca gcggcggacg ggtgagtaat 60

gcctaggaat ctgcctggta gtgggggaca acgtttcgaa aggaacgcta ataccgcata 120

cgtcctacgg gagaaagtgg gggatcttcg gacctcacgc tatcagatga gcctaggtcg 180

gattagctag ttggtgaggt aaaggctcac caaggcgacg atccgtaact ggtctgagag 240

gatgatcagt cacactggaa ctgagacacg gtccagactc ctacgggagg cagcagtggg 300

gaatattgga caatgggcga aagcctgatc cagccatgcc gcgtgtgtga agaaggtctt 360

cggattgtaa agcactttaa gttgggagga agggcagtaa gttaatacct tgctgttttg 420

acgttaccaa cagaataagc accggctaac ttcgtgccag cagccgcggt aatacgaagg 480

gtgcaagcgt taatcggaat tactgggcgt aaagcgcgcg taggtggttc gttaagttgg 540

atgtgaaagc cccgggctca acctgggaac tgcatccaaa actggcgagc tagagtatgg 600

cagagggtgg tggaatttcc tgtgtagcgg tgaaatgcgt agatatagga aggaacacca 660

gtggcgaagg cgaccacctg ggctaatact gacactgagg tgcgaaagcg tggggagcaa 720

acaggattag ataccctggt agtccacgcc gtaaacgatg tcgactagcc gttgggatcc 780

ttgagatctt agtggcgcag ctaacgcatt aagtcgaccg cctggggagt acggccgcaa 840

ggttaaaact caaatgaatt gacgggggcc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt 900

cgaagcaacg cgaagaacct taccaggcct tgacatgcag agaactttcc agagatggat 960

tggtgccttc gggaactctg acacaggtgc tgcatggctg tcgtcagctc gtgtcgtgag 1020

atgttgggtt aagtcccgta acgagcgcaa cccttgtcct tagttaccag cacgttaagg 1080

tgggcactct aaggagactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaagtc 1140

atcatggccc ttacggcctg ggctacacac gtgctacaat ggtcggtaca aagggttgcc 1200

aagccgcgag gtggagctaa tcccataaaa ccgatcgtag tccggatcgc agtctgcaac 1260

tcgactgcgt gaagtcggaa tcgctagtaa tcgtgaatca gaatgtcacg gtgaatacgt 1320

tcccgggcct tgtacacacc 1340

<210> 18

<211> 1336

<212> ADN

<213> Pseudomonas stutzeri

<400> 18

agtcgagcgg atgagtggag cttgctccat gattcagcgg cggacgggtg agtaatgcct 60

aggaatctgc ctggtagtgg gggacaacgt ttcgaaagga acgctaatac cgcatacgtc 120

ctacgggaga aagtggggga tcttcggacc tcacgctatc agatgagcct aggtcggatt 180

agctagttgg tgaggtaaag gctcaccaag gcgacgatcc gtaactggtc tgagaggatg 240

atcagtcaca ctggaactga gacacggtcc agactcctac gggaggcagc agtggggaat 300

attggacaat gggcgaaagc ctgatccagc catgccgcgt gtgtgaagaa ggtcttcgga 360

ttgtaaagca ctttaagttg ggaggaaggg cagtaagtta ataccttgct gttttgacgt 420

taccaacaga ataagcaccg gctaacttcg tgccagcagc cgcggtaata cgaagggtgc 480

aagcgttaat cggaattact gggcgtaaag cgcgcgtagg tggttcgtta agttggatgt 540

gaaagccccg ggctcaacct gggaactgca tccaaaactg gcgagctaga gtatggcaga 600

gggtggtgga atttcctgtg tagcggtgaa atgcgtagat ataggaagga acaccagtgg 660

cgaaggcgac cacctgggct aatactgaca ctgaggtgcg aaagcgtggg gagcaaacag 720

gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgtcga ctagccgttg ggatccttga 780

gatcttagtg gcgcagctaa cgcattaagt cgaccgcctg gggagtacgg ccgcaaggtt 840

aaaactcaaa tgaattgacg gggcccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa 900

gcaacgcgaa gaaccttacc aggccttgac atgcagagaa ctttccagag atggattggt 960

gccttcggga actctgacac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt 1020

tgggttaagt cccgtaacga gcgcaaccct tgtccttagt taccagcacg ttaaggtggg 1080

cactctaagg agactgccgg tgacaaaccg gaggaaggtg gggatgacgt caagtcatca 1140

tggcccttac ggcctgggct acacacgtgc tacaatggtc ggtacaaagg gttgccaagc 1200

cgcgaggtgg agctaatccc ataaaaccga tcgtagtccg gatcgcagtc tgcaactcga 1260

ctgcgtgaag tcggaatcgc tagtaatcgt gaatcagaat gtcacggtga atacgttccc 1320

gggccttgta cacacc 1336

<210> 19

<211> 1336

<212> ADN

<213> Pseudomonas stutzeri

<400> 19

agtcgagcgg atgaagggag cttgctctct gattcagcgg cggacgggtg agtaatgcct 60

aggaatctgc ctattagtgg gggacaacgt ttcgaaagga acgctaatac cgcatacgtc 120

ctacgggaga aagcagggga ccttcgggcc ttgcgctaat agatgagcct aggtcggatt 180

agctagttgg tgaggtaaag gctcaccaag gcaacgatcc gtaactggtc tgagaggatg 240

atcagtcaca ctggaactga gacacggtcc agactcctac gggaggcagc agtggggaat 300

attggacaat gggcgaaagc ctgatccagc catgccgcgt gtgtgaagaa ggtcttcgga 360

ttgtaaagca ctttaagttg ggaggaaggg cagtaagtta ataccttgct gttttgacgt 420

taccgacaga ataagcaccg gctaacttcg tgccagcagc cgcggtaata cgaagggtgc 480

aagcgttaat cggaattact gggcgtaaag cgcgcgtagg tggttcgtta agttggatgt 540

gaaagccccg ggctcaacct gggaactgca tccaaaactg gcgagctaga gtatggcaga 600

gggtggtgga atttcctgtg tagcggtgaa atgcgtagat ataggaagga acaccagtgg 660

cgaaggcgac cacctgggct aatactgaca ctgaggtgcg aaagcgtggg gagcaaacag 720

gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgtcga ctagccgttg ggatccttga 780

gatcttagtg gcgcagctaa cgcattaagt cgaccgcctg gggagtacgg ccgcaaggtt 840

aaaactcaaa tgaattgacg ggggcccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa 900

gcaacgcgaa gaaccttacc aggccttgac atgcagagaa ctttccagag atggattggt 960

gccttcggga actctgacac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt 1020

tgggttaagt cccgtaacga gcgcaaccct tgtccttagt taccagcacg ttatggtggg 1080

cactctaagg agactgccgg tgacaaaccg gaggaaggtg gggatgacgt caagtcatca 1140

tggcccttac ggcctgggct acacacgtgc tacaatggtc ggtacaaagg gttgccaagc 1200

cgcgaggtgg agctaatccc ataaaaccga tcgtagtccg gatcgcagtc tgcaactcga 1260

ctgcgtgaag tcggaatcgc tagtaatcgt gaatcagaat gtcacggtga atacgttccc 1320

gggccttgta cacacc 1336

<210> 20

<211> 1336

<212> ADN

<213> Pseudomonas stutzeri

<400> 20

agtcgagcgg atgagtggag cttgctccat gattcagcgg cggacgggtg agtaatgcct 60

aggaatctgc ctggtagtgg gggacaacgt ttcgaaagga acgctaatac cgcatacgtc 120

ctacgggaga aagtggggga tcttcggacc tcacgctatc agatgagcct aggtcggatt 180

agctagttgg tgaggtaaag gctcaccaag gcgacgatcc gtaactggtc tgagaggatg 240

atcagtcaca ctggaactga gacacggtcc agactcctac gggaggcagc agtggggaat 300

attggacaat gggcgaaagc ctgatccagc catgccgcgt gtgtgaagaa ggtcttcgga 360

ttgtaaagca ctttaagttg ggaggaaggg cagtaagtta ataccttgct gttttgacgt 420

taccgacaga ataagcaccg gctaacttcg tgccagcagc cgcggtaata cgaagggtgc 480

aagcgttaat cggaattact gggcgtaaag cgcgcgtagg tggttcgtta agttggatgt 540

gaaagccccg ggctcaacct gggaactgca tccaaaactg gcgagctaga gtatggcaga 600

gggtggtgga atttcctgtg tagcggtgaa atgcgtagat ataggaagga acaccagtgg 660

cgaaggcgac cacctgggct aatactgaca ctgaggtgcg aaagcgtggg gagcaaacag 720

gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgtcga ctagccgttg ggatccttga 780

gatcttagtg gcgcagctaa cgcattaagt cgaccgcctg gggagtacgg ccgcaaggtt 840

aaaactcaaa tgaattgacg gggcccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa 900

gcaacgcgaa gaaccttacc aggccttgac atgcagagaa ctttccagag atggattggt 960

gccttcggga actctgacac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt 1020

tgggttaagt cccgtaacga gcgcaaccct tgtccttagt taccagcacg ttaaggtggg 1080

cactctaagg agactgccgg tgacaaaccg gaggaaggtg gggatgacgt caagtcatca 1140

tggcccttac ggcctgggct acacacgtgc tacaatggtc ggtacaaagg gttgccaagc 1200

cgcgaggtgg agctaatccc ataaaaccga tcgtagtccg gatcgcagtc tgcaactcga 1260

ctgcgtgaag tcggaatcgc tagtaatcgt gaatcagaat gtcacggtga atacgttccc 1320

gggccttgta cacacc 1336

<210> 21

<211> 1336

<212> ADN

<213> Pseudomonas stutzeri

<400> 21

agtcgagcgg atgaagagag cttgctctct gattcagcgg cggacgggtg agtaatgcct 60

aggaatctgc ctggtagtgg gggacaacgt ttcgaaagga acgctaatac cgcatacgtc 120

ctacgggaga aagtggggga tcttcggacc tcacgctatc agatgagcct aggtcggatt 180

agctagttgg cgaggtaaag gctcaccaag gcgacgatcc gtaactggtc tgagaggatg 240

atcagtcaca ctggaactga gacacggtcc agactcctac gggaggcagc agtggggaat 300

attggacaat gggcgaaagc ctgatccagc catgccgcgt gtgtgaagaa ggtcttcgga 360

ttgtaaagca ctttaagttg ggaggaaggg cagtaagtta ataccttgct gttttgacgt 420

taccgacaga ataagcaccg gctaacttcg tgccagcagc cgcggtaata cgaagggtgc 480

aagcgttaat cggaattact gggcgtaaag cgcgcgtagg tggttcgtta agttggatgt 540

gaaagccccg ggctcaacct gggaactgca tccaaaactg gcgagctaga gtatggcaga 600

gggtggtgga atttcctgtg tagcggtgaa atgcgtagat ataggaagga acaccagtgg 660

cgaaggcgac cacctgggct aatactgaca ctgaggtgcg aaagcgtggg gagcaaacag 720

gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgtcga ctagccgttg ggatccttga 780

gatcttagtg gcgcagctaa cgcattaagt cgaccgcctg gggagtacgg ccgcaaggtt 840

aaaactcaaa tgaattgacg ggggcccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa 900

gcaacgcgaa gaaccttacc aggccttgac atgctgagaa cctgccagag atggcggggt 960

gccttcggga actcagacac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt 1020

tgggttaagt cccgtaacga gcgcaaccct tgtccttagt taccagcaca ttatggtggg 1080

cactctaagg agactgccgg tgacaaaccg gaggaaggtg gggatgacgt caagtcatca 1140

tggcccttac ggcctgggct acacacgtgc tacaatggtc ggtacaaagg gttgccaagc 1200

cgcgaggtgg agctaatccc ataaaaccga tcgtagtccg gatcgcagtc tgcaactcga 1260

ctgcgtgaag tcggaatcgc tagtaatcgt gaatcagaat gtcacggtga atacgttccc 1320

gggccttgta cacacc 1336

<210> 22

<211> 1336

<212> ADN

<213> Pseudomonas stutzeri

<400> 22

agtcgagcgg atgaagggag cttgctccct gattcagcgg cggacgggtg agtaatrcct 60

aggaatctgc ctggtagtgg gggacaacgt ctcgaaaggg acgctaatac cgcatacgtc 120

ctacgggaga aagcagggga ccttcgggcc ttgcgctatc agatgagcct aggtcggatt 180

agctagttgg tgaggtaatg gctcaccaag gctgcgatcc gtaactggtc tgagaggatg 240

atcagtcaca ctggaactga gacacggtcc agactcctac gggaggcagc agtggggaat 300

attggacaat gggcgaaagc ctgatccagc catgccgcgt gtgtgaagaa ggtcttcgga 360

ttgtaaagca ctttaagttg ggaggaaggg cagtaagtta ataccttgct gttttgacgt 420

taccgacaga ataagcaccg gctaacttcg tgccagcagc cgcggtaata cgaagggtgc 480

aagcgttaat cggaattact gggcgtaaag cgcgcgtagg tggtttgtta agttggaagt 540

gaaagccccg ggctcaacct gggaactgct ttcaaaactg gcaagctaga gtatggcaga 600

gggtggtgga atttcctgtg tagcggtgaa atgcgtagat ataggaagga acaccagtgg 660

cgaaggcgac cacctgggct aatactgaca ctgaggtgcg aaagcgtggg gagcaaacag 720

gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgtcga ctagccgttg ggctccttga 780

gagcttagtg gcgcagctaa cgcattaagt cgaccgcctg gggagtacgg ccgcaaggtt 840

aaaactcaaa tgaattgacg ggggcccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa 900

gcaacgcgaa gaaccttacc aggccttgac atgcagagaa ctttccagag atggattggt 960

gccttcggga actctgacac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt 1020

tgggttaagt cccgtaacga gcgcaaccct tgtccttagt taccagcacg ttaaggtggg 1080

cactctaagg agactgccgg tgacaaaccg gaggaaggtg gggatgacgt caagtcatca 1140

tggcccttac ggcctgggct acacacgtgc tacaatggtc ggtacaaagg gttgccaagc 1200

cgcgaggtgg agctaatccc ataaaaccga tcgtagtccg gatcgcagtc tgcaactcga 1260

ctgcgtgaag tcggaatcgc tagtaatcgt gaatcagaat gtcacggtga atacgttccc 1320

gggccttgta cacacc 1336

<210> 23

<211> 1336

<212> ADN

<213> Pseudomonas stutzeri

<400> 23

agtcgagcgg atgaagagag cttgctctct gattcagcgg cggacgggtg agtaatgcct 60

aggaatctgc ctgatagtgg gggacaacgt ttcgaaagga acgctaatac cgcatacgtc 120

ctacgggaga aagcagggga ccttcgggcc ttgcgctatc agatgagcct aggtcggatt 180

agctagttgg tgaggtaaag gctcaccaag gctacgatcc gtaactggtc tgagaggatg 240

atcagtcaca ctggaactga gacacggtcc agactcctac gggaggcagc agtggggaat 300

attggacaat gggcgaaagc ctgatccagc catgccgcgt gtgtgaagaa ggtcttcgga 360

ttgtaaagca ctttaagttg ggaggaaggg cagtaagcta ataccttgct gttttgacgt 420

taccgacaga ataagcaccg gctaacttcg tgccagcagc cgcggtaata cgaagggtgc 480

aagcgttaat cggaattact gggcgtaaag cgcgcgtagg tggtttgtta agttgaatgt 540

gaaagccccg ggctcaacct gggaactgca tccaaaactg gcaagctaga gtatggcaga 600

gggtggtgga atttcctgtg tagcggtgaa atgcgtagat ataggaagga acaccagtgg 660

cgaaggcgac cacctgggct aatactgaca ctgaggtgcg aaagcgtggg gagcaaacag 720

gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgtcga ctagccgttg ggatccttga 780

gatcttagtg gcgcagctaa cgcattaagt cgaccgcctg gggagtacgg ccgcaaggtt 840

aaaactcaaa tgaattgacg gggcccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa 900

gcaacgcgaa gaaccttacc aggccttgac atgcagagaa ctttccagag atggattggt 960

gccttcggga actctgacac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt 1020

tgggttaagt cccgtaacga gcgcaaccct tgtccttagt taccagcacg taatggtggg 1080

cactctaagg agactgccgg tgacaaaccg gaggaaggtg gggatgacgt caagtcatca 1140

tggcccttac ggcctgggct acacacgtgc tacaatggtc ggtacaaagg gttgccaagc 1200

cgcgaggtgg agctaatccc ataaaaccga tcgtagtccg gatcgcagtc tgcaactcga 1260

ctgcgtgaag tcggaatcgc tagtaatcgt gaatcagaat gtcacggtga atacgtcccc 1320

gggccttgta cacacc 1336

<210> 24

<211> 1336

<212> ADN

<213> Pseudomonas stutzeri

<400> 24

agtcgaacgg atgaagggag cttgctcccg gattcagcgg cggacgggtg agtaatgcct 60

aggaatctgc ctgatagtgg gggacaacgt ttcgaaagga acgctaatac cgcatacgtc 120

ctacgggaga aagcagggga ccttcgggcc ttgcgctatc agatgagcct aggtcggatt 180

agctggttgg tgaggtaatg gctcaccaag gcgacgatcc gtaactggtc tgagaggatg 240

atcagtcaca ctggaactga gacacggtcc agactcctac gggaggcagc agtggggaat 300

attggacaat gggcgaaagc ctgatccagc catgccgcgt gtgtgaagaa ggtcttcgga 360

ttgtaaagca ctttaagttg ggaggaaggg cagtaagcta ataccttact gttttgacgt 420

taccgacaga ataagcaccg gctaacttcg tgccagcagc cgcggtaata cgaagggtgc 480

aagcgttaat cggaattact gggcgtaaag cgcgcgtagg tggtttgtta agttgaatgt 540

gaaagccccg ggctcaacct gggaactgca tccaaaactg gcaagctaga gtatggcaga 600

gggtggtgga atttcctgtg tagcggtgaa atgcgtagat ataggaagga acaccagtgg 660

cgaaggcgac cacctgggct aatactgaca ctgaggtgcg aaagcgtggg gagcaaacag 720

gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgtcga ctagccgttg ggatccttga 780

gatcttagtg gcgcacgtaa cgcattaagt cgaccgcctg gggagtacgg ccgcaaggtt 840

aaaactcaaa tgaattgacg gggcccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa 900

gcaacgcgaa gaaccttacc aggccttgac atgcagagaa ctttccagag atggatgggt 960

gccttcggga actctgacac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt 1020

tgggttaagt cccgtaacga gcgcaaccct tgtccttagt taccagcacg tcatggtggg 1080

cactctaagg agactgccgg tgacaaaccg gaggaaggtg gggatgacgt caagtcatca 1140

tggcccttac ggcctgggct acacacgtgc tacaatggtc ggtacaaagg gttgccaagc 1200

cgcgaggtgg agctaatccc ataaaaccga tcgtagtccg gatcgcagtc tgcaactcga 1260

ctgcgtgaag tcggaatcgc tagtaatcgt gaatcagaat gtcacggtga atacgttccc 1320

gggccttgta cacacc 1336

<210> 25

<211> 1336

<212> ADN

<213> Pseudomonas stutzeri

<400> 25

agtcgagcgg atgagtggag cttgctccat gattcagcgg cggacgggtg agtaatgcct 60

aggaatctgc ctggtagtgg gggacaacgt ttcgaaagga acgctaatac cgcatacgtc 120

ctacgggaga aagtggggga tcttcggacc tcacgctatc agatgagcct aggtcggatt 180

agctagttgg tgaggtaaag gctcaccaag gcgacgatcc gtaactggtc tgagaggatg 240

atcagtcaca ctggaactga gacacggtcc agactcctac gggaggcagc agtggggaat 300

attggacaat gggcgaaagc ctgatccagc catgccgcgt gtgtgaagaa ggtcttcgga 360

ttgtaaagca ctttaagttg ggaggaaggg cagtaagtta ataccttgct gttttgacgt 420

taccaacaga ataagcaccg gctaacttcg tgccagcagc cgcggtaata cgaagggtgc 480

aagcgttaat cggaattact gggcgtaaag cgcgcgtagg tggttcgtta agttggatgt 540

gaaagccccg ggctcaacct gggaactgca tccaaaactg gcgagctaga gtatggcaga 600

gggtggtgga atttcctgtg tagcggtgaa atgcgtagat ataggaagga acaccagtgg 660

cgaaggcgac cacctgggct aatactgaca ctgaggtgcg aaagcgtggg gagcaaacag 720

gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgtcga ctagccgttg ggatccttga 780

gatcttagtg gcgcagctaa cgcattaagt cgaccgcctg gggagtacgg ccgcaaggtt 840

aaaactcaaa tgaattgacg ggggcccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa 900

gcaacgcgaa gaaccttacc aggccttgac atgcagagaa ctttccagag atggattggt 960

gccttcggga actctgacac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt 1020

tgggttaagt cccgtaacga gcgcaaccct tgtccttagt taccagcacg ttaaggtggg 1080

cactctaagg agactgccgg tgacaaaccg gaggaaggtg gggatgacgt caagtcatca 1140

tggcccttac ggcctgggct acacacgtgc tacaatggtc ggtacaaagg gttgccaagc 1200

cgcgaggtgg agctaatccc ataaaaccga tcgtagtccg gatcgcagtc tgcaactcga 1260

ctgcgtgaag tcggaatcgc tagtaatcgt gaatcagaat gtcacggtga atacgttccc 1320

gggccttgta cacacc 1336

<210> 26

<211> 1336

<212> ADN

<213> Pseudomonas balearica

<400> 26

agtcgagcgg cagcgggtcc ttcgggatgc cggcgagcgg cggacgggtg agtaatgcct 60

aggaatctgc ctggtagtgg gggataactc ggggaaactc gagctaatac cgcatacgtc 120

ctacgggaga aagcgggggа tcttcggacc tcgcgctacc agatgagcct aggtcggatt 180

agctagttgg tgaggtaaag gctcaccaag gcgacgatcc gtagctggtc tgagaggatg 240

atcagccaca ctggaactga gacacggtcc agactcctac gggaggcagc agtggggaat 300

attggacaat gggcgaaagc ctgatccagc catgccgcgt gtgtgaagaa ggtcttcgga 360

ttgtaaagca ctttaagttg ggaggaaggg cagtaagtta ataccttgct gttttgacgt 420

taccgacaga ataagcaccg gctaacttcg tgccagcagc cgcggtaata cgaagggtgc 480

aagcgttaat cggaattact gggcgtaaag cgcgcgtagg tggtttgata agttggatgt 540

gaaagccccg ggctcaacct gggaactgca tccaaaactg tctggctaga gtatggcaga 600

gggtggtgga atttcctgtg tagcggtgaa atgcgtagat ataggaagga acaccagtgg 660

cgaaggcgac cacctgggct aatactgaca ctgaggtgcg aaagcgtggg gagcaaacag 720

gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgtcga ctagccgttg ggatccttga 780

gatcttagtg gcgcagctaa cgcattaagt cgaccgcctg gggagtacgg ccgcaaggtt 840

aaaactcaaa tgaattgacg ggggcccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa 900

gcaacgcgaa gaaccttacc aggccttgac atgcagagaa ctttccagag atggattggt 960

gccttcggga actctgacac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt 1020

tgggttaagt cccgtaacga gcgcaaccct tgtccttagt taccagcacg ttaaggtggg 1080

cactctaagg agactgccgg tgacaaaccg gaggaaggtg gggatgacgt caagtcatca 1140

tggcccttac ggcctgggct acacacgtgc tacaatggtc ggtacaaagg gttgccaagc 1200

cgcgaggtgg agctaatccc ataaaaccga tcgtagtccg gatcgcagtc tgcaactcga 1260

ctgcgtgaag tcggaatcgc tagtaatcgt gaatcagaat gtcacggtga atacgttccc 1320

gggccttgta cacacc 1336

<210> 27

<211> 1336

<212> ADN

<213> Pseudomonas balearica

<400> 27

agtcgagcgg cagcgggtcc ttcgggatgc cggcgagcgg cggacgggtg agtaatgcct 60

aggaatctgc ctggtagtgg gggataactc ggggaaactc gagctaatac cgcatacgtc 120

ctacgggaga aagcggggga tcttcggacc tcgcgctacc agatgagcct aggtcggatt 180

agctagttgg tgaggtaaag gctcaccaag gcgacgatcc gtagctggtc tgagaggatg 240

atcagccaca ctggaactga gacacggtcc agactcctac gggaggcagc agtggggaat 300

attggacaat gggcgaaagc ctgatccagc catgccgcgt gtgtgaagaa ggtcttcgga 360

ttgtaaagca ctttaagttg ggaggaaggg cagtaagtta ataccttgct gttttgacgt 420

taccgacaga ataagcaccg gctaacttcg tgccagcagc cgcggtaata cgaagggtgc 480

aagcgttaat cggaattact gggcgtaaag cgcgcgtagg tggtttgata agttggatgt 540

gaaagccccg ggctcaacct gggaactgca tccaaaactg tctgactaga gtatggcaga 600

gggtggtgga atttcctgtg tagcggtgaa atgcgtagat ataggaagga acaccagtgg 660

cgaaggcgac cacctgggct aatactgaca ctgaggtgcg aaagcgtggg gagcaaacag 720

gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgtcga ctagccgttg ggatccttga 780

gatcttagtg gcgcagctaa cgcattaagt cgaccgcctg gggagtacgg ccgcaaggtt 840

aaaactcaaa tgaattgacg gggcccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa 900

gcaacgcgaa gaaccttacc aggccttgac atgcagagaa ctttccagag atggattggt 960

gccttcggga actctgacac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt 1020

tgggttaagt cccgtaacga gcgcaaccct tgtccttagt taccagcacg ttaaggtggg 1080

cactctaagg agactgccgg tgacaaaccg gaggaaggtg gggatgacgt caagtcatca 1140

tggcccttac ggcctgggct acacacgtgc tacaatggtc ggtacaaagg gttgccaagc 1200

cgcgaggtgg agctaatccc ataaaaccga tcgtagtccg gatcgcagtc tgcaactcga 1260

ctgcgtgaag tcggaatcgc tagtaatcgt gaatcagaat gtcacggtga atacgttccc 1320

gggccttgta cacacc 1336

<210> 28

<211> 1335

<212> ADN

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 28

agtcgagcgg atgaagggag cttgctcctg gattcagcgg cggacgggtg agtaatgcct 60

aggaatctgc ctggtagtgg gggataacgt ccggaaacgg gcgctaatac cgcatacgtc 120

ctgagggaga aagtggggga tcttcggacc tcacgctatc agatgagcct aggtcggatt 180

agctagttgg tggggtaaag gcctaccaag gcgacgatcc gtaactggtc tgagaggatg 240

atcagtcaca ctggaactga gacacggtcc agactcctac gggaggcagc agtggggaat 300

attggacaat gggcgaaagc ctgatccagc catgccgcgt gtgtgaagaa ggtcttcgga 360

ttgtaaagca ctttaagttg ggaggaaggg cagtaagtta ataccttgct gttttgacgt 420

taccaacaga ataagcaccg gctaacttcg tgccagcagc cgcggtaata cgaagggtgc 480

aagcgttaat cggaattact gggcgtaaag cgcgcgtagg tggttcagca agttggatgt 540

gaaatccccg ggctcaacct gggaactgca tccaaaacta ctgagctaga gtacggtaga 600

gggtggtgga atttcctgtg tagcggtgaa atgcgtagat ataggaagga acaccagtgg 660

cgaaggcgac cacctggact gatactgaca ctgaggtgcg aaagcgtggg gagcaaacag 720

gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgtcga ctagccgttg ggatccttga 780

gatcttagtg gcgcagctaa cgcgataagt cgaccgcctg gggagtacgg ccgcaaggtt 840

aaaactcaaa tgaattgacg ggggcccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa 900

gcaacgcgaa gaaccttacc tggccttgac atgctgagaa ctttccagag atggattggt 960

gccttcggga actcagacac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt 1020

tgggttaagt cccgtaacga gcgcaaccct tgtccttagt taccagcacc tcgggtgggc 1080

actctaagga gactgccggt gacaaaccgg aggaaggtgg ggatgacgtc aagtcatcat 1140

ggcccttacg gccagggcta cacacgtgct acaatggtcg gtacaaaggg ttgccaagcc 1200

gcgaggtgga gctaatccca taaaaccgat cgtagtccgg atcgcagtct gcaactcgac 1260

tgcgtgaagt cggaatcgct agtaatcgtg aatcagaatg tcacggtgaa tacgttcccg 1320

ggccttgtac acacc 1335

<210> 29

<211> 1335

<212> ADN

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 29

agtcgagcgg atgaagggag cttgctcctg gattcagcgg cggacgggtg agtaatgcct 60

aggaatctgc ctggtagtgg gggataacgt ccggaaacgg gcgctaatac cgcatacgtc 120

ctgagggaga aagtggggga tcttcggacc tcacgctatc agatgagcct aggtcggatt 180

agctagttgg tggggtaaag gcctaccaag gcgacgatcc gtaactggtc tgagaggatg 240

atcagtcaca ctggaactga gacacggtcc agactcctac gggaggcagc agtggggaat 300

attggacaat gggcgaaagc ctgatccagc catgccgcgt gtgtgaagaa ggtcttcgga 360

ttgtaaagca ctttaagttg ggaggaaggg cagtaagtta ataccttgct gttttgacgt 420

taccaacaga ataagcaccg gctaacttcg tgccagcagc cgcggtaata cgaagggtgc 480

aagcgttaat cggaattact gggcgtaaag cgcgcgtagg tggttcagca agttggatgt 540

gaaatccccg ggctcaacct gggaactgca tccaaaacta ctgagctaga gtacggtaga 600

gggtggtgga atttcctgtg tagcggtgaa atgcgtagat ataggaagga acaccagtgg 660

cgaaggcgac cacctggact gatactgaca ctgaggtgcg aaagcgtggg gagcaaacag 720

gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgtcga ctagccgttg ggatccttga 780

gatcttagtg gcgcagctaa cgcgataagt cgaccgcctg gggagtacgg ccgcaaggtt 840

aaaactcaaa tgaattgacg ggggcccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa 900

gcaacgcgaa gaaccttacc tggccttgac atgctgagaa ctttccagag atggattggt 960

gccttcggga actcagacac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt 1020

tgggttaagt cccgtaacga gcgcaaccct tgtccttagt taccagcacc tcgggtgggc 1080

actctaagga gactgccggt gacaaaccgg aggaaggtgg ggatgacgtc aagtcatcat 1140

ggcccttacg gccagggcta cacacgtgct acaatggtcg gtacaaaggg ttgccaagcc 1200

gcgaggtgga gctaatccca taaaaccgat cgtagtccgg atcgcagtct gcaactcgac 1260

tgcgtgaagt cggaatcgct agtaatcgtg aatcagaatg tcacggtgaa tacgttcccg 1320

ggccttgtac acacc 1335

<210> 30

<211> 1336

<212> ADN

<213> Pseudomonas citronellolis

<400> 30

agtcgagcgg atgtagggag cttgcttctg gattcagcgg cggacgggtg agtaatgcct 60

aggaatctgc ctggtagtgg gggacaacgt tccgaaagga gcgctaatac cgcatacgtc 120

ctacgggaga aagtggggga tcttcggacc tcacgctatc agatgagcct aggtcggatt 180

agctagtagg tggggtaatg gctcacctag gcgacgatcc gtaactggtc tgagaggatg 240

atcagtcaca ctggaactga gacacggtcc agactcctac gggaggcagc agtggggaat 300

attggacaat gggcgaaagc ctgatccagc catgccgcgt gtgtgaagaa ggtcttcgga 360

ttgtaaagca ctttaagttg ggaggaaggg cagtaagtta ataccttgct gttttgacgt 420

taccaacaga ataagcaccg gctaacttcg tgccagcagc cgcggtaata cgaagggtgc 480

aagcgttaat cggaattact gggcgtaaag cgcgcgtagg tggtttggta agatggatgt 540

gaaatccccg ggctcaacct gggaactgca tccataactg cctgactaga gtacggtaga 600

gggtggtgga atttcctgtg tagcggtgaa atgcgtagat ataggaagga acaccagtgg 660

cgaaggcgac cacctggact gatactgaca ctgaggtgcg aaagcgtggg gagcaaacag 720

gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgtcga ctagccgttg ggatccttga 780

gatcttagtg gcgcagctaa cgcgataagt cgaccgcctg gggagtacgg ccgcaaggtt 840

aaaactcaaa tgaattgacg ggggcccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa 900

gcaacgcgaa gaaccttacc tggccttgac atgtccggaa ttctgcagag atgcgggagt 960

gccttcggga atcggaacac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt 1020

tgggttaagt cccgtaacga gcgcaaccct tgtccttagt taccarcacg ttatggtggg 1080

cactctaagg agactgccgg tgacaaaccg gaggaaggtg gggatgacgt caagtcatca 1140

tggcccttac ggccagggct acacacgtgc tacaatggtc ggtacagagg gttgccaagc 1200

cgcgaggtgg agctaatccc agaaaaccga tcgtagtccg gatcgcagtc tgcaactcga 1260

ctgcgtgaag tcggaatcgc tagtaatcgt gaatcagaat gtcacggtga atacgttccc 1320

gggccttgta cacacc 1336

<210> 31

<211> 1336

<212> ADN

<213> Pseudomonas alcaligenes

<400> 31

agtcgagcgg atgagtggag cttgctccat gattcagcgg cggacgggtg agtaatgcct 60

aggaatctgc ctggtagtgg gggacaacgt ttcgaaagga acgctaatac cgcatacgtc 120

ctacgggaga aagcagggga ccttcgggcc ttgcgctatc agatgagcct aggtcggatt 180

agctagtagg tgaggtaatg gctcacctag gcgacgatcc gtaactggtc tgagaggatg 240

atcagtcaca ctggaactga gacacggtcc agactcctac gggaggcagc agtggggaat 300

attggacaat gggcgaaagc ctgatccagc catgccgcgt gtgtgaagaa ggtcttcgga 360

ttgtaaagca ctttaagttg ggaggaaggg cagtaagtta ataccttgct gttttgacgt 420

taccaacaga ataagcaccg gctaacttcg tgccagcagc cgcggtaata cgaagggtgc 480

aagcgttaat cggaattact gggcgtaaag cgcgcgtagg tggttcagca agttggaggt 540

gaaatccccg ggctcaacct gggaactgcc tccaaaacta ctgagctaga gtacggtaga 600

gggtagtgga atttcctgtg tagcggtgaa atgcgtagat ataggaagga acaccagtgg 660

cgaaggcgac tacctggact gatactgaca ctgaggtgcg aaagcgtggg gascaaacag 720

gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgtcga ctagccgttg ggatccttga 780

gatcttagtg gcgcagctaa cgcattaagt cgaccgcctg gggagtacgg ccgcaaggtt 840

aaaactcaaa tgaattgacg ggggcccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa 900

gcaacgcgaa gaaccttacc tggccttgac atgctgagaa ctttccagag atggattggt 960

gccttcggga actcagacac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt 1020

tgggttaagt cccgtaacga gcgcaaccct tgtccttagt taccagcacg ttatggtggg 1080

cactctaagg agactgccgg tgacaaaccg gaggaaggtg gggatgacgt caagtcatca 1140

tggcccttac ggccagggct acacacgtgc tacaatggtc ggtacaaagg gttgccaagc 1200

cgcgaggtgg agctaatccc ataaaaccga tcgtagtccg gatcgcagtc tgcaactcga 1260

ctgcgtgaag tcggaatcgc tagtaatcgt gaatcagaat gtcacggtga atacgttccc 1320

gggccttgta cacacc 1336

<210> 32

<211> 1336

<212> ADN

<213> Pseudomonas nitroreducens

<400> 32

agtcgagcgg atgagaggag cttgctcctt gatttagcgg cggacgggtg agtaatgcct 60

aggaatctgc ctggtagtgg gggataacgt tccgaaagga acgctaatac cgcatacgtc 120

ctacgggaga aagcagggga ccttcgggcc ttgcgctatc agatgagcct aggtcggatt 180

agctagttgg tgaggtaatg gctcaccaag gcgacgatcc gtaactggtc tgagaggatg 240

atcagtcaca ctggaactga gacacggtcc agactcctac gggaggcagc agtggggaat 300

attggacaat gggcgaaagc ctgatccagc catgccgcgt gtgtgaagaa ggtcttcgga 360

ttgtaaagca ctttaagttg ggaggaaggg cattaaccta atacgttagt gttttgacgt 420

taccgacaga ataagcaccg gctaacttcg tgccagcagc cgcggtaata cgaagggtgc 480

aagcgttaat cggaattact gggcgtaaag cgcgcgtagg tggttcgtta agttggatgt 540

gaaagccccg ggctcaacct gggaactgca tccaaaactg gcgagctaga gtacggtaga 600

gggtggtgga atttcctgtg tagcggtgaa atgcgtagat ataggaagga acaccagtgg 660

cgaaggcgac cacctggact gatactgaca ctgaggtgcg aaagcgtggg gagcaaacag 720

gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgtcaa ctagccgttg ggttccttga 780

gaacttagtg gcgcagctag cgcattaagt tgaccgcctg gggagtacgg ccgcaaggtt 840

aaaactcaaa tgaattgacg gggcccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaactcgaa 900

gcaacgcgaa gaaccttacc tggccttgac atgctgagaa ctttccagag atggattggt 960

gccttcggga actcagacac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt 1020

tgggttaagt cccgtaacga gcgcaaccct tgtccttagt taccagcacg taatggtggg 1080

cactctaagg agactgccgg tgacaaaccg gaggaaggtg gggatgacgt caagtcatca 1140

tggcccttac ggccagggct acacacgtgc tacaatggtc ggtacaaagg gttgccaagc 1200

cgcgaggtgg agctaatccc ataaaaccga tcgtagtccg gatcgcagtc tgcaactcga 1260

ctgcgtgaag tcggaatcgc tagtaatcgt gaatcagaat gtcacggtga atacgttccc 1320

gggccttgta cacacc 1336

<210> 33

<211> 1335

<212> ADN

<213> Pseudomonas mendocina

<400> 33

agtcgagcgg atgaggggag cttgctccct gatttagcgg cggacgggtg agtaatgtct 60

aggaatctgc ctggtagtgg gggataacgt tccgaaagga acgctaatac cgcatacgtc 120

ctacgggaga aagcagggga ccttcgggcc ttgcgctatc agatgagcct aggtcggatt 180

agctagttgg tgaggtaatg gctcaccaag gcgacgatcc gtaactggtc tgagaggatg 240

atcagtcaca ctggaactga gacacggtcc agactcctac gggaggcagc agtggggaat 300

attggacaat gggcgaaagc ctgatccagc catgccgcgt gtgtgaagaa ggtcttcgga 360

ttgtaaagca ctttaagttg ggaggaaggg cattaaccta atacgttagt gttttgacgt 420

taccaacaga ataagcaccg gctaacttcg tgccagcagc cgcggtaata cgaagggtgc 480

aagcgttaat cggaattact gggcgtaaag cgcgcgtagg tggttcgtta agttggatgt 540

gaaagccccg ggctcaacct gggaactgca tccaaaactg gcgagctaga gtacggtaga 600

gggtggtgga atttcctgtg tagcggtgaa atgcgtagat ataggaagga acaccagtgg 660

cgaaggcgac cacctggact gatactgaca ctgaggtgcg aaagcgtggg gagcaaacag 720

gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgtcaa ctagccgttg gaatccttga 780

gattttagtg gcgcagctaa cgcattaagt tgaccgcctg gggagtacgg ccgcaaggtt 840

aaaactcaaa tgaattgacg ggggcccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa 900

gcaacgcgaa gaaccttacc tggccttgac atgctgagaa ctttccagag atggattggt 960

gccttcggga actcagacac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt 1020

tgggttaagt cccgtaacga gcgcaaccct tgtccttagt taccagcacc tcgggtgggc 1080

actctaagga gactgccggt gacaaaccgg aggaaggtgg ggatgacgtc aagtcatcat 1140

ggcccttacg gccagggcta cacacgtgct acaatggtcg gtacaaaggg ttgccaagcc 1200

gcgaggtgga gctaatccca taaaaccgat cgtagtccgg atcgcagtct gcaactcgac 1260

tgcgtgaagt cggaatcgct agtaatcgtg aatcagaatg tcacggtgaa tacgttcccg 1320

ggccttgtac acacc 1335

<210> 34

<211> 1336

<212> ADN

<213> Pseudomonas agarici

<220>

<221> misc_feature

<222> (452)..(452)

<223> n is a, c, g, o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (1199)..(1199)

<223> n is a, c, g, o t

<400> 34

agtcgagcgg atgaagggag cttgctcccg gattcagcgg cggacgggtg agtaatgcct 60

aggaatctgc ctggtagtgg gggacaacgt ttcgaaagga acgctaatac cgcatacgtc 120

ctacgggaga aagcagggga ccttcgggcc ttgcgctatc agatgagcct aggtcggatt 180

agctagttgg tgaggtaaag gctcaccaag gcgacgatcc gtaactggtc tgagaggatg 240

atcagtcaca ctggaactga gacacggtcc agactcctac gggaggcagc agtggggaat 300

attggacaat gggcgaaagc ctgatccagc catgccgcgt gtgtgaagaa ggtcttcgga 360

ttgtaaagca ctttaagttg ggaggaaggg cattaaccta atacgttagt gttttgacgt 420

taccgacaga ataagcaccg gctaactctg tnccagcagc cgcggtaata cagagggtgc 480

aagcgttaat cggaattact gggcgtaaag cgcgcgtagg tggttggtta agttggatgt 540

gaaatccccg ggctcaacct gggaactgca tccaaaactg gccagctaga gtagggtaga 600

gggtggtgga atttcctgtg tagcggtgaa atgcgtagat ataggaagga acaccagtgg 660

cgaaggcgac cacctggact catactgaca ctgaggtgcg aaagcgtggg gagcaaacag 720

gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgtcaa ctagccgttg ggaaccttga 780

gttcttagtg gcgcagctaa cgcattaagt tgaccgcctg gggagtacgg ccgcaaggtt 840

aaaactcaaa tgaattgacg gggcccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa 900

gcaacgcgaa gaaccttacc aggccttgac atccaatgaa tcttccagag atggaggagt 960

gccttcggga acattgagac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt 1020

tgggttaagt cccgtaacga gcgcaaccct tgtccttagt taccagcacg tgatggtggg 1080

cactctaagg agactgccgg tgacaaaccg gaggaaggtg gggatgacgt caagtcatca 1140

tggcccttac ggcctgggct acacacgtgc tacaatggtc ggtacaaagg gttgccaanc 1200

cgcgaggtgg agctaatccc ataaaaccga tcgtagtccg gatcgcagtc tgcaactcga 1260

ctgcgtgaag tcggaatcgc tagtaatcgc gaatcagaat gtcgcggtga atacgttccc 1320

gggccttgta cacacc 1336

<210> 35

<211> 1336

<212> ADN

<213> Pseudomonas pseudoalcaligenes

<400> 35

agtcgagcgg atgaagggag cttgctcctg gattcagcgg cggacgggtg agtaatgcct 60

aggaatctgc ctggtagtgg gggataacgt tccgaaagga acgctaatac cgcgtacgtc 120

ctacgggaga aagcagggga ccttcgggcc ttgcgctatc agatgagcct aggtcggatt 180

agctagttgg tgaggtaatg gctcaccaag gcgacgatcc gtaactggtc tgagaggatg 240

atcagtcaca ctggaactga gacacggtcc agactcctac gggaggcagc agtggggaat 300

attggacaat gggcgaaagc ctgatccagc catgccgcgt gtgtgaagaa ggtcttcgga 360

ttgtaaagca ctttaagttg ggaggaaggg ctgtaggcta atatcctgcg gttttgacgt 420

taccaacaga ataagcaccg gctaacttcg tgccagcagc cgcggtaata cgaagggtgc 480

aagcgttaat cggaattact gggcgtaaag cgcgcgtagg tggttcgtta agttggatgt 540

gaaagccccg ggctcaacct gggaactgca tccaaaactg gcgagctaga gtacggtaga 600

gggtagtgga atttcctgtg tagcggtgaa atgcgtagat ataggaagga acaccagtgg 660

cgaaggcgac tacctggact gatactgaca ctgaggtgcg aaagcgtggg gagcaaacag 720

gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgtcaa ctagccgttg gaatccttga 780

gattttagtg gcgcagctaa cgcattaagt tgaccgcctg gggagtacgg ccgcaaggtt 840

aaaactcaaa tgaattgacg ggggcccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa 900

gcaacgcgaa gaaccttacc tggccttgac atgctgagaa ctttccagag atggattggt 960

gccttcggga actcagacac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt 1020

tgggttaagt cccgtaacga gcgcaaccct tgtccttagt taccagcacg ttatggtggg 1080

cactctaagg agactgccgg tgacaaaccg gaggaaggtg gggatgacgt caagtcatca 1140

tggcccttac ggccagggct acacacgtgc tacaatggtc ggtacaaagg gttgccaagc 1200

cgcgaggtgg agctaatccc ataaaaccga tcgtagtccg gatcgcagtc tgcaactcga 1260

ctgcgtgaag tcggaatcgc tagtaatcgt gaatcagaat gtcacggtga atacgttccc 1320

gggccttgta cacacc 1336

<210> 36

<211> 1338

<212> ADN

<213> Pseudomonas fluorescens

<400> 36

agtcgagcgg cagcacgggt acttgtacct ggtggcgagc ggcggacggg tgagtaatgc 60

ctaggaatct gcctagtagt gggggataac gtccggaaac gggcgctaat accgcatacg 120

tcctacggga gaaagtgggg gatcttcgga cctcacgcta ttagatgagc ctaggtcgga 180

ttagctagtt ggtgaggtaa tggctcacca aggcgacgat ccgtaactgg tctgagagga 240

tgatcagtca cactggaact gagacacggt ccagactcct acgggaggca gcagtgggga 300

atattggaca atgggcgaaa gcctgatcca gccatgccgc gtgtgtgaag aaggtcttcg 360

gattgtaaag cactttaagt tgggaggaag ggcagttacc taatacgtga ttgttttgac 420

gttaccgaca gaataagcac cggctaactc tgtgccagca gccgcggtaa tacagagggt 480

gcaagcgtta atcggaatta ctgggcgtaa agcgcgcgta ggtggtttgt taagttggat 540

gtgaaagccc cgggctcaac ctgggaactg catccaaaac tggcaagcta gagtatggta 600

gagggtggtg gaatttcctg tgtagcggtg aaatgcgtag atataggaag gaacaccagt 660

ggcgaaggcg accacctgga ctgatactga cactgaggtg cgaaagcgtg gggagcaaac 720

aggattagat accctggtag tccacgccgt aaacgatgtc aactagccgt tgggagcctt 780

gagctcttag tggcgcagct aacgcattaa gttgaccgcc tggggagtac ggccgcaagg 840

ttaaaactca aatgaattga cgggggcccg cacaagcggt ggagcatgtg gtttaattcg 900

aagcaacgcg aagaacctta ccaggccttg acatccaatg aactttctag agatagattg 960

gtgccttcgg gaacattgag acaggtgctg catggctgtc gtcagctcgt gtcgtgagat 1020

gttgggttaa gtcccgtaac gagcgcaacc cttgtcctta gttaccagca cgttatggtg 1080

ggcactctaa ggagactgcc ggtgacaaac cggaggaagg tggggatgac gtcaagtcat 1140

catggccctt acggcctggg ctacacacgt gctacaatgg tcggtacaaa gggttgccaa 1200

gccgcgaggt ggagctaatc ccataaaacc gatcgtagtc cggatcgcag tctgcaactc 1260

gactgcgtga agtcggaatc gctagtaatc gcgaatcaga atgtcgcggt gaatacgttc 1320

ccgggccttg tacacacc 1338

<210> 37

<211> 1336

<212> ADN

<213> Pseudomonas putida

<400> 37

agtcgagcgg atgacgggag cttgctcctt gattcagcgg cggacgggtg agtaatgcct 60

aggaatctgc ctggtagtgg gggacaacgt ttcgaaagga acgctaatac cgcatacgtc 120

ctacgggaga aagcagggga ccttcgggcc ttgcgctatc agatgagcct aggtcggatt 180

agctagttgg tggggtaatg gctcaccaag gcgacgatcc gtaactggtc tgagaggatg 240

atcagtcaca ctggaactga gacacggtcc agactcctac gggaggcagc agtggggaat 300

attggacaat gggcgaaagc ctgatccagc catgccgcgt gtgtgaagaa ggtcttcgga 360

ttgtaaagca ctttaagttg ggaggaaggg cagtaagtta ataccttgct gttttgacgt 420

taccgacaga ataagcaccg gctaactctg tgccagcagc cgcggtaata cagagggtgc 480

aagcgttaat cggaattact gggcgtaaag cgcgcgtagg tggtttgtta agttggatgt 540

gaaagccccg ggctcaacct gggaactgca tccaaaactg gcaagctaga gtacggtaga 600

gggtggtgga atttcctgtg tagcggtgaa atgcgtagat ataggaagga acaccagtgg 660

cgaaggcgac cacctggact gatactgaca ctgaggtgcg aaagcgtggg gagcaaacag 720

gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgtcaa ctagccgttg gaatccttga 780

gattttagtg gcgcagctaa cgcattaagt tgaccgcctg gggagtacgg ccgcaaggtt 840

aaaactcaaa tgaattgacg gggcccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa 900

gcaacgcgaa gaaccttacc aggccttgac atgcagagaa ctttccagag atggattggt 960

gccttcggga actctgacac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt 1020

tgggttaagt cccgtaacga gcgcaaccct tgtccttagt taccagcacg ttatggtggg 1080

cactctaagg agactgccgg tgacaaaccg gaggaaggtg gggatgacgt caagtcatca 1140

tggcccttac ggcctgggct acacacgtgc tacaatggtc ggtacagagg gttgccaagc 1200

cgcgaggtgg agctaatctc acaaaaccga tcgtagtccg gatcgcagtc tgcaactcga 1260

ctgcgtgaag tcggaatcgc tagtaatcgc gaatcagaat gtcgcggtga atacgttccc 1320

gggccttgta cacacc 1336

<210> 38

<211> 34

<212> ADN

<213> Shewanella oneidensis

<400> 38

gcatacgccc tacgggggaa agaggggac tttc 34

<210> 39

<211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia distintiva degenerada del ADNr 16S de Shewanella con posiciones variables en la región 2

<220>

<221> misc_feature

<222> (22)..(24)

<223> n=a o g

<220>

<221> misc_feature

<222> (29)..(29)

<223> n=a o c

<220>

<221> misc_feature

<222> (30)..(30)

<223> n=a,,c, g, o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (30)..(30)

<223> n=a, c, g, o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (31)..(32)

<223> n=t o c

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> n=a o c

<400> 39

gcatacgccc tacgggggaa annnggggnn nntn 34

<210> 40

<211> 41

<212> ADN

<213> Shewanella oneidensis

<400> 40

tcggagtttg gtgtcttgaa cactgggctc tcaagctaac g 41

<210> 41

<211> 41

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia distintiva degenerada del ADNr 16S de Shewanella con posiciones variables en la región 5

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> n=a o g

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> n=a , c o g

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> n=a , c o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(19)

<223> n=a o g

<220>

<221> misc_feature

<222> (27)..(27)

<223> n=g o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> n=t o c

<220>

<221> misc_feature

<222> (30)..(31)

<223> n=t o c

<220>

<221> misc_feature

<222> (32)..(32)

<223> n=a o c

<400> 41

tcggantttg gtnncttnna cactggnntn nnaagctaac g 41

<210> 42

<211> 96

<212> ADN

<213> Shewanella oneidensis

<400> 42

acaatggcga gtacagaggg ttgcaaagcc gcgaggtgga gctaatctca caaagctcgt 60

cgtagtccgg attggagtct gcaactcgac tccatg 96

<210> 43

<211> 96

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia distintiva degenerada del ADNr 16S de Shewanella con posiciones variables en la región 8

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> n=c, g, o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> n=a, c, o g

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(11)

<223> n=a, g, o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(25)

<223> n=a o g

<220>

<221> misc_feature

<222> (33)..(33)

<223> n=a o g

<220>

<221> misc_feature

<222> (38)..(38)

<223> n=g o c

<220>

<221> misc_feature

<222> (39)..(39)

<223> n=a, g, o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (48)..(48)

<223> n=t o c

<220>

<221> misc_feature

<222> (51)..(51)

<223> n=c, g, o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (56)..(56)

<223> n=c, g, o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (57)..(57)

<223> n=a, c, o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (58)..(58)

<223> n=c, g, o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (73)..(73)

<223> n=t o c

<220>

<221> misc_feature

<222> (94)..(94)

<223> n=a o g

<400> 43

acaatggnnn ntacagaggg ttgcnaagcc gcnaggtnna gctaatcnca naaagnnngt 60

cgtagtccgg atnggagtct gcaactcgac tccntg 96

<210> 44

<211> 1436

<212> ADN

<213> Pseudomonas stutzeri

<400> 44

agtcgagcgg atgaagagag cttgctctct gattcagcgg cggacgggtg agtaatgcct 60

aggaatctgc ctgatagtgg gggacaacgt ttcgaaagga acgctaatac cgcatacgtc 120

ctacgggaga aagcagggga ccttcgggcc ttgcgctatc agatgagcct aggtcggatt 180

agctagttgg tgaggtaatg gctcaccaag gcgacgatcc gtaactggtc tgagaggatg 240

atcagtcaca ctggaactga gacacggtcc agactcctac gggaggcagc agtggggaat 300

attggacaat gggcgaaagc ctgatccagc catgccgcgt gtgtgaagaa ggtcttcgga 360

ttgtaaagca ctttaagttg ggaggaaggg cattaaccta atacgttagt gttttgacgt 420

taccgacaga ataagcaccg gctaacttcg tgccagcagc cgcggtaata cgaagggtgc 480

aagcgttaat cggaattact gggcgtaaag cgcgcgtagg tggtttgtta agttgaatgt 540

gaaagccccg ggctcaacct gggaactgca tccaaaactg gcaagctaga gtatggcaga 600

gggtggtgga atttcctgtg tagcggtgaa atgcgtagat ataggaagga acaccagtgg 660

cgaaggcgac cacctgggct aatactgaca ctgaggtgcg aaagcgtggg gagcaaacag 720

gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgtcga ctagccgttg ggatccttga 780

gatcttagtg gcgcagctaa cgcattaagt cgaccgcctg gggagtacgg ccgcaaggtt 840

aaaactcaaa tgaattgacg gggcccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa 900

gcaacgcgaa gaaccttacc aggccttgac atgcagagaa ctttccagag atggattggt 960

gccttcggga actctgacac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt 1020

tgggttaagt cccgtaacga gcgcaaccct tgtccttagt taccagcacg ttaaggtggg 1080

cactctaagg agactgccgg tgacaaaccg gaggaaggtg gggatgacgt caagtcatca 1140

tggcccttac ggcctgggct acacacgtgc tacaatggtc ggtacaaagg gttgccaagc 1200

cgcgaggtgg agctaatccc ataaaaccga tcgtagtccg gatcgcagtc tgcaactcga 1260

ctgcgtgaag tcggaatcgc tagtaatcgt gaatcagaat gtcacggtga atacgttccc 1320

gggccttgta cacaccgccc gtcacaccat gggagtgggt tgctccagaa gtagctagtc 1380

taaccttcgg ggggacggtt accacggagt aattcatgac tggggtgaag tcgtaa 1436

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA
RELACIÓN DE ANEXOS

Dependencia: 2020	Fecha: 13 / 06 / 4 / (AAAA MM DD)	Recorrido:
Tipo de Radicación: Entrada: ☑ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐		
Radicador:		Planilla:

ID	*No. Radicación*	*Consecutivo*	*Item*
1	13-134124	0	
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

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

Observaciones:
8 de los 9 Documentos q estaban en el CD fueron subidos al sistema pues estan en Formato PDF

Yenny Arturo Vaga.