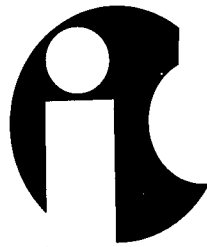




No. 14-139380- -00000-0000

Fecha: 2014-06-27 15:29:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 9



T=F=8

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO ENRIQUECIMIENTO DE FLUIDOS DE
YACIMIENTOS DE PETRÓLEO CON SHEWANELLA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE E.I. DU PONT DE NEMOURS.

DOMICILIO WILMINGTON, ESTADOS UNIDOS.

74. APODERADO ALVARO CORREA.

22. BOGOTÁ, D.C., 27 DE JUNIO DE 2014



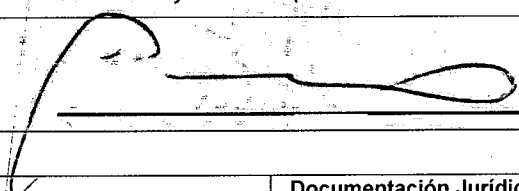
No. 14-139380-00000-0000

Fecha: 2014-06-27 15:29:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 9

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2012/069364	Fecha 13/12/2012
Publicación Internacional No.		WO/2013/090495	Fecha 20/06/2013
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
ENRIQUECIMIENTO DE FLUIDOS DE YACIMIENTOS DE PETRÓLEO CON SHEWANELLA			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
C12N 1/20 (2006.01), C12P 7/64 (2006.01), C12R 1/01 (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 19899	No. TELÉFONO 6341500
CIUDAD		Wilmington	CORREO ELECTRÓNICO Alvaro.correa@bakermckenzie.com
DEPARTAMENTO/ESTADO		Delaware	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN Estados Unidos de América
PAÍS DE RESIDENCIA		Estados Unidos de América	
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. HENDRICKSON		Edwin	Estados Unidos de América
2. LUCKRING		Abigail	Estados Unidos de América
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD DIRECCIÓN
1. Estados Unidos de América		Delaware	49 Kings Grant Road Hockessin, Delaware 19707
2. Estados Unidos de América		Pennsylvania	306 West Marshall Street West Chester, Pennsylvania 19380
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		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	

2

10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO			
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1. Estados Unidos de América		US	61/570,553	14/12/2011
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS			
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.				
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES			
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.				
13	REDUCCIÓN DE TASAS			
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐				
Universidades públicas o privadas ☐				
Entidades sin ánimo de lucro ☐				
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos				
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO			
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.				
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N° 14-059266 N° 14-038520	Fecha 09/06/2014 Fecha 09/06/2014	
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		Documentación Jurídica		
1. ☒ Descripción N° de folios:		9. ☒ Poderes, si fuera el caso.		
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 11		10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.		
3. ☐ Dibujos y/o figuras N° folios:		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.		
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.		
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. Reducción de tasas		
6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		Micro, pequeñas o medianas empresas		
7. ☐ Arte final 12 x 12.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.		
8. ☒ Anexo formato digital.		☐ 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.		

2014/047 3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0059266

Bogotá D.C., Junio 04 de 2014 - 12:56:08

RECIBIDO DE : BAKER

NI 900.532.339

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	596597481	04/06/2014	105.078.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	515.000.00	515.000.00
				\$515.000.00

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-139380-00000-0000

Fecha: 2014-06-27 15:29:20

Tra. 11 PATENTE IYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR. NUEVAS CR

Eve: 378 FASE NACIONAL I

Folios: 9

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

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

Junio 4 de 2014 - 12:56:42

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

2014/045



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0038520

Bogotá D.C., Abril 08 de 2014 - 16:55:15

RECIBIDO DE : BAKER

NI 900.532.339

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	38472	08/04/2014		1.150.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	54 INFORMACION DETALLADA DE UN TRAMITE /ANTECEDENTES	31.000.00	31.000.00
				\$31.000.00

SON: **TREINTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-139380-00000-0000

Fecha: 2014-06-27 15:29:20
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR. NUEVAS CR
Eve: 378 FASE NACIONAL I
Folios: 9

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

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

Abril 8 de 2014 - 16:55:22

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl:	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY	
(30) Prioridad	(31) No. 61/570,553	32) Fecha 14/12/2011	(33) País US
		(72) Inventor(es) HENDRICKSON, Edwin; LUCKRING, Abigail	
		(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ	
(85)	Fecha limite inicio fase nacional: 14/07/2014		(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 20/06/2013
	Fecha de presentación de la solicitud: 13/12/2012		N° publicación: WO/2013/090495
	No. de solicitud PCT/US2012/069364		
(54) Título: ENRIQUECIMIENTO DE FLUIDOS DE YACIMIENTOS DE PETRÓLEO CON SHEWANELLA			

Resumen:

Se presentan métodos para enriquecer poblaciones microbianas que son autóctonas en fluidos de yacimientos de petróleo para obtener poblaciones enriquecidas con Shewanella y cepas aisladas de Shewanella útiles para mejorar la recuperación de petróleo de un yacimiento de petróleo. Adicionalmente, las poblaciones enriquecidas pueden contener bacterias que pertenecen al género Arcobacter.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO			
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES			
TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS			
PATENTE DE INVENCION ____ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____			
(21) N° de solicitud:		(22) Fecha de solicitud:	
(51) Clasificación Internacional :			
(71) Solicitante(s) E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY			
(72) Inventor(es) HENDRICKSON, Edwin; LUCKRING, Abigail			
(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDÓÑEZ			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	61/570,553	14/12/2011	US
(85) Fecha inicio fase nacional: 14/07/2014		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 20/06/2013	
Fecha de presentación de la solicitud: 13/12/2012		N° publicación: WO/2013/090495	
No. de solicitud PCT/US2012/069364			
(54) Título: ENRIQUECIMIENTO DE FLUIDOS DE YACIMIENTOS DE PETRÓLEO CON SHEWANELLA			



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)

HENDRICKSON, Edwin; LUCKRING, Abigail

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

(30) Prioridad

(31) **No. Prioridad** 32) **Fecha** (33) **País**
61/570,553 **14/12/2011** **US**

(85) Fecha límite inicio fase nacional: **14/07/2014**

(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT
Fecha de presentación de la solicitud: **13/12/2012**
No. de solicitud **PCT/US2012/069364**

(87) Publicación internacional:

Fecha: **20/06/2013**
No. Publicación : **WO/2013/090495**

(54) Título:

ENRIQUECIMIENTO DE FLUIDOS DE YACIMIENTOS DE PETRÓLEO CON SHEWANELLA

(57) Resumen:

Se presentan métodos para enriquecer poblaciones microbianas que son autóctonas en fluidos de yacimientos de petróleo para obtener poblaciones enriquecidas con Shewanella y cepas aisladas de Shewanella útiles para mejorar la recuperación de petróleo de un yacimiento de petróleo. Adicionalmente, las poblaciones enriquecidas pueden contener bacterias que pertenecen al género Arcobacter.

8

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia: 2020	Fecha: 14/06/21 AAAA MM DD	Recorrido: 3	
Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicador:		Planilla:	

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	14-139380	0	7
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
16	Otro

Observaciones:

folio (8) el cb anexo contiene un total de 5 archivos en formato pdf los cuales fueron procesados correctamente y (1) archivo en Word el cual por no cumplir con la circular unica no fue procesado.

VVP

ee



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-139380- -00000-0000

ES

Fecha: 2014-06-27 15:29:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 9

PATENTE DE INVENCION ☐

MODEL ☐

Art 33 Decision 486/00

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

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

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

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

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

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

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



(43) International Publication Date
20 June 2013 (20.06.2013)

(10) International Publication Number
WO 2013/090495 A1

(51) International Patent Classification:

C12N 1/20 (2006.01) *C12R 1/01* (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2012/069364

(22) International Filing Date:

13 December 2012 (13.12.2012)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/570,553 14 December 2011 (14.12.2011) US

(71) Applicant: **E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY** [US/US]; 1007 Market Street, Wilmington, Delaware 19898 (US).

(72) Inventors: **HENDRICKSON, Edwin**; 49 Kings Grant Road, Hockessin, Delaware 19707 (US). **LUCKRING, Abigail**; 306 West Marshall Street, West Chester, Pennsylvania 19380 (US).

(74) Agent: **GROLZ, Edward W.**; Scully, Scott, Murphy & Presser, 400 Garden City Plaza, Suite 300, Garden City, NY 11530 (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, BN, 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, PA, 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, 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).

Declarations under Rule 4.17:

- *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))*
- *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))*

Published:

- *with international search report (Art. 21(3))*
- *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))*
- *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

(54) Title: **SHEWANELLA ENRICHMENT FROM OIL RESERVOIR FLUIDS**

(57) Abstract: Methods for enriching microbial populations that are indigenous to oil reservoir fluids to obtain *Shewanella*-enriched populations and isolated *Shewanella* strains useful for enhancing oil recovery from an oil reservoir are presented. In addition, the enriched populations may contain bacteria belonging to the *Arcobacter* genus.



WO 2013/090495 A1

TITLE

SHEWANELLA ENRICHMENT FROM OIL RESERVOIR FLUIDS

CROSS REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

5 This application claims priority from U.S. Provisional Application No. 61/570,553, filed December 14, 2011, which is herein incorporated by reference in its entirety.

FIELD OF THE INVENTION

10 This disclosure relates to the field of environmental microbiology. More specifically, methods for enriching microbial populations that are indigenous to oil reservoir fluids to obtain *Shewanella*-enriched populations and isolated *Shewanella* strains useful for enhancing oil recovery from an oil reservoir are presented herein.

15

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 uses the natural forces present in an oil
20 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
25 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
30 strata. Oil in the less permeable zones is thus not recovered.

Recovery of oil from subterranean formations may be enhanced by the effects of microorganisms that have characteristics such as promoting oil release by reduction in surface and interfacial tensions and/or forming

bio-plugs to reduce channeling to improve sweep efficiency. One approach for Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR) is to stimulate growth of microorganisms having these properties that are indigenous to or inoculated into subterranean formations of oil reservoirs. 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. Microorganisms belonging to the genus *Shewanella* were isolated from oil reservoir samples using media containing nitrate or Fe(III) as the electron acceptor and were found to be useful for MEOR processes as disclosed in US 7,776,795 and US 2011-0030956. Microorganisms belonging to the genus *Arcobacter* were also isolated and found to be useful for MEOR processes as disclosed in commonly owned and co-pending US Patent Application No. 13/280972.

There remains a need for methods of obtaining targeted populations of microorganisms or isolated microorganisms from oil reservoir fluids that include microorganisms belonging to the *Shewanella* and *Arcobacter* genera, since these microorganisms are effective in MEOR processes.

SUMMARY OF THE INVENTION

The invention relates to methods of enrichment for microorganisms belonging to the *Shewanella* genus, as well as to methods of isolating microorganisms belonging to the *Shewanella* genus by growth in media containing specified types of electron acceptors. In addition, salt concentrations may be specified.

Accordingly, the invention provides enriching a microbial population comprising:

- a) providing an environmental sample from an oil reservoir fluid comprising an indigenous microbial population; and
- b) growing said sample using medium comprising salt, at least one carbon source, and an electron acceptor selected from organic electron acceptors and metal ion electron acceptors to obtain an enriched microbial population;

wherein the proportion of *Shewanella* cells in the enriched microbial population of (b) is greater than the proportion of *Shewanella* cells in the environmental sample of (a).

In another embodiment the invention provides a method for

5 isolating a strain of the *Shewanella* genus comprising:

a) providing an environmental sample from an oil reservoir fluid comprising an indigenous microbial population;

b) growing said sample using medium comprising salt, at least one carbon source, and an electron acceptor selected from organic
10 electron acceptors and metal ion electron acceptors to obtain an enriched microbial population;

c) growing the enriched microbial population of (b) on medium having salt concentration that is between about 10 ppt and 40 ppt to obtain isolated colonies; and

d) screening the isolated colonies of (c) by rDNA sequence analysis against known microbial rDNA sequences;

wherein at least one *Shewanella* strain is identified.

In yet another embodiment the invention provides a method for enhancing oil recovery from an oil reservoir comprising:

20 a) providing an enriched microbial population obtained by the method of claim 1 or 3;

b) introducing the enriched microbial population of (a) into an oil reservoir;

c) introducing a nutrient solution comprising at least one carbon
25 source and at least one electron acceptor into said oil reservoir; and

d) recovering oil from the oil reservoir;

wherein growth of the enriched microbial population enhances oil recovery.

30 BRIEF DESCRIPTION OF SEQUENCES

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

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
5 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.

10 SEQ ID NO:1 is the nucleotide sequence of reverse PCR primer 1492R.

SEQ ID NO:2 is the nucleotide sequence of forward PCR primer 8F.

15 SEQ ID NO:3 is the nucleotide sequence of the 16S rDNA used to identify the *Shewanella* homology cluster.

SEQ ID NO:4 is the nucleotide sequence of the 16S rDNA used to identify the *Arcobacter* homology cluster.

DETAILED DESCRIPTION

20 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
25 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
30 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 of obtaining from oil reservoir fluids, microbial consortia that have increased proportion of microorganisms belonging to *Shewanella* species with respect to the proportion of *Shewanella* in the original fluids. In addition, methods for isolating strains of *Shewanella* are disclosed. The obtained consortia or isolated strains may be used to increase oil recovery.

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

As used herein, the terms "comprises," "comprising," "includes," "including," "has," "having," "contains" or "containing," or any other variation thereof, are intended to cover a non-exclusive inclusion. For example, a composition, a mixture, process, method, article, or apparatus that comprises a list of elements is not necessarily limited to only those elements but may include other elements not expressly listed or inherent to such composition, mixture, process, method, article, or apparatus. Further, unless expressly stated to the contrary, "or" refers to an inclusive or and not to an exclusive or. For example, a condition A or B is satisfied by any one of the following: A is true (or present) and B is false (or not present), A is false (or not present) and B is true (or present), and both A and B are true (or present).

Also, the indefinite articles "a" and "an" preceding an element or component of the invention are intended to be nonrestrictive regarding the number of instances (i.e. occurrences) of the element or component. Therefore "a" or "an" should be read to include one or at least one, and the singular word form of the element or component also includes the plural unless the number is obviously meant to be singular.

The term "invention" or "present invention" as used herein is a non-limiting term and is not intended to refer to any single embodiment of the particular invention but encompasses all possible embodiments as described in the specification and the claims.

As used herein, the term "about" modifying the quantity of an ingredient or reactant of the invention employed refers to variation in the numerical quantity that can occur, for example, through typical measuring

and liquid handling procedures used for making concentrates or use solutions in the real world; through inadvertent error in these procedures; through differences in the manufacture, source, or purity of the ingredients employed to make the compositions or carry out the methods; and the like.

5 The term "about" also encompasses amounts that differ due to different equilibrium conditions for a composition resulting from a particular initial mixture. Whether or not modified by the term "about", the claims include equivalents to the quantities. In one embodiment, the term "about" means within 10% of the reported numerical value, preferably within 5% of the
10 reported numerical value.

"Petroleum" or "oil" is a naturally occurring, flammable liquid found in rock and sand formations in the Earth, which consisting of a complex mixture of hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbon of various molecular weights, plus other organic compounds.

15 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, consolidated sand and soil having sufficient porosity and permeability to store and transmit oil.

20 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 term "Microbial Enhanced Oil Recovery" (MEOR) is a
25 biological based technology consisting in modifying microbial function or structure, or both, of microbial environments or microbes, or both existing in oil reservoirs. The ultimate aim of MEOR is to improve the recovery of oil entrapped in porous media. MEOR is a tertiary oil extraction technology allowing the partial recovery of residual of oil in effect, increasing the life of
30 oil reservoirs.

The term "remediation" refers to the process used to remove hydrocarbon contaminants from contaminant-altered environment.

The term "bioremediation" refers to the use of microorganisms to remediate or detoxify contaminants from a contaminant-altered environment

The term "electron donor" refers to a molecular compound that
5 gives or donates an electron(s) during cellular respiration.

The term "electron acceptor" refers to a molecular 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
10 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
15 hydrocarbons are examples of compounds that can act as electron donors. The terms "denitrifying" and "denitrification" mean reducing nitrate or nitrite for use in respiratory energy generation.

"Adhered to" refers to coating or adsorption of a liquid to a solid surface of at least 10% areal coverage.

20 The term "wetting" refers to the ability of a liquid to maintain contact with a solid surface, resulting from intermolecular interactions when the two are brought together. The degree of wetting (expressed as "wettability") is determined by a force balance between adhesive and cohesive forces.

25 "Wetting agent" refers to a chemical such as a surfactant that increases the water wettability of a solid or porous surface by changing the hydrophobic surface into one that is more hydrophilic. Wetting agents help spread the wetting phase (e.g., water) onto the surface thereby making the surface more water wet.

30 "Interface" as used herein refers to the surface of contact between a water layer and an oil layer, a water layer and a solid surface layer, and an oil layer and a solid surface layer.

"Hydrocarbon-coated" as used herein refers to a coating of a hydrocarbon to a solid surface of at least 10% areal coverage.

The term "components of a subsurface formation" refers to rock, soil, brine, sand, clay or mixtures thereof of either subterranean or seabed
5 formations, that have come in contact with one or more hydrocarbon. These components may be part of an oil well or reservoir. At least a portion of the components include some hydrocarbon-coated surfaces, including particles with coated surfaces.

"Wettability" refers to the preference of a solid to contact one liquid,
10 known as the wetting phase, rather than another. Solid surfaces can be water wet, oil wet or intermediate wet. "Water wettability" pertains to the adhesion of water to the surface of a solid. In water-wet conditions, a thin film of water coats the solid surface, a condition that is desirable for efficient oil transport.

15 The term "adhesive forces" refers to the forces between a liquid and solid that cause a liquid drop to spread across the surface.

The "cohesive forces" refers to forces within the liquid that cause the drop to ball up and avoid contact with the surface.

The term "water flooding" refers to injecting water through well
20 bores into an oil reservoir. Water flooding (secondary oil recovery) is performed to flush out oil from an oil reservoir when the oil no longer flows on its own out of the reservoir.

The term "sweep efficiency" relates to the fraction of an oil-bearing stratum that has seen fluid or water passing through it to move oil to
25 production wells during water flooding. One problem that can be encountered with water flooding 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
30 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 "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
5 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,
10 sedimentation and centrifugation.

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

15 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
20 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.

25 The term "simple nitrates" and "simple nitrites" refer to nitrate (NO_3) and nitrite (NO_2), respectively.

The term "bioplugging" refers to making permeable material less permeable due to the biological activity, particularly by a microorganism.

The term "indigenous microorganisms" refers to the microorganisms
30 that are native to the oil reservoir fluids and subterranean matrices.

The term "inoculated microorganisms" refers to the microorganism that are introduced to the oil reservoir fluids and subterranean matrices by

injecting the microbes through a well bore into the oil reservoir substructure.

“*Shewanella* species” or “*Shewanella* spp.” refers to microorganisms phylogenetically classified by rDNA typing to the *Shewanella* genus. Members to *Shewanella* are Gram negative, metal-reducing, gamma-proteobacteria that are capable of reducing a wide range of terminal electron acceptors. These microorganisms gain energy to support anaerobic growth by coupling the oxidation of H₂ or organic matter to the redox transformation of a variety of multivalent metals, which leads to the precipitation, transformation, or dissolution of minerals.

The term “salt” includes any ionic compound that can create ions in water including, but not limited to KCl, SrCl, NaBr, NaCl, CaCl₂, and MgCl₂.

Obtaining *Shewanella*-enriched populations from oil reservoir fluids

Disclosed herein are methods for increasing the proportion of microorganisms belonging to the *Shewanella* genus among total populations of indigenous microorganisms of oil reservoir fluids. Strains of *Shewanella* are desired for their properties that are useful for enhancing oil recovery, as described below. Oil reservoir fluids (i.e., an “environmental sample”) may be production waters or injection waters and contain heterogeneous mixtures of microorganisms. The genera to which these microorganisms belong can be identified by 16S ribosomal DNA sequence analysis, and the proportion of microorganisms in each genera in the population of an oil reservoir fluid sample can be determined, as described in the Examples herein.

Oil reservoir fluid samples which provide the environmental samples evaluated herein were from reservoirs in the Senlac field located in the province of Saskatchewan, Canada, and in the Wainwright field in the province of Alberta, Canada. The waters of these reservoirs have high salinity: in the range of 30 to 38 ppt and in the range of 60 to 68 ppt, respectively. Analysis herein, in Examples 1 and 2, of the microorganisms indigenous to these oil reservoir fluid samples detected no microorganisms

belonging to the *Shewanella* genus. Methods were developed involving growing indigenous populations of oil reservoir fluid samples in media containing specified electron acceptors whereby microorganisms belonging to the *Shewanella* genus became detectable as a proportion of the population. These methods therefore enrich for *Shewanella* microorganisms in a microbial population.

In the present methods, microorganisms in a sample from an oil reservoir are grown using medium containing salt, at least one carbon source, and an electron acceptor selected from organic electron acceptors and metal ion electron acceptors. In addition, the medium contains other components to support microorganism growth which may include components such as vitamins, trace metals, nitrogen, phosphorus, magnesium, calcium, and /or buffering chemicals. 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 citrate, fumarate, maleate, butyrate, pyruvate, succinate, acetate, formate or lactate.

Organic electron acceptors that may be used include compounds such as fumarate, trimethylamine-N-oxide, dimethyl sulfoxide, pyruvate, glycine, and mixtures of these compounds. Fumarate may be in the form of any salt of fumaric acid, or fumaric acid itself may in this context be included in the term fumarate. Salts of fumarate may include a monosodium or disodium salt, calcium salt, magnesium salt, ammonium or diammonium salt, potassium or dipotassium salt, hydrochloride salt, or hydrated forms of any fumarate acid salt. In one embodiment the composition contains disodium fumarate (DSF).

Metal ion electron acceptors that may be used include compounds such as Fe(III), Mn(IV), Cr(IV), and mixtures of these compounds.

With growth of indigenous oil reservoir fluid populations of microorganisms using media containing these electron acceptors, the proportion of the population that belongs to the *Shewanella* genus (which are *Shewanella* cells) increases, in contrast to growth in media containing nitrate as the electron acceptor. The proportion of the population that

belongs to the *Shewanella* genus increases to at least about 1%. The increase in proportion of *Shewanella* cells depends upon factors such as the distribution of microorganisms in the population indigenous to the fluid sample, the specific electron acceptor used, and the salt concentration of the medium. The proportion of the population that belongs to the *Shewanella* genus may increase to at least about 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, or higher, including to at least about 90%.

The salt concentration of the medium may be adjusted to be favorable for the growth of microorganisms belonging to the *Shewanella* genus. As found in Example 3 herein, *Shewanella* microorganisms grow in media having a wide range of salt concentrations including low salt concentration (11 ppt) or high salt concentration (60 ppt), but grow best in salt concentrations of about 15 – 20 ppt. In one embodiment of the present method the salt concentration is between about 10 and 55 ppt. In other embodiments the salt concentration is between about 10 and 40 ppt, or about 15 and 35 ppt.

When using the present method, the enriched microorganism population may contain microorganisms belonging to the *Arcobacter* genus. The proportion of the population that belongs to the *Arcobacter* genus depends upon factors such as the distribution of microorganisms in the population indigenous to the fluid sample, the specific electron acceptor used, and the salt concentration of the medium. In particular, with use of an organic electron acceptor a large proportion of the population belong to the *Arcobacter* genus, such as greater than 20%. The salt concentration of the medium may be adjusted to be favorable for the growth of microorganisms belonging to the *Arcobacter* and *Shewanella* genera. For example, *Arcobacter* species will be reduced and may not be detected when using lower salt concentration such as about 34 ppt. Salt concentrations that are at least about 40 ppt may be used to obtain populations containing detectable levels of *Arcobacter* cells. In one embodiment the salt concentration is between about 40 and 55 ppt and *Shewanella* and *Arcobacter* cells are present in the population obtained. In

another embodiment the salt concentration is at least about 50 ppt and the proportion of *Arcobacter* cells is at least about 20%.

Isolating *Shewanella* strains

5 Strains of microorganisms belonging to the *Shewanella* genus may be isolated from populations enriched for *Shewanella* cells that are obtained following the present methods as described above. Following the enrichment, samples are grown on medium having salt concentration that is between about 10 ppt and 40 ppt to isolate single colonies from
10 which strains are grown. The 16S ribosomal DNA (rDNA) sequence is obtained for an isolated strain and compared to sequences in the NCBI rDNA database (~260,000 rDNA sequences) using the BLAST algorithm (Altschul et al., Journal of Molecular Biology, 1990). A strain is identified as a *Shewanella* strain when the highest scoring sequence identity hit is
15 from a known species of *Shewanella*.

 The present method of enrichment using an organic or metal ion electron acceptor and growth on medium having a salt concentration supportive for growth of *Shewanella* cells allows isolation of *Shewanella* strains at high frequency. Of analyzed strains, at least one in ten, or nine,
20 or eight, or seven, or six, or five, or four, or three, or two, or one, strains analyzed is a *Shewanella* strain.

Use of *Shewanella* and *Arcobacter* cells for MEOR

 The present *Shewanella*-enriched microbial populations are useful
25 for enhancing oil recovery. *Shewanella* cells have been shown to have properties that are beneficial for enhancing oil recovery from oil reservoirs. For example, disclosed in US 7,776,795, which is incorporated herein by reference, is isolation of *Shewanella putrefaciens* strain LH4:18 (ATCC No. PTA-8822) from water samples from production and injection wells from
30 Alaska North Slope oil fields by growth on distilled crude oil in medium containing nitrate and salts in a column reactor. This strain was shown to enhance oil release from sand. Additionally disclosed in US 2011-0030956, which is incorporated herein by reference, is the ability of

Shewanella cells or materials or biomolecules produced by *Shewanella* to alter the wettability of a hydrocarbon coated surface, thereby releasing oil from the surface. Oil released in this manner from surfaces in an oil reservoir can be recovered in secondary oil recovery methods such as water flooding.

In some embodiments, in addition to *Shewanella* cells, the present enriched microbial populations contain *Arcobacter* cells. *Arcobacter* cells have been shown to have properties that are beneficial for enhancing oil recovery from oil reservoirs. As disclosed in commonly owned and co-pending US Patent Application No. 13/280972, which is incorporated herein by reference, *Arcobacter* strains including 97AE3-3 (ATCC No. PTA-11410) and 97AE3-12 (ATCC No. PTA- 11409) isolated therein are able to form plugging biofilms. Strain 97AE3-12 grew in the presence of petroleum oil, in both low (15 ppt) and high salinity (64 ppt) denitrifying conditions. Plugging biofilms were produced in low (15 ppt) and high (35 ppt and 68 ppt) salinity media. Plugging biofilms were formed with either batch or continuous nutrient feeding. In addition, silica particle aggregation was demonstrated in high salinity (64 ppt) media. These properties demonstrate use of the *Arcobacter* strains for forming biofilms to plug highly permeable 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.

Methods of Enhancing Oil Recovery

The present *Shewanella*-enriched microbial populations, in some embodiments additionally containing *Arcobacter* cells, may be introduced into an oil reservoir leading to enhancement in oil recovery. The population injected is typically in a fluid, such as the medium used to grow the microorganisms. The oil reservoir is also injected either concurrently with, or following injection of the microbial population, with a nutrient solution. The nutrient solution is one that is supportive of growth of the *Shewanella* cells in the population, and of the *Arcobacter* cells if present.

The nutrient solution contains at least one carbon source and an electron acceptor. In some embodiments the electron acceptor is an organic electron acceptor or a metal ion electron acceptor as described above. In some embodiments the carbon source is acetate, lactate, succinate,
 5 butyrate or formate. In addition the nutrient solution may contain media components as described above.

The microbial population may be introduced into an oil reservoir by any method known to one of skill in the art. Typically introduction into an oil reservoir is by injecting into an injection well, but injection may also be
 10 into a production well. The injected fluids flow through the well and into the subterranean sites adjacent to the well. After introduction a period of time is allowed for growth of the introduced microorganisms. This period of microbial growth may be a week or more. In one embodiment this period is about two to three weeks. Following this period, injection water
 15 is introduced into the well bore and it flow through the well and into the subterranean sites adjacent to the well. However, now permeable rock is populated by the microorganisms so that the water displaces the oil in the oil reservoir. The water containing oil is recovered from at least one production well.

20 GENERAL METHODS

The meaning of abbreviations are used in this application are as follows: "hr" means hour(s), "min" means minute(s), "day" means day(s), "mL" means milliliters, "mg/mL" means milligram per milliliter, "L" means liters, "μL" means microliters, "mM" means millimolar, "μM" means
 25 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, "ppt" means part per thousand, "g/L" means gram per liter, "mL/min" means milliliter per minute,
 30 "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, "psig" means per square inch per gram,

"LB" means Luria broth, "rpm" means revolution per minute, "NIC" means non inoculated control.

Growth of microorganisms

5 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). Fumarate is utilized as the primary electron acceptor under the growth conditions used herein. Nitrate was used in some enrichment as alternative electron
10 acceptor control. Under denitrification, anaerobic growth is measured by nitrate depletion from the growth medium over time. 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
15 reduced to nitrogen. Hence, accumulation and sometimes dissipation of nitrite is therefore also considered evidence for active growth and metabolism by microorganisms. Increase in turbidity due to increase in concentration of bacteria cells and/or the formation of biofilm on the bottom of the anaerobic serum vials or at their aqueous and gas interface
20 were also taken as indicators of microbial growth.

Ion chromatography

To quantitate nitrate and nitrite ions in aqueous media, Applicants used an ICS2000 chromatography unit (Dionex, Banockburn, IL). Ion
25 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.

Measurement of Total Dissolved Salts by Refractometer

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

Samples from oil reservoir production and injection waters

Petroleum well systems were sampled for this study. One is called Well system #1, which is in the Senlac field, located in the province of Saskatchewan, Canada and the other is called Well system #2, which is located in the Wainwright field in the province of Alberta, Canada. Reservoir water taken from Well system #1 has a salinity near Sea Water, which is in the range of 30 to 38 ppt and Well system #2 has a salinity of about twice seawater, which is in the range of 60 to 68 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 research facilities and arrived within 48 hr of sampling.

Genomic DNA extractions from bacterial cultures

To extract genomic DNA from reservoir production and injection waters and liquid bacterial enrichment cultures, cells were harvested and concentrated by filtration onto a 0.2 micron Supor[®] Filter (Pall Corp, Ann Arbor, MI). An aliquot (2-5 mL) of a bacterial culture was passed through a 0.2 micron, 25 mm filter disk in a removable cartridge holder using either vacuum or syringe pressure. The filters were removed and placed in lysis buffer (100 mM Tris-HCL, 50 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH8.0) followed by agitation using a Vortex mixer.

Reagents were then added to a final concentration of 2.0 mg/mL lysozyme, 10 mg/mL SDS, and 10 mg/mL Sarkosyl to lyse the cells. After further mixing with a Vortex mixer, 0.1 mg/mL RNase and 0.1 mg/mL Proteinase K were added to remove the RNA and protein contaminants and the mixture was incubated at 37 °C for 1.0- 2.0 hr. Post incubation, the filters were removed and samples were extracted twice with an equal volume of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1, v/v/v) and once with chloroform:isoamyl alcohol (24:1, v/v). One-tenth volume of 5.0 M NaCl and two volumes of 100% ethanol were added to the aqueous layer

and mixed. The tubes were frozen at -20 °C overnight and then centrifuged at 15,000 x g for 30 min at room temperature to pellet chromosomal DNA. The pellets were washed once with 70% ethanol, centrifuged at 15,000 x g for 10 min, dried, resuspended in 100 µL of de-ionized water and stored at -20 °C. An aliquot of the extracted DNA was analyzed on an agarose gel to ascertain the quantity and quality of the extracted DNA.

Population analysis of the microorganism populations using rDNA profiling
cloned microbial genomic 16S rDNA libraries.

Genomic 16S rDNA libraries were generated from the petroleum reservoir production and injection waters samples from both well systems and from samples from enrichment cultures. Primer sets were chosen from Lane, ((1991) 16S/23S rRNA sequencing, p. 115-175. *In* Stackebrandt, E. and M. Goodfellow (ed.), Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. John Wiley and Sons, New York, NY) to generate PCR amplified 16S rDNA fragments from microbial species present in the DNA samples prepared from the well samples or the enrichment cultures. The combination of forward primer (SEQ ID NO:1) and reverse primers (SEQ ID NO:2) were chosen to specifically amplify the bacterial 16S rDNA sequences.

The PCR amplification mix included: 1.0X Go Taq® PCR buffer (Promega), 0.25 mM dNTPs, 25 pmol of each primer, in a 50 µL reaction volume. 0.5 µL of Go Taq® DNA polymerase (Promega) and 1.0 µL (20 ng) of sample DNA were added. The PCR reaction thermal cycling protocol used 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 Applied Biosystems® GeneAmp® 9700 thermocycler (LifeTenchologies, Corp, Grand Island, NY). This protocol was also used with cells from either purified colonies or mixed species from enrichment cultures.

The 1400 base pair amplification products for a given DNA pool were visualized on 0.8% agarose gels. The PCR reaction mix was used

directly for cloning into pCR[®]-TOPO4[®] vector using the TOPO[®] TA cloning system (Invitrogen[™], Life Technologies, Corp, Carlsbad, CA) 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.

Plasmid template preparation

Large-scale automated template purification systems used Solid Phase Reversible Immobilization (SPRI[®], Agencourt, Beverly, MA; DeAngelis, M. M., et al., Nucleic Acid Res., 23: 4742 - 4743, 1995). The SPRI[®] technology uses carboxylate-coated, iron-core, paramagnetic particles to capture DNA of a desired fragment length based on tuned buffering conditions. Once the desired DNA is captured on the particles, they can be magnetically concentrated and separated so that contaminants can be washed away.

The plasmid templates were purified using a streamlined SprintPrep[™] SPRI protocol (Agencourt). This procedure harvests plasmid DNA directly from lysed bacterial cultures by trapping both plasmid and genomic DNA to the functionalized bead particles and selectively eluting only the plasmid DNA. Briefly, the purification procedure involves addition of alkaline lysis buffer (containing RNase A) to the bacterial culture, addition of alcohol based precipitation reagent including paramagnetic particles, separation of the magnetic particles using custom ring based magnetic separator plates, 5x washing of beads with 70% ETOH, and elution of the plasmid DNA with water.

rDNA sequencing, clone assembly and phylogenetic DNA analysis

DNA templates were sequenced in a 384-well format using BigDye[®] Version 3.1 reactions on ABI[®]3730 instruments (Applied Biosystems[®], Foster City, CA). Thermal cycling was performed using a 384-well thermalcycler. Sequencing reactions were purified using Agencourt's CleanSeq[®] dye-terminator removal kit as recommended by the

manufacturer. The reactions were analyzed with a model ABI3730XL capillary sequencer using an extended run module developed at Agencourt. All sequence analyses and calls were processed using Phred base calling software (Ewing et al., Genome Res., 8: 175 -185, 1998) and
5 constantly monitored against quality metrics.

Assembly of rDNA clones

A file for each rDNA clone was generated. The assembly of the sequence data generated for the rDNA clones was performed by the
10 PHRAP assembly program (Ewing, et al., *supra*). Consensus sequence and consensus quality files were generated for greater than one overlapping sequence read.

Analysis of rDNA sequences

Each assembled sequence was compared to the NCBI (rDNA database; ~260,000 rDNA sequences) using the BLAST[®] algorithm program (Altschul, *supra*). The BLAST[®] hits were used to group the sequences into homology clusters, each containing sequences with ≥90% identity to the same NCBI rDNA fragment. The nucleotide sequence of
20 the 16S rDNA used to identify the *Shewanella* homology cluster was SEQ ID NO:3. The nucleotide sequence of the 16S rDNA used to identify the *Arcobacter* homology cluster was SEQ ID NO:4. The homology clusters were used to calculate proportions of particular species in any sample. Because amplification and cloning protocols were identical for analysis of
25 each sample, the proportions could be compared from sample to sample. This allowed comparisons of population differences in samples taken for different enrichment selections or at different sampling times for the same enrichment consortium culture.

DNA preparation bacterial colony isolates for sequence analysis

Genomic DNA from bacterial colonies plated on Marine agar was isolated by diluting bacterial colonies in 50 µL of water or Tris-HCL buffer pH7-8. The 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 μ L) of a diluted colony was added to 9.0 μ L of the Lysis Reagent (from the GenomiPHI[®] Amplification Kit) and heated to 95 °C for 3 min followed by immediate cooling to 4 °C.

- 5 9.0 μ L of enzyme buffer and 1.0 μ L 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

- 10 DNA sequencing reactions were set up as follows: 8.0 μ L of GenomiPHI amplified sample were added to 8.0 μ L of BigDye[®] v3.1 Sequencing reagent (Applied Biosystems[™], Foster City, CA) followed by 3.0 μ L of 10 μ M primers SEQ ID NOs:1, 2, 3, or 4 (prepared by Sigma Genosys, Woodlands, TX), 4.0 μ L of 5X BigDye[®] Dilution buffer (Applied Biosystems[™]) and 17 μ L 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
20 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[®], Thermo Scientific[®], Newtown, CT) at 25 °C. The cleaned up reactions were placed directly onto an Applied Biosystems[™] 3730
25 DNA sequencer and sequenced with automatic base-calling.

- Each of the assembled rDNA sequences was compared to the NCBI rDNA database (~260,000 rDNA sequences) using the BLAST[®] algorithm (Altschul et al., Journal of Molecular Biology, 1990). The highest scoring sequence identity hit was used as an identifier of the most closely
30 related known species for strain identification.

Alternatively, to generate amplified rDNA fragments from individual strains, we chose the same primer sets from Lane, D. J. (supra). 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® DNA 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 an Applied Biosystems™ GeneAmp® 9700 thermocycler. The 1400 base pair amplification products were visualized on 1.0% agarose gels. Sequencing of the amplified fragments and strain identification was as described above.

EXAMPLE 1

ANAEROBIC ENRICHMENT FOR INDIGENOUS MICROBES FROM HIGH SALINITY OIL RESERVOIR SAMPLES

Three different electron acceptors were used in oil reservoir sample enrichments. 1 mL of either injection water or production water from Well system #1 or #2, described in General Methods, was inoculated into 9 mL of minimal salts medium (Table 1) in 20 mL anaerobic serum vials. In addition, the minimal salts medium was supplemented with 43 ppt sodium chloride to bring its salinity to 53 ppt. The growth medium was then supplemented with 2000 ppm sodium lactate to serve as the carbon source and 3.7 g/L sodium fumarate as electron acceptor. Separate cultures were supplemented with 1600 ppm sodium nitrate or 2500 ppm Fe(III) added as ethylenediaminetetraacetic acid ferric sodium salt (EDTA (C₁₀H₁₂FeN₂NaO₈; E6760-100G, Sigma-Aldrich, St Louis Mo.) in place of fumarate. The medium was deoxygenated (anaerobic) by sparging the filled vials with a mixture of nitrogen and carbon dioxide (80%/20%) followed by autoclaving. All manipulations of the oil field water samples, which contained indigenous microbes from the reservoir, were performed in an anaerobic chamber (Coy Laboratories Products, Inc., Grass Lake, MI). The inoculated culture bottles were incubated at ambient temperature.

Table 1 Minimal salts medium

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

The pH of the medium was adjusted to 6.8, approximate reservoir pH.

The enrichment cultures containing nitrate were monitored and sampled regularly for nitrate depletion and nitrite accumulation, or in some cases, nitrite depletion. When nitrate was depleted in the sample (usually by 14 days), lactate and nitrate were added to the original final concentrations. At the same time, lactate and fumarate were added in each of the other enrichments to the original final concentrations as well.

All vials were incubated for an additional 14 to 20 days at room temperature. Visible changes in the cultures, which indicated growth on lactate and the electron acceptor, were observed in each of the enrichment samples. Changes included visible turbidity in the medium, and/or the presence of biofilms on the glass vials or at the gas-aqueous interface, as well as nitrate and nitrite reduction in vials containing nitrate as the electron acceptor. Turbidity was similar in each vial indicating that there was a diverse population of microorganisms in both the injection waters and the production waters.

EXAMPLE 2

ANALYSIS OF POPULATIONS IN ANAEROBIC ENRICHMENTMENT CULTURES

Before the enrichment cultures were started, the baseline distributions of the indigenous microbial populations in Well system #1 and Well system #2, were determined by rDNA population profiles, which were made using the reservoir production and injection waters from both systems using the method described above in General Methods. After 4 weeks of growth, all enrichment cultures were profiled using rDNA sequence distributions, as described in General Methods, to see differences in population profiles as compared to the indigenous populations.

Results of 16S rDNA sequence analysis for Well system #1

For Well system #1, 16S rDNA profiles were compiled for the production water and for a sample of the production water enrichment cultures. The homology clusters, each with $\geq 90\%$ identity to the same

NCBI rDNA fragment sequence file as described in General Methods, obtained for the parent production water sample for the fumarate enrichment culture, and for the Fe(III) enrichment culture were used to calculate the proportions of different types of bacteria in each sample.

- 5 The results are given in Table 2. The nitrate enrichment culture was not evaluated in this sample.

Table 2. Phylogenetic Distributions in Well System#1 Production Water and enrichment cultures

Bacterial identification	Proportion of population		
	Well System #1 Production water	Fumarate enrichment	Fe(III) enrichment
Epsilonproteobacter; <i>Arcobacter</i>	71.7%	65.2%	10%
Gammaproteobacter; <i>Shewanella</i>	nd*	2.1%	17.4%
Other	28.3%	32.7%	72.6%

- 10 nd* means not detected

The results showed that bacteria belonging to the *Arcobacter* genus of the Epsilonproteobacteria class of Proteobacteria were the predominant type of bacteria present in Well System #1 production water (about 72%), and with fumarate enrichment the *Arcobacter* genus remained the predominant type of bacteria present with about 65% of the population. Also with fumarate enrichment the percentage of bacteria belonging to the *Shewanella* genus of the Gammaproteobacteria class increased to about 2% from being undetectable.

- 20 With Fe(III) enrichment the percentage of bacteria belonging to *Shewanella* increased, while the percentage of bacteria belonging to *Arcobacter* decreased.

- 25 The fumarate enrichment culture was incubated for another 14 days at room temperature, a 100 μ L aliquot was streaked from the enrichment onto a Marine broth agar plate (made per recipe, Difco™ 2216, Becton-Dickenson, Sparks, MD) and the plate was incubated at room temperature for two days. Marine broth has salinity of approximately 34 ppm (with 19.5 ppm NaCl). Electron acceptors in marine broth include sulfate, nitrate and unspecified organic electron acceptors from peptone and yeast extract.

Random colonies were restreaked onto Marine broth agar plates and grown to purify isolates. To characterized the identity of the isolates, the colonies were screened for identification by PCR amplification using direct colony rDNA analysis described in the General Methods using both
 5 the Lane reverse (supra) PCR primer 1492R (SEQ ID NO:1) and forward PCR primer 8F (SEQ ID NO:2). The DNA sequencing and analysis described in General Methods was used to obtain 16S rDNA sequences for microbial identification.

Bacteria belonging to the *Shewanella* genus were the predominant
 10 isolated colonies form the fumarate enrichment followed by streaking on solid Marine broth agar plates. Following this process, about 52% of the population was classified as *Shewanella*. *Arcobacter* cells were not isolated using this particular procedure.

The reduced salt concentration in the marine broth may have
 15 favored growth of *Shewanella* and other bacterial genera over growth of *Arcobacter*.

Table 3. Phylogenetic Distribution of Isolated Colonies grown on Marinebroth Agar following Fumarate Enrichment of Well System#1

20

Production Water

Bacterial identification	Proportion of population
Epsilonproteobacter; <i>Arcobacter</i>	nd*
Gammaproteobacter; <i>Shewanella</i>	51.7%
Other	48.3%

nd* means not detected

Results of 16S rDNA sequence analysis for Well system #2

For Well system #2 production and injection water samples,
 25 enrichment cultures were prepared as described above with fumarate, nitrate, or Fe(III) as the electron acceptor. Population profiles based on 16S rDNA sequences, obtained as described in General Methods, were compiled for the production water, injection water, and enrichment cultures that are shown in Tables 4 and 5.

In the Well system #2 production water, *Shewanella* cells were not detected and *Arcobacter* cells were not well represented, at 4% (Table 4). In both the fumarate and nitrate enrichments the proportion of bacteria belonging to *Arcobacter* increased to become the predominant type: about 89% and 85% of the population, respectively. The *Arcobacter* population had a small increase with Fe(III) enrichment. With fumarate and Fe(III) enrichments, the *Shewanella* population increased, while in the nitrate enrichment *Shewanella* cells were still not detected.

Table 4. Phylogenetic Distribution in Well System #2 Production Water and its Enrichments

Bacterial identification	Proportion of population			
	Well System #2 Production water	Fumarate enrichment	Fe(III) enrichment	Nitrate enrichment
Epsilonproteobacter; <i>Arcobacter</i>	4%	88.6 %	8.3%	85.2 %
Gammaproteobacter; <i>Shewanella</i>	nd*	2.1	10.7%	nd
Other	96.0%	9.3%	81%	14.8%

nd* means not detected

In Well system #2 injection water, *Shewanella* cells were again not represented, while *Arcobacter* cells were the predominant microorganisms. In the fumarate enrichment culture, the proportion of *Shewanella* cells increased from undetectable to 21% of the population. The proportion of *Arcobacter* cells decreased, but remained the most predominant species at 26%. In the Fe(III) enrichment the proportion of *Arcobacter* cells decreased to not detectable, while the proportion of *Shewanella* cells increased to about 90%. In the nitrate enrichment *Shewanella* cells remained undetected while *Arcobacter* cells were reduced, but were well-represented at about 22%.

Table 5. Phylogenetic Distribution in Fumarate Enrichment of Well System #2 Injection Water

Bacterial identification	Proportion of population			
	Well System #2 injection water	Fumarate enrichment	Fe(III) enrichment	Nitrate enrichment
Epsilonproteobacter; <i>Arcobacter</i>	88.0%	26.0%	nd*	22.2%
Gammaproteobacter; <i>Shewanella</i>	nd	21%	90.4%	nd
Other	12%	53%	9.6%	77.8%

nd* means not detected

5

EXAMPLE 3

SALT TOLERANCE OF SHEWANELLA

A *Shewanella* strain isolated from the fumarate enrichment of Well #2 injection water was grown at 32 °C in 1% Bacto tryptone medium containing varying amounts of NaCl. Actual salinity was approximately 10 ppt higher than the ppt of NaCl due to the contribution of the tryptone in the medium, as measured by actual refractometric readings. The growth rate was determined for the strain in each NaCl concentration by measuring OD600, and is shown in Table 6, where Growth rate $k = \log_2/T$, where T = doubling time.

15

Table 6. Growth rates of Well #2 *Shewanella* strain in different amounts of NaCl

NaCl ppt	1	5	10	15	20	25	30	40	50
Growth rate (h^{-1})	0.49	1.20	1.12	0.94	0.96	0.63	0.55	0.60	0.42

The isolated *Shewanella* strain grew best in a salinity of about 15 ppt (5 ppt of NaCl + 10 ppt of tryptone), with declining growth rate at higher salinities. The growth rate was substantially reduced at salinities of 11 and 60 ppt.

CLAIMS

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method for enriching a microbial population comprising:
 - a) providing an environmental sample from an oil reservoir fluid
 - 5 comprising an indigenous microbial population; and
 - b) growing said sample using medium comprising salt, at least one carbon source, and an electron acceptor selected from organic electron acceptors and metal ion electron acceptors to obtain an enriched microbial population;
- 10 wherein the proportion of *Shewanella* cells in the enriched microbial population of (b) is greater than the proportion of *Shewanella* cells in the environmental sample of (a).
2. The method of claim 1 wherein the medium of (b) has salt
- 15 concentration that is between about 10 ppt and 55 ppt.
3. The method of claim 1 further comprising a step after (b) of growing the enriched microbial population of (b) using medium having salt concentration that is between about 15 ppt and 35 ppt to obtain a second
- 20 enriched microbial population.
4. The method of claim 1 wherein the electron acceptor is an organic electron acceptor and wherein *Arcobacter* cells are present in the enriched microbial population of (b).
- 25
5. The method of claim 4 wherein the salt concentration is at least about 40 ppt.
6. The method of claim 1 wherein the at least one carbon source of
- 30 (b) is selected from the group consisting of acetate, lactate, pyruvate, butyrate, and formate.
7. A method for isolating a strain of the *Shewanella* genus

comprising:

a) providing an environmental sample from an oil reservoir fluid comprising an indigenous microbial population;

b) growing said sample using medium comprising salt, at least one
5 carbon source, and an electron acceptor selected from organic electron acceptors and metal ion electron acceptors to obtain an enriched microbial population;

c) growing the enriched microbial population of (b) on medium having salt concentration that is between about 10 ppt and 40 ppt to obtain
10 isolated colonies; and

d) screening the isolated colonies of (c) by rDNA sequence analysis against known microbial rDNA sequences;

wherein at least one *Shewanella* strain is identified.

15 8. The method of claim 7 wherein the medium of (b) has salt concentration that is between about 10 ppt and 40 ppt.

9. The method of claim 1 or 7 wherein the metal ion is selected from the group consisting of Fe(III), Mn(IV), Cr(IV), and mixtures thereof.
20

10. The method of claim 1 or 7 wherein the organic electron acceptor is selected from the group consisting of fumarate, trimethylamine-N-oxide, dimethyl sulfoxide, pyruvate, glycine, and mixtures thereof.
25

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

a) providing an enriched microbial population obtained by the method of claim 1 or 3;

30 b) introducing the enriched microbial population of (a) into an oil reservoir;

c) introducing a nutrient solution comprising at least one carbon source and at least one electron acceptor into said oil reservoir; and

d) recovering oil from the oil reservoir;
wherein growth of the enriched microbial population enhances oil recovery.

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*C12N 1/20(2006.01)i, C12P 7/64(2006.01)i, C12R 1/01(2006.01)n*

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 1/20; E21B 43/22; E21B 43/16; C09K 8/60; C09K 8/52

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

Korean utility models and applications for utility models

Japanese utility models and applications for utility models

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

eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: Shewanella, isolation, microbial population, oil recovery

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2009-0260803 A1 (KEELER, SHARON JO et al.) 22 October 2009	1, 11
A	See abstract; claims 2 and 7; paragraphs [0051] and [0070]; table 2.	2-10
A	US 2011-0030956 A1 (CHOBAN, ERIC R. et al.) 10 February 2011	1-11
	See abstract; claims 22 and 28.	
A	US 2009-0263887 A1 (KEELER, SHARON JO et al.) 22 October 2009	1-11
	See abstract; claims 7-9.	
A	US 2010-0044031 A1 (FALLON, ROBERT D. et al.) 25 February 2010	1-11
	See abstract; claims 1 and 10-11.	
A	CUNNINGHAM, A. B. et al., 'Microbially enhanced geologic containment of sequestered supercritical CO ₂ ', Energy Procedia, February 2009, Vol. 1, Issue. 1, pp. 3245-3252.	1-11
	See abstract; p. 3247, paragraph 3.	



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 April 2013 (11.04.2013)

Date of mailing of the international search report

12 April 2013 (12.04.2013)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan
City, 302-701, Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

HEO, Joo Hyung

Telephone No. 82-42-481-8150



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2012/069364

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2009-0260803 A1	22.10.2009	CA 2717208 A1 EP 2271740 A2 MX 2010011236 A US 7776795 B2 WO 2009-129426 A2 WO 2009-129426 A3	22.10.2009 12.01.2011 01.11.2010 17.08.2010 22.10.2009 03.12.2009
US 2011-0030956 A1	10.02.2011	CA 2758325 A1 EP 2432847 A1 WO 2010-135651 A1	25.11.2010 28.03.2012 25.11.2010
US 2009-0263887 A1	22.10.2009	CA 2717852 A1 EP 2282852 A1 MX 2010011237 A US 8357526 B2 WO 2009-129427 A1	22.10.2009 16.02.2011 01.11.2010 22.01.2013 22.10.2009
US 2010-0044031 A1	25.02.2010	US 7740063 B2	22.06.2010

**ENRIQUECIMIENTO DE FLUIDOS DE YACIMIENTOS DE PETRÓLEO CON
SHEWANELLA**

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente descripción se relaciona con el campo de microbiología ambiental. Más específicamente, en la presente descripción se presentan métodos para enriquecer poblaciones microbianas que son autóctonas en fluidos de yacimientos de petróleo a fin de obtener poblaciones enriquecidas con
10 *Shewanella* y cepas aisladas de *Shewanella* útiles para mejorar la recuperación de petróleo de un yacimiento de petróleo.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

 Durante la recuperación de petróleo de yacimientos
15 petrolíferos, típicamente, solo se recupera una porción menor del petróleo original en los estratos que contienen petróleo por métodos de recuperación primaria, los cuales usan solamente las fuerzas naturales presentes en un yacimiento de petróleo. Para mejorar la recuperación de petróleo, se ha
20 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 se desplaza hacia el yacimiento desde un pozo de inyección
25 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. Uno de los problemas que se presenta, comúnmente, con las operaciones de inundación con agua es la poca eficiencia de barrido del agua de inyección. La poca
5 eficiencia de barrido ocurre cuando el agua se canaliza, preferentemente, a través de zonas altamente permeables del yacimiento de petróleo a medida que se desplaza desde el(los) pozo(s) de inyección hacia el(los) pozo(s) de producción, sin entrar en contacto, así, con estratos que contienen petróleo y
10 que son menos permeables. Por lo tanto, el petróleo de las zonas menos permeables no se recupera.

La recuperación de petróleo de formaciones subterráneas se puede mejorar por el efecto de microorganismos que tienen características tales como favorecer la liberación de
15 petróleo por reducción de las tensiones superficiales e interfaciales y/o formar biotaponos para reducir la canalización y mejorar la eficiencia de barrido. Un método para la recuperación mejorada de petróleo por vía microbiana (MEOR) es estimular el crecimiento de microorganismos que
20 tienen estas propiedades y que son autóctonos o que se inoculan en las formaciones subterráneas de yacimientos de petróleo. Los procesos para fomentar el crecimiento de microbios autóctonos mediante la inyección de soluciones nutrientes en formaciones subterráneas se describen en la
25 patente de los Estados Unidos núm. 4.558.739 y en la patente

de los Estados Unidos núm. 5.083.611. Se aislaron microorganismos que pertenecen al género *Shewanella* a partir de muestras de yacimientos de petróleo con el uso de medios que contienen nitrato o Fe(III) como aceptor de electrones y se descubrió son útiles para procesos de MEOR, tal como se describe en las patentes de los Estados Unidos núms. 7.776.795 y 2011-0030956. Además, se aislaron microorganismos que pertenecen al género *Arcobacter* y se descubrió son útiles para procesos de MEOR, como se describe en solicitud de patente copendiente y de propiedad mancomunada de los Estados Unidos núm. 13/280972.

Persiste la necesidad de contar con métodos para obtener poblaciones específicas de microorganismos o microorganismos aislados de fluidos de yacimientos de petróleo que incluyen microorganismos pertenecientes a los géneros *Shewanella* y *Arcobacter*, debido a que estos microorganismos son eficaces en procesos de MEOR.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La invención se relaciona con métodos de enriquecimiento para microorganismos que pertenecen al género *Shewanella*, así como con métodos para aislar microorganismos que pertenecen al género *Shewanella* por crecimiento en medios que contienen tipos especificados de aceptores de electrones. Adicionalmente, pueden especificarse las concentraciones de sal.

Por consiguiente, la invención proporciona el enriquecimiento de una población microbiana; el enriquecimiento comprende:

- 5 a) proporcionar una muestra ambiental de un fluido de un yacimiento de petróleo que comprende una población microbiana autóctona; y
- 10 b) cultivar esa muestra en un medio que comprende sal, al menos una fuente de carbono y un aceptor de electrones seleccionado de aceptor de electrones orgánico y aceptor de electrones de ión metálico para obtener una población microbiana enriquecida;

en donde la proporción de células de *Shewanella* en la población microbiana enriquecida de (b) es mayor que la
15 proporción de células de *Shewanella* en la muestra ambiental de (a).

En otra modalidad, la invención proporciona un método para aislar una cepa del género *Shewanella*, el método comprende:

- 20 a) proporcionar una muestra ambiental de un fluido de un yacimiento de petróleo que comprende una población microbiana autóctona;
- b) cultivar esa muestra en un medio que comprende sal, al menos una fuente de carbono y un aceptor de electrones seleccionado de aceptor de electrones orgánico y aceptor de electrones
25 de electrones orgánico y aceptor de electrones

de ión metálico para obtener una población microbiana enriquecida;

- 5 c) cultivar la población microbiana enriquecida de (b) en un medio que tiene una concentración de sal que está entre aproximadamente 10 ppt y 40 ppt para obtener colonias aisladas; y
- d) realizar el cribado de las colonias aisladas de (c) por análisis de secuencias de ADNr contra secuencias de ADNr microbiano conocidas;

10 en donde se identifica al menos una cepa de *Shewanella*.

En aún otra modalidad, la invención proporciona un método para mejorar la recuperación de petróleo de un yacimiento de petróleo; el método comprende:

- 15 a) proporcionar una población microbiana enriquecida obtenida por el método de conformidad con la reivindicación 1 o 3;
- b) introducir la población microbiana enriquecida de (a) en un yacimiento de petróleo;
- 20 c) introducir una solución de nutrientes que comprende al menos una fuente de carbono y al menos un aceptor de electrones en el yacimiento de petróleo; y
- d) recuperar petróleo del yacimiento de petróleo;

en donde el cultivo de la población microbiana enriquecida

25 mejora la recuperación de petróleo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

La invención se comprenderá mejor a partir de la siguiente descripción detallada y las descripciones de secuencias anexas, las cuales forman parte de la presente solicitud.

5 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 secuencias de aminoácidos - Reglas de las secuencias”) según la norma ST.25 (2009) de la Organización
10 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
15 nucleótidos y de aminoácidos cumplen con las reglas que se exponen en el Título 37 del C.F.R., §1.822.

Sec. con núm. de ident.:1 es la secuencia de nucleótidos del iniciador inverso de PCR 1492R.

Sec. con núm. de ident.:2 es la secuencia de
20 nucleótidos del iniciador directo de PCR 8F.

Sec. con núm. de ident.:3 es la secuencia de nucleótidos del ADNr 16S usado para identificar el grupo de homología de *Shewanella*.

Sec. con núm. de ident.:4 es la secuencia de nucleótidos del ADNr 16S usada para identificar el grupo de homología de *Arcobacter*.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los solicitantes incorporan específicamente todo el contenido de todas las referencias citadas en la presente 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 específicamente describiendo todos los intervalos formados de cualquier par de cualquier límite de intervalo superior o valor preferido y cualquier límite de intervalo inferior o valor preferido, sin considerar si los intervalos se describen separadamente. En los casos en que 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 éste 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 obtener, a partir de fluidos de yacimientos de petróleo, consorcios microbianos que tienen una proporción incrementada de microorganismos pertenecientes a la especie *Shewanella* con

respecto a la proporción de *Shewanella* en los fluidos originales. Adicionalmente, se describen métodos para aislar cepas de *Shewanella*. Los consorcios obtenidos o cepas aisladas pueden usarse para aumentar la recuperación de petróleo.

5 Las siguientes definiciones se suministran para las abreviaturas y términos especiales que se usan en esta solicitud:

Como se usa en la presente descripción, los términos “comprende”, “que comprende”, “incluye”, “que incluye”, “tiene”,
10 “que tiene”, “contiene” o “que contiene”, o cualquier otra variante de éstos, pretenden abarcar una inclusión no excluyente. Por ejemplo, una composición, una mezcla, un proceso, método, artículo o aparato que comprende una lista de elementos no se limita necesariamente solo a esos elementos,
15 sino que puede incluir otros que no estén expresamente listados o sean inherentes a tal composición, mezcla, proceso, método, artículo o aparato. Además, a menos que se especifique expresamente en contrario, la disyunción se relaciona con un “o” incluyente y no con un “o” excluyente. Por ejemplo, una
20 condición A o B se satisface mediante cualquiera de los siguientes criterios: A es verdadero (o actual) y B es falso (o no actual), A es falso (o no actual) y B es verdadero (o actual), y tanto A como B son verdaderos (o actuales).

Además, los artículos indefinidos “un(a)” y “unos(as)” que preceden a un elemento o componente de la invención están previstos para ser no restrictivos con respecto a la cantidad de instancias (es decir, ocurrencias) del elemento o componente. Por consiguiente, “un(a)” o “unos(as)” deben interpretarse para incluir uno o por lo menos uno, y la forma singular de la palabra del elemento o componente también incluye el plural, a menos que el número obviamente implique que es singular.

El término “invención” o “presente invención”, tal como se usa en la presente descripción, es un término no limitante y no está previsto para referirse a cualquier modalidad individual de la invención particular, sino que abarca todas las modalidades posibles según se describe en la descripción y en las reivindicaciones.

Como se usa en la presente descripción, el término “aproximadamente”, que modifica la cantidad de un ingrediente o reactivo empleados en la invención, se refiere a la variación que puede producirse en la cantidad numérica, por ejemplo, a través de procedimientos de manejo de líquidos y de mediciones típicos usados para preparar concentrados o soluciones de uso en el mundo real; a través de errores inadvertidos en estos procedimientos; a través de diferencias en la fabricación, procedencia o pureza de los ingredientes

empleados para preparar las composiciones o llevar a cabo los métodos; y similares. Además, el término “aproximadamente” abarca cantidades que difieren debido a condiciones de equilibrio diferentes para una composición que resulta de una
5 mezcla inicial específica. Estén o no modificadas por el término “aproximadamente”, las reivindicaciones incluyen equivalentes para las cantidades. En una modalidad, el término “aproximadamente” significa una cantidad dentro del 10 % del valor numérico reportado, preferentemente, dentro
10 del 5 % del valor numérico reportado.

“Petróleo” o “aceite” es un líquido inflamable de origen natural que se encuentra en formaciones rocosas y arenosas de la Tierra, el cual consiste en una mezcla compleja de hidrocarburos e hidrocarburos aromáticos policíclicos de
15 varios pesos moleculares, más otros compuestos orgánicos.

Los términos “yacimiento de petróleo/petrolífero” y “estrato que contiene petróleo” pueden usarse intercambiabilmente en la presente descripción, y se refieren a una formación subterránea o del lecho marino a
20 partir de la cual puede recuperarse el petróleo. La formación es, generalmente, un cuerpo de rocas, arena consolidada y suelo con la porosidad y permeabilidad suficientes para almacenar y transmitir petróleo.

El término “orificio de pozo” se refiere a un canal que va desde la superficie hasta un estrato que contiene petróleo con tamaño suficiente para permitir el bombeo de fluidos bien sea desde la superficie hasta el estrato que
5 contiene petróleo (pozo de inyección) o desde el estrato que contiene petróleo hasta la superficie (pozo de producción).

La expresión “Recuperación mejorada de petróleo por vía microbiana” (MEOR) es una tecnología con base biológica que consiste en modificar la función o estructura microbiana, o
10 ambas, de ambientes microbianos o microbios, o ambos, existentes en yacimientos de petróleo. El objetivo final de MEOR es mejorar la recuperación del petróleo atrapado en medios porosos. MEOR es una tecnología de extracción de petróleo terciaria que permite la recuperación parcial de
15 petróleo residual, lo cual aumenta, en efecto, la vida de los yacimientos de petróleo.

El término “corrección ambiental” se refiere al proceso usado para eliminar contaminantes de hidrocarburos del ambiente alterado por contaminantes.

20 El término “biorrecuperación” se refiere al uso de microorganismos para remediar o eliminar contaminantes de un ambiente alterado por contaminantes.

El término “donante de electrones” se refiere a un compuesto molecular que da o dona uno o más electrones durante la respiración celular.

El término “aceptor de electrones” se refiere a un
5 compuesto molecular 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
10 electrones se oxida. Algunos ejemplos de aceptores de electrones incluyen oxígeno, nitrato, fumarato, hierro (III), manganeso (IV), sulfato y dióxido de carbono. Azúcares, ácidos orgánicos de bajo peso molecular, carbohidratos, ácidos grasos, hidrógeno y petróleo crudo o
15 sus componentes, tales como hidrocarburos de petróleo o hidrocarburos aromáticos policíclicos, son ejemplos de compuestos que pueden actuar como donantes de electrones. Los términos “desnitrificante” y “desnitrificación” significan reducir el nitrato o nitrito para ser usado en la
20 generación de energía respiratoria.

“Adherido a” se refiere al recubrimiento o la adsorción de un líquido en una superficie sólida de al menos 10 % de área cubierta.

El término “humedecimiento” se refiere a la capacidad de un líquido para mantener contacto con una superficie sólida, que resulta de las interacciones intermoleculares cuando los dos se unen. El grado de humedecimiento (expresado como
5 “humectabilidad”) se determina mediante un equilibrio de fuerzas entre las fuerzas adhesivas y cohesivas.

“Agente humectante” se refiere a una sustancia química, tal como un surfactante, que aumenta la humectabilidad del agua de una superficie sólida o porosa mediante el cambio de
10 una superficie hidrófoba a otra más hidrófila. Los agentes humectantes ayudan a esparcir la fase de humedecimiento (por ejemplo, agua) sobre la superficie, lo que hace que la superficie se humedezca más con agua.

“Interfase”, como se usa en la presente descripción, se
15 refiere a la superficie de contacto entre una capa de agua y una capa de petróleo, una capa de agua y una capa de superficie sólida, y una capa de petróleo y una capa de superficie sólida.

“Recubierto de hidrocarburos”, como se usa en la presente descripción, se refiere a un recubrimiento de un hidrocarburo
20 en una superficie sólida de al menos 10 % del área cubierta.

El término “componentes de una formación subterránea” se refiere a roca, suelo, salmuera, arena, arcilla o mezclas de estos, de formaciones subterráneas o del lecho marino, que han entrado en contacto con uno o más hidrocarburos. Estos

componentes pueden ser parte de un pozo o yacimiento de petróleo. Al menos una porción de los componentes incluyen algunas superficies recubiertas con hidrocarburos, que incluyen partículas con superficies recubiertas.

5 “Humectabilidad” se refiere a la preferencia de un sólido para entrar en contacto con un líquido, conocido como fase de humedecimiento, más que con otro. Las superficies sólidas pueden estar humedecidas con agua, humedecidas con petróleo o humedecidas en forma intermedia. La
10 “humectabilidad de agua” corresponde a la adhesión del agua a la superficie de un sólido. En condiciones de humedecimiento con agua, una película delgada de agua recubre la superficie sólida, condición que resulta deseable para lograr que el petróleo se transporte eficazmente.

15 El término “fuerzas adhesivas” se refiere a las fuerzas entre un líquido y un sólido que hacen que una gota de líquido se extienda por la superficie.

 El término “fuerzas cohesivas” se refiere a las fuerzas dentro del líquido que hacen que la gota forme una bola y
20 evite el contacto con la superficie.

 El término “inundación con agua” se refiere a la inyección de agua a través de orificios en el pozo hacia el interior del yacimiento de petróleo. La inundación con agua (recuperación de petróleo secundaria) se lleva a cabo para

hacer salir el petróleo de un yacimiento de petróleo cuando el petróleo ya no fluye por sí solo del yacimiento.

El término “eficacia de barrido” se refiere a la fracción de un estrato que contiene petróleo por el que ha pasado fluido o agua, para mover el petróleo a los pozos de producción durante la inundación con agua. Un problema que puede surgir con los procesos de inundación con agua es la eficiencia relativamente pobre del barrido del agua, es decir, el agua se puede canalizar a través de ciertas porciones de un yacimiento a medida que se desplaza desde el(los) pozo(s) de inyección hacia el(los) pozo(s) de producción, por lo tanto, pasa por alto otras porciones del yacimiento. La eficiencia pobre del barrido puede deberse, por ejemplo, a diferencias en la movilidad del agua en comparación con la movilidad del petróleo, así como a las variaciones de permeabilidad dentro del reservorio que promueven el flujo a través de ciertas porciones del reservorio y no a través de otras.

El término “agua de inyección” se refiere al fluido inyectado en los reservorios de petróleo para la recuperación secundaria de petróleo. El agua de inyección se puede suministrar desde cualquier fuente apropiada y puede incluir, por ejemplo, agua de mar, salmuera, agua de producción, agua recuperada de un acuífero subterráneo, incluso de los acuíferos en contacto con el petróleo, o agua

superficial de un arroyo, río, laguna o lago. Como se conoce en la técnica, es posible que sea necesario retirar del agua materia particulada, incluido polvo, pedazos de roca o arena y productos de la corrosión, tales como herrumbre, antes de
5 la inyección en uno o más orificios del pozo. Los métodos para retirar dicha materia particulada incluyen filtración, sedimentación y centrifugación.

El término “agua de producción” significa agua recuperada de fluidos de producción extraídos de un
10 yacimiento de petróleo. Los fluidos de producción contienen tanto agua natural asociada con el yacimiento y/o agua usada en la recuperación de petróleo secundaria, y petróleo crudo producido en el yacimiento petrolífero.

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

El término “biopelícula obturadora” significa una biopelícula que es capaz 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 relacionado con la biopelícula.

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

5 El término “biotaponamiento” se refiere a hacer menos permeable el material permeable debido a la actividad biológica, particularmente, mediante un microorganismo.

El término “microorganismos autóctonos” se refiere a microorganismos que son naturales en los fluidos del yacimiento de petróleo y matrices subterráneas.

10 El término “microorganismos inoculados” se refiere a los microorganismos que se introducen en los fluidos del yacimiento de petróleo y matrices subterráneas al inyectar microbios a través de un orificio en el pozo hacia la subestructura del yacimiento de petróleo.

“Especie *Shewanella*” o “*Shewanella spp*” se refiere a microorganismos filogenéticamente clasificados por tipificación del ADNr para el género *Shewanella*. Los miembros de *Shewanella* son proteobacterias gamma reductoras de metales gramnegativas que son capaces de reducir una amplia variedad de aceptores de electrones terminales. Estos microorganismos obtienen energía para apoyar el crecimiento anaerobio al acoplar la oxidación de H_2 o materia orgánica a la transformación de reacción-oxidación

de una variedad de metales multivalentes, lo que conduce a la precipitación, transformación o disolución de minerales.

El término “sal” incluye cualquier compuesto iónico que pueda crear iones en agua e incluye, pero no se limita a,
5 KCl, SrCl, NaBr, NaCl, CaCl₂ y MgCl₂.

Obtención de poblaciones enriquecidas con *Shewanella* en
fluidos de yacimientos de petróleo

En la presente descripción se describen métodos para aumentar la proporción de microorganismos pertenecientes al
10 género *Shewanella* entre las poblaciones totales de microorganismos autóctonos de fluidos de yacimientos de petróleo. Se desean las cepas de *Shewanella* por sus propiedades que son útiles para aumentar la recuperación de petróleo, como se describe a continuación. Los fluidos de
15 yacimientos de petróleo (es decir, una “muestra ambiental”) pueden ser aguas de producción o aguas de inyección y contienen mezclas heterogéneas de microorganismos. Los géneros a los que pertenecen estos microorganismos pueden identificarse por análisis de secuencias de ADN ribosómico
20 16S, y puede determinarse la proporción de microorganismos de cada género en la población de una muestra de fluidos de yacimientos de petróleo, como se describe en los ejemplos de la presente descripción.

Las muestras de fluidos de yacimientos de petróleo que proporcionan las muestras ambientales evaluadas en la presente descripción fueron de yacimientos del campo Senlac, situado en la provincia de Saskatchewan, Canadá, y del campo Wainwright, en la provincia de Alberta, Canadá. El agua de estos yacimientos tiene salinidad alta: en el intervalo de 30 a 38 ppt y en el intervalo de 60 a 68 ppt, respectivamente. El análisis de la presente descripción, en los Ejemplos 1 y 2, de los microorganismos autóctonos en estas muestras de fluidos de yacimientos de petróleo no detectó ningún microorganismo perteneciente al género *Shewanella*. Se desarrollaron métodos que incluyeron el crecimiento de poblaciones autóctonas de las muestras de fluidos de yacimientos de petróleo en medios que contienen receptores de electrones especificados, en virtud de lo cual los microorganismos pertenecientes al género *Shewanella* se volvieron detectables como una proporción de la población. Por lo tanto, estos métodos enriquecen con microorganismos *Shewanella* una población microbiana.

En los presentes métodos, los microorganismos en una muestra del yacimiento de petróleo se cultivan en un medio que contiene sal, al menos una fuente de carbono, y un aceptor de electrones seleccionado de aceptor de electrones orgánicos y aceptor de electrones de iones metálicos. Adicionalmente, el medio contiene otros componentes para apoyar el crecimiento de microorganismos y que pueden incluir componentes tales como

vitaminas, metales traza, nitrógeno, fósforo, magnesio, calcio y/o sustancias químicas para soluciones reguladoras. La fuente de carbono puede ser materia orgánica compleja, tal como peptona, licor de maíz macerado o extracto de levadura. En
5 otra modalidad, la fuente de carbono es un compuesto simple, tal como citrato, fumarato, maleato, butirato, piruvato, succinato, acetato, formato o lactato.

Los aceptores de electrones orgánicos que pueden usarse incluyen compuestos tales como fumarato, N-óxido de
10 trimetilamina, sulfóxido de dimetilo, piruvato, glicina, y mezclas de estos compuestos. El fumarato puede estar en la forma de cualquier sal de ácido fumárico, o el ácido fumárico propiamente dicho puede incluirse, en este contexto, en el término fumarato. Las sales de fumarato pueden incluir una sal
15 monosódica o disódica, sal de calcio, sal de magnesio, sal de amonio o diamonio, sal de potasio o dipotasio, sal clorhidrato, o formas hidratadas de cualquier sal ácida de fumarato. En una modalidad, la composición contiene fumarato disódico (DSF).

Los aceptores de electrones de iones metálicos que
20 pueden usarse incluyen compuestos tales como Fe(III), Mn(IV), Cr(IV) y mezclas de estos compuestos.

Cuando el crecimiento de poblaciones de microorganismos autóctonos en fluidos de yacimientos de petróleo se realiza con el uso de medios que contienen estos aceptores de
25 electrones, la proporción de la población que pertenece al

género *Shewanella* (que son células de *Shewanella*) aumenta en contraposición al crecimiento en medios que contienen nitrato como aceptor de electrones. La proporción de la población que pertenece al género *Shewanella* aumenta a por lo menos aproximadamente 1 %. El aumento en la proporción de células de *Shewanella* depende de factores tales como la distribución de microorganismos en la población autóctona en la muestra de fluidos, el aceptor de electrones específico usado y la concentración de sal del medio. La proporción de la población que pertenece al género *Shewanella* puede incrementarse a por lo menos aproximadamente 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, o más, que incluye a por lo menos aproximadamente 90 %.

La concentración de sales del medio se puede ajustar para favorecer el crecimiento de microorganismos pertenecientes al género *Shewanella*. Como puede verse en el Ejemplo 3 de la presente descripción, los microorganismos *Shewanella* crecen en medios que tienen un intervalo amplio de concentraciones de sal que incluye una concentración de sal baja (11 ppt) o concentración de sal alta (60 ppt), pero se desarrollan mejor en concentraciones de sal de aproximadamente 15 - 20 ppt. En una modalidad del presente método, la concentración de sal está entre aproximadamente 10 y 55 ppt. En otras modalidades, la concentración de sal está entre aproximadamente 10 y 40 ppt, o aproximadamente 15 y 35 ppt.

Cuando se usa el presente método, la población de microorganismos enriquecida puede contener microorganismos pertenecientes al género *Arcobacter*. La proporción de la población que pertenece al género *Arcobacter* depende de factores tales como la distribución de microorganismos en la población autóctona de la muestra de fluidos, el aceptor de electrones específico usado y la concentración de sales del medio. Particularmente, con el uso de un aceptor de electrones orgánico, una gran proporción de la población pertenece al género *Arcobacter*, tal como mayor que 20 %. La concentración de sales del medio se puede ajustar para favorecer el crecimiento de microorganismos pertenecientes a los géneros *Arcobacter* y *Shewanella*. Por ejemplo, la especie *Arcobacter* disminuirá y es posible que no se detecte al usar concentraciones de sal más bajas, tal como de aproximadamente 34 ppt. Pueden usarse concentraciones de sal que son de al menos aproximadamente 40 ppt para obtener poblaciones que contienen niveles detectables de células de *Arcobacter*. En una modalidad, la concentración de sal está entre aproximadamente 40 y 55 ppt, y las células de *Shewanella* y *Arcobacter* están presentes en la población obtenida. En otra modalidad, la concentración de sal es de al menos aproximadamente 50 ppt, y la proporción de células de *Arcobacter* es al menos aproximadamente 20 %.

Aislamiento de cepas de *Shewanella*

Pueden aislarse cepas de microorganismos pertenecientes al género *Shewanella* a partir de poblaciones enriquecidas con células de *Shewanella* que se obtienen al seguir los presentes
5 métodos, tal como se describió anteriormente. Después del enriquecimiento, las muestras se cultivan en un medio que tiene una concentración de sal de entre aproximadamente 10 ppt y 40 ppt para aislar colonias individuales a partir de las cuales se cultivan cepas. Se obtiene la secuencia de ADN ribosómico
10 (ADNr) 16S para una cepa aislada y se compara con secuencias en la base de datos de ADNr del NCBI (~260.000 secuencias de ADNr) con el algoritmo de BLAST (Altschul et al., Journal of Molecular Biology, 1990). Una cepa se identifica como una cepa de *Shewanella* cuando el acierto para identidad de secuencias
15 con puntaje más alto es de una especie conocida de *Shewanella*.

El presente método de enriquecimiento que usa un aceptor de electrones orgánico o de iones metálicos y cultivo en medio que tiene una concentración de sal que favorece el crecimiento de células de *Shewanella* permite aislar cepas de *Shewanella* con
20 alta frecuencia. De las cepas analizadas, al menos una de diez, o nueve, u ocho, o siete, o seis, o cinco, o cuatro, o tres, o dos, o una de las cepas analizadas es una cepa de *Shewanella*.

Uso de células de *Shewanella* y *Arcobacter* para MEOR

Las presentes poblaciones microbianas enriquecidas con
25 *Shewanella* son útiles para mejorar la recuperación de

petróleo. Se ha demostrado que las células de *Shewanella* tienen propiedades que son benéficas para mejorar la recuperación de petróleo de yacimientos de petróleo. Por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos núm. 7.776.795, que se incorpora en la presente descripción como referencia, se describe el aislamiento de la cepa de *Shewanella putrefaciens*, LH4:18 (núm. ATCC. PTA-8822) a partir de muestras de agua de pozos de producción y de inyección de campos petrolíferos de North Slope en Alaska mediante el cultivo de petróleo crudo destilado en medio que contiene nitrato y sales en un reactor de columna. Se demostró que esta cepa aumenta la liberación de petróleo de la arena. Adicionalmente, en la patente de los Estados Unidos núm. 2011-0030956, que se incorpora en la presente descripción como referencia, se describe la capacidad de las células de *Shewanella* o materiales o biomoléculas producidos por *Shewanella* para alterar la humectabilidad de una superficie recubierta de hidrocarburos y liberar, de este modo, petróleo de la superficie. El petróleo liberado de esta manera de superficies en un yacimiento de petróleo se puede recuperar por métodos de recuperación secundaria de petróleo, tales como la inundación con agua.

En algunas modalidades, adicionalmente a las células de *Shewanella*, las presentes poblaciones microbianas enriquecidas contienen células de *Arcobacter*. Se ha demostrado que las

células de *Arcobacter* tienen propiedades que son benéficas para mejorar la recuperación de petróleo de yacimientos de petróleo. Como se describe en la solicitud de patente copendiente y de propiedad mancomunada de los Estados Unidos núm. 13/280972, la cual se incorpora en la presente descripción como referencia, las cepas aisladas de *Arcobacter* que incluyen 97AE3-3 (Núm. ATCC. PTA-11410) y 97AE3-12 (Núm. ATCC. PTA- 11409) son capaces de formar biopelículas obturadoras. La cepa 97AE3-12 creció en presencia de aceite de petróleo, en condiciones desnitrificantes tanto de baja (15 ppt) como de alta (64 ppt) salinidad. Las biopelículas obturadoras se produjeron en medios de baja (15 ppt) y alta (35 ppt y 68 ppt) salinidad. Las biopelículas obturadoras se formaron con alimentación de nutrientes continua o por lotes. Adicionalmente, la conglomeración de partículas de sílice se demostró en medios de alta (64 ppt) salinidad. Estas propiedades demuestran el uso de las cepas de *Arcobacter* para formar biopelículas para obturar zonas hiperpermeables en arena o roca permeable de yacimientos de petróleo. La obturación de zonas hiperpermeables puede redirigir el agua hacia áreas menos permeables y más ricas en petróleo, para mejorar, así, la eficiencia de barrido, lo que conlleva un aumento en la recuperación de petróleo.

Métodos para mejorar la recuperación de petróleo

Las presentes poblaciones microbianas enriquecidas con *Shewanella*, en algunas modalidades, que contienen,

adicionalmente, células de *Arcobacter* se pueden introducir en un yacimiento de petróleo para producir una mejora en la recuperación de petróleo. La población inyectada está, típicamente, en un fluido, tal como el medio usado para
5 cultivar los microorganismos. Además, el yacimiento de petróleo se inyecta, simultáneamente con o después de la inyección de la población microbiana, con una solución de nutrientes. La solución de nutrientes es una solución que favorece el crecimiento de células de *Shewanella* en la
10 población, y de las células de *Arcobacter*, cuando están presentes. La solución de nutrientes contiene al menos una fuente de carbono y un aceptor de electrones. En algunas modalidades, el aceptor de electrones es un aceptor de electrones orgánico o un aceptor de electrones de iones
15 metálicos, como se describió anteriormente. En algunas modalidades, la fuente de carbono es acetato, lactato, succinato, butirato o formato. Adicionalmente, la solución de nutrientes puede contener componentes de los medios, tal como se describió anteriormente.

20 La población microbiana se puede introducir en un yacimiento de petróleo con cualquier método conocido para un experimentado en la técnica. Típicamente, se introduce en un yacimiento de petróleo por inyección en un pozo de inyección, pero la inyección puede hacerse, además, en un pozo de
25 producción. Los fluidos inyectados fluyen a través del pozo y

hacia los sitios subterráneos adyacentes al pozo. Después de la introducción, se deja transcurrir un período de tiempo para el crecimiento de los microorganismos introducidos. Este período de tiempo para el crecimiento microbiano puede ser una semana o
5 más. En una modalidad, este período es aproximadamente de dos a tres semanas. Después de este período, se introduce agua de inyección en el orificio del pozo, y esta fluye a través del pozo y hacia los sitios subterráneos adyacentes al pozo. Sin embargo, en este punto, la roca permeable se encuentra poblada
10 de microorganismos para que el agua desplace el petróleo en el yacimiento de petróleo. El agua que contiene petróleo se recupera de por lo menos un pozo de producción.

Métodos generales

El significado de las abreviaturas se usa en esta
15 solicitud de la siguiente forma: “h” significa hora(s), “min” significa minuto(s), “día” significa día(s), “ml” significa mililitros, “mg/ml” significa miligramo por mililitro, “l” significa litros, “ μ l” significa microlitros, “mM” significa milimolar, “ μ M” significa micromolar, “nM” significa nanomolar,
20 “ μ g/l” significa microgramo por litro, “pmol” significa picomol(es), “°C” significa grados centígrados, “°F” significa grados Fahrenheit, “bp” significa par de bases, “bps” significa pares de bases, “mm” significa milímetro, “ppm” significa partes por millón, “ppt” significa partes por mil, “g/l”

significa gramo por litro, “ml/min” significa mililitro por minuto, “ml/h” significa mililitro por hora, “cfu/ml” significa unidades formadoras de colonias por mililitro, “g” significa gramo, “mg/l” significa miligramo por litro, “Kev” significa 5 kilo o miles de voltios de electrón, “psig” significa por pulgada cuadrada por gramo, “LB” significa caldo de cultivo Luria, “rpm” significa revoluciones por minuto, “NIC” significa control no inoculado.

Crecimiento de microorganismos

10 Las técnicas para cultivo 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 fumarato se usa como aceptor de electrones primario en las condiciones de crecimiento usadas 15 en la presente descripción. El nitrato se usó en algunos enriquecimientos como control de aceptor de electrones alternativo. Con desnitrificación, el cultivo anaerobio se mide por reducción de nitrato del medio de cultivo en el tiempo. La reducción de nitrato a nitrógeno se ha descrito 20 previamente (Moreno-Vivian, C., et al., J. Bacteriol., 181, 6573 - 6584, 1999). En algunos casos, los procesos de reducción de nitrato conllevan una acumulación de nitrito que, posteriormente, se reduce aún más a nitrógeno. Consecuentemente, la acumulación y, algunas veces, la

disipación de nitrito también se consideran, por lo tanto, una prueba del metabolismo y crecimiento activo de microorganismos. El incremento de turbidez debido al aumento en la concentración de células bacterianas y/o la formación de biopelícula en el fondo de los viales con suero para anaerobios o en la interfase de agua y gas se consideraron, además, indicadores de crecimiento microbiano.

Cromatografía de iones

Para cuantificar los iones de nitrato y nitrito en medios acuosos, los solicitantes usaron una unidad de cromatografía ICS2000 (Dionex, Banockburn, IL). El intercambio de iones se realizó en una columna de intercambio de aniones AS15 mediante el uso de un gradiente de 2 a 50 mM de hidróxido potásico. Se generaron curvas estándar mediante el uso de cantidades conocidas de soluciones de nitrito sódico o nitrato sódico, y estas se usaron para calibrar las concentraciones de nitrato y nitrito.

Medición del total de sales disueltas por refractómetro

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

Muestras de agua de inyección y de agua de producción del yacimiento de petróleo

En este estudio, se tomaron muestras de dos sistemas de pozos de petróleo. Uno se denomina Sistema de pozos núm. 1, que está en el campo Senlac, situado en la provincia de

Saskatchewan, Canadá, y el otro se denomina Sistema de pozos
núm. 2, situado en el campo Wainwright, en la provincia de
Alberta, Canadá. El agua del yacimiento tomada del Sistema de
pozos núm. 1 tiene una salinidad cercana al agua de mar, en
5 el intervalo de 30 a 38 ppt, y el Sistema de pozos núm. 2
tiene una salinidad de aproximadamente el doble del agua de
mar, en el intervalo de 60 a 68 ppt. Se obtuvieron muestras
de agua de cabezales de pozos de inyección y de producción
como líquidos mezclados de petróleo/agua en botellas de
10 vidrio marrón de 1,0 l, llenadas hasta el tope, tapadas y
selladas con cinta para impedir la fuga de gas. El gas de los
procesos anaeróbicos inherentes fue suficiente para mantener
las condiciones anaerobias durante el transporte. Las
botellas se transportaron en enfriadores plásticos grandes
15 llenos con bloques de hielo hacia las instalaciones de las
pruebas y llegaron dentro de las 48 h de la toma de muestras.

Extracciones de ADN genómico de cultivos bacterianos

Para extraer ADN genómico de las aguas de inyección y de
producción de yacimientos y cultivos de enriquecimiento
20 bacteriano líquidos, se recolectaron células y se
concentraron por filtración sobre un filtro Supor® de
0,2 micras (Pall Corp, Ann Arbor, MI). Una alícuota (2-5 ml)
de un cultivo bacteriano se hizo pasar a través de un disco
de filtro de 25 mm, 0,2 micras, en un soporte de cartucho
25 removible mediante el uso de presión de vacío o jeringa. Se

retiraron los filtros y se colocaron en una solución reguladora de lisis (Tris-HCL 100 mM, NaCl 50 mM, EDTA 50 mM, pH de 8,0) seguido de agitación con un mezclador Vortex.

Después, se agregaron reactivos a una concentración final
5 de 2,0 mg/ml de lisozima, 10 mg/ml de SDS, y 10 mg/ml de Sarkosyl para lisar las células. Después de mezclar adicionalmente con un mezclador Vortex, se agregó 0,1 mg/ml de ARNasa y 0,1 mg/ml de proteinasa K para eliminar el ARN y contaminantes de proteínas, y la mezcla se incubó a 37 °C por
10 1,0- 2,0 h. Después de la incubación, se retiraron los filtros y se extrajeron las muestras dos veces con un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v) y una vez con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1, v/v). Una décima parte del volumen de NaCl 5,0 M y dos volúmenes de etanol al
15 100 % se agregaron a la capa acuosa y se mezclaron. Los tubos se congelaron a -20 °C durante toda la noche y, después, se centrifugaron a 15.000 x g por 30 min a temperatura ambiente para producir gránulos de ADN cromosómico. Los gránulos se lavaron una vez con etanol al 70 %, se centrifugaron a 15.000
20 x g por 10 min, se secaron, resuspendieron en 100 µl de agua desionizada y se almacenaron a -20 °C. Se analizó una alícuota del ADN extraído sobre un gel de agarosa para determinar la calidad y la cantidad del ADN extraído.

Análisis poblacional de las poblaciones de microorganismos
mediante el uso de genotecas genómicas microbianas de ADNr
16S de clones con identificación de ADNr

Se generaron genotecas genómicas de ADNr 16S a partir de
5 muestras de aguas de inyección y de producción de yacimientos
petrolíferos de ambos sistemas de pozos y de muestras de
cultivos de enriquecimiento. Se seleccionaron conjuntos de
iniciadores de Lane, ((1991) 16S/23S rRNA sequencing, págs.
115-175. In Stackebrandt, E. y M. Goodfellow (ed.), Nucleic
10 Acid Techniques in Bacterial Systematics. John Wiley y Sons,
New York, NY) para generar fragmentos de ADNr 16S amplificados
por PCR de especies microbianas presentes en las muestras de
ADN preparadas a partir de las muestras de pozos o los
cultivos de enriquecimiento. Se seleccionó la combinación de
15 iniciador directo (sec. con núm. de ident.:1) e iniciador
inverso (sec. con núm. de ident.:2) para amplificar
específicamente las secuencias de ADNr 16S bacteriano.

La mezcla de amplificación de PCR incluyó: solución
reguladora para PCR 1,0X Go Taq® (Promega), 0,25 mM de los
20 dNTP, 25 pmoles de cada iniciador, en un volumen de reacción
de 50 µl. Se agregó 0,5 µl de ADN polimerasa Go Taq®
(Promega) y 1,0 µl (20 ng) del ADN de la muestra. El
protocolo de ciclación térmica de la reacción de PCR usado
fue 5,0 min a 95 °C seguido de 30 ciclos de: 1,5 min a 95 °C,
25 1,5 min a 53 °C, 2,5 min a 72 °C y una extensión final de 8

min a 72 °C en un termociclador GeneAmp® 9700 de Applied Biosystems® (LifeTenchologies, Corp, Grand Island, NY). Este protocolo se usó, además, con células de colonias purificadas o combinación de especies de cultivos de enriquecimiento.

5 Los productos de amplificación de 1400 pares de bases para un conjunto de ADN dado se visualizaron en geles de agarosa al 0,8 %. La mezcla de reacción de PCR se usó directamente para clonación en el vector pCR® -TOP04® al usar el sistema de clonación TOPO® TA, (Invitrogen™,
10 LifeTenchologies, Corp, Carlsbad, CA) 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
15 microtitulación para análisis de secuencias.

Preparación de la plantilla del plásmido

Los sistemas de purificación de plantillas automatizadas a gran escala usaron la inmovilización reversible de fase sólida (SPRI®, Agencourt, Beverly, MA; DeAngelis, M. M., et
20 al., Nucleic Acid Res., 23: 4742 - 4743, 1995). La tecnología de SPRI® usa partículas paramagnéticas de núcleo de hierro recubiertas con carboxilato para capturar ADN de una longitud de fragmento deseada en función de las condiciones reajustadas de la solución reguladora. Cuando se captura el
25 ADN deseado en las partículas, estas pueden concentrarse

magnéticamente y separarse para que los contaminantes se puedan eliminar por lavado.

Las plantillas del plásmido se purificaron con un protocolo optimizado SprintPrep™ SPRI (Agencourt). Este
5 procedimiento recolecta ADN plasmídico directamente de cultivos bacterianos lisados al atrapar tanto el plásmido como el ADN genómico en las partículas de perlas funcionalizadas y eluir selectivamente solo el ADN plasmídico. Brevemente, el procedimiento de purificación involucra la adición de la
10 solución reguladora de lisis alcalina (que contiene ARNasa A) al cultivo bacteriano, la adición del reactivo de precipitación a base de alcohol que incluye partículas paramagnéticas, la separación de las partículas magnéticas con placas separadoras magnéticas basadas en un anillo
15 especialmente diseñado, lavado 5x de las perlas con ETOH al 70 %, y elución del ADN plasmídico con agua.

Secuenciación de ADN_r, ensamblaje de clones y análisis filogenético de ADN

Se secuenciaron plantillas de ADN en un formato de 384
20 pocillos con reacciones de secuenciación BigDye® Version 3.1 en instrumentos ABI®3730 (Applied Biosystems®, Foster City, CA). La ciclación térmica se realizó con un termociclador de 384 pocillos. Las reacciones de secuenciación se purificaron con el estuche de eliminación de terminadores CleanSeq® Dye-Terminator
25 de Agencourt según las recomendaciones del fabricante. Las

reacciones se analizaron con un secuenciador capilar modelo ABI3730XL que usa un módulo de ejecución extendida desarrollado en Agencourt. Todos los análisis de secuencias y llamadas se procesaron con el software de llamado de bases Phred (Ewing et al., Genome Res., 8: 175 -185, 1998) y se monitorearon constantemente contra los estándares de medición de calidad.

Ensamblaje de clones de ADNr

Se generó un archivo para cada clon de ADNr. El ensamblaje de los datos de secuencias generados para los clones de ADNr se realizó con el programa de ensamblaje de secuencias PHRAP (Ewing, et al., *supra*). Se generaron archivos de calidad consenso y secuencias consenso para más de una lectura de secuencias superpuestas.

Análisis de secuencias de ADNr

Cada secuencia ensamblada se comparó con el banco del NCBI (base de datos de ADNr; ~260.000 secuencias de ADNr) con el programa del algoritmo de BLAST® (Altschul, *supra*). Los aciertos de BLAST® se usaron para agrupar las secuencias en grupos de homología, y cada uno contiene secuencias con ≥ 90 % de identidad para el mismo fragmento de ADNr del NCBI. La secuencia de nucleótidos del ADNr 16S usada para identificar el grupo de homología de *Shewanella* fue la sec. con núm. de ident.:3. La secuencia de nucleótidos del ADNr 16S usada para identificar el grupo de homología de *Arcobacter* fue la sec. con núm. de ident.:4. Los grupos de homología se usaron para

calcular proporciones de especies particulares en cualquier muestra. Debido a que los protocolos de amplificación y clonación fueron idénticos para el análisis de cada muestra, las proporciones pudieron compararse de muestra a muestra.

5 Esto permitió comparaciones de diferencias de población en muestras tomadas para selecciones de enriquecimientos diferentes o en momentos de muestreo diferentes para el mismo cultivo de enriquecimiento del consorcio.

Preparación de ADN de aislados de colonias bacterianas

10 para análisis de secuencias

Se aisló el ADN genómico de colonias bacterianas sembradas en agar marino al diluir colonias bacterianas en 50 µl de agua o solución reguladora de Tris-HCL con un pH de 7-8. Los ADN de las colonias diluidas se amplificaron con ADN polimerasa Phi 29

15 antes de la secuenciación (estuche de amplificación GenomiPHI, GE Life Sciences, New Brunswick, NJ). Se adicionó una alícuota (1,0 µl) de una colonia diluida a 9,0 µl del reactivo de lisis (del estuche de amplificación GenomiPHI®) y se calentó a 95 °C durante 3 min seguido de enfriamiento inmediato a 4 °C. Nueve

20 (9,0) µl de solución reguladora enzimática y 1,0 µl de la enzima Phi 29 se agregaron a cada muestra sometida a lisis y, después, se incubó a 30 °C durante 18 horas. La polimerasa se inactivó por calentamiento a 65 °C durante 10 minutos seguido de enfriamiento a 4 °C.

Análisis de secuencias de ADN

Las reacciones de secuenciación de ADN se establecieron de la siguiente forma: Se agregó 8,0 µl de muestra amplificada de GenomiPHI a 8,0 µl de reactivo de
5 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 reguladora de dilución 5X BigDye® (Applied Biosystems™) y 17 µl de agua, grado
10 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
15 retiraron mediante el uso de placas de limpieza de Edge Biosystems (Gaithersburg, MD). Las reacciones amplificadas se colocaron con pipeta en un pocillo de una placa de limpieza precentrifugada de 96 pocillos. La placa se centrifugó durante 5,0 min a 5.000x g en un Sorvall RT-7®
20 (Sorvall®, Thermo Scientific®, Newtown, CT) a 25 °C. Las reacciones purificadas 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 de ADN_r ensambladas se
25 comparó con la base de datos de ADN_r del NCBI (~ 260.000

secuencias de ADNr) con el algoritmo de BLAST® (Altschul et al., Journal of Molecular Biology, 1990). El acierto de identidad de secuencia con la puntuación más alta se usó como identificador de la especie conocida más estrechamente relacionada para la identificación de cepas.

Alternativamente, para generar fragmentos amplificados de ADNr a partir de cepas individuales, se seleccionaron los mismos conjuntos de iniciadores de Lane, D. J. (supra). La combinación de iniciador con sec. con núm. de ident.:1 e iniciador con sec. con núm. de ident.:2 se escogió específicamente para amplificar secuencias de ADNr bacteriano.

La mezcla de amplificación de PCR incluyó: solución reguladora para PCR 1,0X Go Taq® (Promega), 0,25 mM de los dNTP, 25 pmoles de cada iniciador, en un volumen de reacción de 50 µl. Se agregó 0,5 µl de ADN polimerasa Go Taq® (Promega) y 1,0 µl (20 ng) del ADN de la muestra. El protocolo de termociclos para la reacción de PCR fue 5,0 minutos 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 de 8 min a 72 °C en un termociclador GeneAmp® 9700 de Applied Biosystems™. Los productos de amplificación de 1400 pares de bases se visualizaron en geles de agarosa al 1,0 %. La secuenciación de los fragmentos amplificados y la identificación de cepas fue según lo descrito anteriormente.

Ejemplo 1

Enriquecimiento anaerobio para microbios autóctonos a partir de muestras de yacimientos de petróleo con salinidad alta

Se usaron tres aceptores de electrones diferentes en
5 enriquecimientos de muestras de yacimientos de petróleo. Un
(1) ml de agua de producción o de agua de inyección del
Sistema de pozos núm. 1 o núm. 2, descrito en la sección de
Métodos generales, se inoculó en 9 ml de medio mínimo de sales
(Tabla 1) en viales de suero para anaerobios de 20 ml.
10 Adicionalmente, el medio mínimo de sales se complementó con
43 ppt de cloruro de sodio para llevar la salinidad a 53 ppt.
Después, el medio de crecimiento se complementó con 2000 ppm
de lactato de sodio para servir de fuente de carbono y 3,7 g/l
de fumarato de sodio como aceptor de electrones. Los cultivos
15 separados se complementaron con 1600 ppm de nitrato de sodio o
2500 ppm de Fe(III) agregado como sal de sodio férrica del
ácido etilendiaminotetraacético (EDTA ($C_{10}H_{12}FeN_2NaO_8$; E6760-
100G, Sigma-Aldrich, St Louis Mo.) en lugar de fumarato. El
medio se desoxigenó (anaerobio) al inyectar por burbujeó en
20 los viales llenos una mezcla de nitrógeno y dióxido de carbono
(80 %/20 %) y, después, se introdujo en un autoclave. Todas
las manipulaciones de las muestras de agua de campos de
petróleo, que contenían microbios autóctonos del yacimiento,
se realizaron en una cámara anaerobia (Coy Laboratories

Products, Inc., Grass Lake, MI). Las botellas con cultivos inoculados se incubaron a temperatura ambiente.

Tabla 1. Medio mínimo de sales

5	g/l	Sustancia química
	1,0	NH ₄ Cl
	0,5	KH ₂ PO ₄
	0,4	MgCl ₂ .6H ₂ O
	0,2	CaCl ₂ .2H ₂ O
10	10	NaCl
	0,69	NaH ₂ PO ₄
	2,5	NaHCO ₃
	0,073	KSO ₄
15	1000X g/l de mezcla maestra	Elementos traza
	1,5	FeCl ₂ .4H ₂ O
	0,002	CuCl ₂ .2H ₂ O
	0,1	MnCl ₂ .4H ₂ O
	0,19	CoCl ₂ .6H ₂ O
20	0,07	ZnCl ₂
	0,006	H ₃ BO ₃
	0,036	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O
	0,024	NiCl ₂ .6H ₂ O
25	0,277	HCl

	1000X g/l de mezcla maestra	Selenio/ tungstato
	0,006	$\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
	0,008	$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
5	0,5	NaOH
	1000X g/l de mezcla maestra	Mezcla de vitaminas
	100	Vitamina B12
10	80	Ácido p- aminobenzoico
	20	D(+)-biotina
	200	Ácido nicotínico
	100	Pantotenato cálcico
15	300	Hidrocloreuro de piridoxina
	200	Tiamina-HCL.2H ₂ O
	50	Ácido alfa-lipoico

El pH del medio se ajustó a 6,8, el pH aproximado del yacimiento

20 Los cultivos de enriquecimiento que contenían nitrato se monitorearon y se tomaron muestras de ellos de forma regular para la reducción de nitrato y la acumulación de nitrito o, en algunos casos, la reducción de nitrito. Cuando el nitrato se redujo en la muestra (usualmente antes de 14

días), se agregó lactato y nitrato a las concentraciones finales originales. Al mismo tiempo, se agregó, además, lactato y fumarato en cada uno de los otros enriquecimientos a las concentraciones finales originales.

5 Todos los viales se incubaron durante otros 14 a 20 días a temperatura ambiente. Se observaron cambios visibles en los cultivos, que indicaron el crecimiento de lactato y el aceptor de electrones, en cada una de las muestras de enriquecimiento. Los cambios incluyeron turbidez visible en el medio y/o la
10 presencia de biopelículas en los viales de vidrio o en la interfase gaseosa-acuosa, así como una reducción de nitrato y nitrito en viales que contenían nitrato como aceptor de electrones. La turbidez fue similar en cada vial, lo que indica que hubo una población diversa de microorganismos tanto
15 en el agua de inyección como en el agua de producción.

Ejemplo 2

Análisis de poblaciones en cultivos de enriquecimiento anaerobios

20 Antes de comenzar los cultivos de enriquecimiento, se determinaron las distribuciones de los valores de referencia de las poblaciones de microbios autóctonos en el Sistema de pozos núm. 1 y el Sistema de pozos núm. 2 por identificación de poblaciones de ADN_r, que se realizaron al usar el agua de
25 inyección y de producción del yacimiento de ambos sistemas

con el método descrito anteriormente en la sección de Métodos generales. Después de 4 semanas de crecimiento, se prepararon perfiles de todos los cultivos de enriquecimiento al usar las distribuciones de secuencias de ADN_r, como se describe en la sección de Métodos generales, para ver las diferencias en los perfiles de las poblaciones en comparación con las poblaciones autóctonas.

Resultados del análisis de secuencias de ADN_r 16S para el Sistema de pozos núm. 1

Para el Sistema de pozos núm. 1, se compilaron los perfiles de ADN_r 16S para el agua de producción y para una muestra de los cultivos de enriquecimiento del agua de producción. Los grupos de homología, cada uno con ≥ 90 % de identidad con el mismo archivo de secuencias del fragmento de ADN_r del NCBI como se describe en la sección de Métodos generales, obtenidos para la muestra de agua de producción original para el cultivo de enriquecimiento con fumarato y para el cultivo de enriquecimiento con Fe(III) se usaron para calcular las proporciones de tipos diferentes de bacterias en cada muestra. Los resultados se muestran en la Tabla 2. El cultivo de enriquecimiento con nitratos no se evaluó en esta muestra.

Tabla 2. Distribuciones filogenéticas en el agua de producción del Sistema de pozos núm. 1 y cultivos de enriquecimiento

Identificación bacteriana	Proporción de población		
	Sistema de pozos núm. 1 Agua de producción	Enriquecimiento con Fumarato	Enriquecimiento con Fe (III)
Epsilonproteobacteria; <i>Arcobacter</i>	71,7 %	65,2 %	10 %
Gamma proteobacteria; <i>Shewanella</i>	nd*	2,1 %	17,4 %
Otros	28,3 %	32,7 %	72,6 %

nd* significa no detectado

Los resultados mostraron que las bacterias que pertenecen al género *Arcobacter* de la clase de proteobacterias Epsilon proteobacteria fueron el tipo predominante de bacterias presentes en el agua de producción del Sistema de pozos núm. 1 (aproximadamente 72 %), y con el enriquecimiento con fumarato, el género *Arcobacter* siguió siendo el tipo predominante de bacterias presentes con aproximadamente 65 % de la población. Además, con el enriquecimiento con fumarato, el porcentaje de bacterias pertenecientes al género *Shewanella* de la clase Gamma proteobacteria se incrementó a aproximadamente 2 % cuando antes era indetectable.

Con el enriquecimiento con Fe(III), el porcentaje de bacterias pertenecientes a *Shewanella* aumentó, en tanto que el porcentaje de bacterias pertenecientes a *Arcobacter* disminuyó.

El cultivo de enriquecimiento con fumarato se incubó
5 durante otros 14 días a temperatura ambiente, una alícuota de 100 µl del enriquecimiento se sembró en estrías sobre una placa con agar y caldo marino (preparado según receta, Difco™ 2216, Becton-Dickenson, Sparks, MD), y la placa se incubó a temperatura ambiente durante dos días. El caldo marino tiene
10 una salinidad de aproximadamente 34 ppm (con 19,5 ppm de NaCl). Los aceptores de electrones en el caldo marino incluyen sulfato, nitrato y aceptores de electrones orgánicos no especificados de peptona y extracto de levadura.

Se volvieron a sembrar por estrías sobre placas con agar
15 y caldo marino colonias seleccionadas al azar y se cultivaron para purificar los aislados. Para caracterizar la identidad de los aislados, las colonias se cribaron para identificación por amplificación de PCR al usar el método directo de ADNr de colonias descrito en la sección de Métodos generales mediante
20 el uso de ambos iniciadores de Lane (supra), el iniciador inverso de PCR, 1492R (sec. con núm. de ident.:1) y el iniciador directo de PCR 8F (sec. con núm. de ident.:2). El análisis y la secuenciación de ADN descritos en la sección de Métodos generales se usaron para obtener las secuencias de
25 ADNr 16S para identificación microbiana.

Las bacterias pertenecientes al género *Shewanella* fueron las colonias aisladas predominantes del enriquecimiento con fumarato que después se sembraron por estrias sobre placas con medio sólido de agar y caldo marino. Después de este proceso, aproximadamente 52 % de la población se clasificó como *Shewanella*. Las células de *Arcobacter* no se aislaron con este procedimiento particular.

La concentración de sal reducida en el caldo marino puede haber favorecido el crecimiento de *Shewanella* y otros géneros bacterianos sobre el crecimiento de *Arcobacter*.

Tabla 3. Distribución filogenética de colonias aisladas cultivadas en agar y caldo marino después del enriquecimiento con fumarato del agua de producción del Sistema de pozos núm. 1

15	Identificación bacteriana	Proporción de población
	Epsilon proteobacteria; <i>Arcobacter</i>	nd*
	Gamma proteobacteria; <i>Shewanella</i>	51,7 %
20	Otros	48,3 %

nd* significa no detectado

Resultados del análisis de secuencias de ADNr 16S para el Sistema de pozos núm. 2

Para las muestras de agua de producción y de inyección del Sistema de pozos núm. 2, los cultivos de enriquecimiento se

prepararon como se describió anteriormente con fumarato, nitrato o Fe(III) como aceptor de electrones. Se compilaron los perfiles de poblaciones basados en secuencias de ADNr 16S, obtenidos como se describe en la sección de Métodos generales, para el agua de producción, el agua de inyección y los cultivos de enriquecimiento que se muestran en las Tablas 4 y 5.

En el agua de producción del Sistema de pozos núm. 2 no se detectaron células de, *Shewanella*, y las células de *Arcobacteria* no estuvieron bien representadas: 4 % (Tabla 4).

En ambos enriquecimientos con fumarato y nitrato, la proporción de bacterias pertenecientes a *Arcobacter* se incrementó para convertirse en el tipo predominante: aproximadamente 89 % y 85 % de la población, respectivamente. La población de *Arcobacter* tuvo un pequeño incremento con el enriquecimiento con Fe(III). Con los enriquecimientos con fumarato y Fe(III), la población de *Shewanella* aumentó, en tanto que con el enriquecimiento con nitratos, las células de *Shewanella* permanecieron no detectadas.

Tabla 4. Distribución filogenética en el agua de producción del Sistema de pozos núm. 2 y sus enriquecimientos

Identificación bacteriana	Proporción de población			
	Agua de producción del Sistema de pozos núm. 2	Enriquecimiento con fumarato	Enriquecimiento con Fe(III)	Enriquecimiento con nitrato
Epsilon proteobacteria; <i>Arcobacter</i>	4 %	88,6 %	8,3 %	85,2 %
Gamma proteobacteria; <i>Shewanella</i>	nd*	2,1	10,7 %	nd
Otros	96,0 %	9,3 %	81 %	14,8 %

nd* significa no detectado

En el agua de inyección del Sistema de pozos núm. 2, nuevamente, las células de *Shewanella* no estuvieron representadas, en tanto que las células de *Arcobacter* fueron los microorganismos predominantes. En el cultivo de enriquecimiento con fumarato, la proporción de células de *Shewanella* se incrementó desde indetectable a 21 % de la población. La proporción de células de *Arcobacter* disminuyó, pero permaneció como la especie más predominante con un 26 %. En el enriquecimiento con Fe(III), la proporción de células de *Arcobacter* disminuyó hasta ser no detectable, en tanto que la proporción de células de *Shewanella* aumentó a aproximadamente 90 %. En el enriquecimiento con nitrato, las células de *Shewanella* tampoco fueron detectadas, en tanto que las células de *Arcobacter* disminuyeron, pero estuvieron bien representadas con aproximadamente 22 %.

Tabla 5. Distribución filogenética en el enriquecimiento con fumarato del agua de inyección del Sistema de pozos núm. 2

5	Identificación bacteriana	Proporción de población			
		Agua de inyección del Sistema de pozos núm. 2	Enriquecimiento con fumarato	Enriquecimiento con Fe(III)	Enriquecimiento con nitrato
10	Epsilon proteobacteria; <i>Arcobacter</i>	88,0 %	26,0 %	nd*	22,2 %
	Gamma proteobacteria; <i>Shewanella</i>	nd	21 %	90,4 %	nd
	Otros	12 %	53 %	9,6 %	77,8 %

nd* significa no detectado

Ejemplo 3

Tolerancia de *shewanella* a la sal

Una cepa de *Shewanella* aislada del enriquecimiento con fumarato del agua de inyección del pozo núm. 2 se cultivó a 32 °C en medio Bacto-triptona al 1 % que contiene cantidades variables de NaCl. La salinidad real fue aproximadamente 10 ppt más alta que la concentración de NaCl debido a la contribución de la triptona en el medio, según lo medido por lecturas refractométricas actuales. Se determinó el índice de crecimiento para la cepa en cada concentración de NaCl al medir la OD600, y se muestra en la Tabla 6, en donde índice de crecimiento $k = \log 2/T$ y en donde T = tiempo de duplicación.

Tabla 6. Índices de crecimiento de la cepa de *Shewanella* del pozo núm. 2 con cantidades diferentes de NaCl

ppt de NaCl	1	5	10	15	20	25	30	40	50
Índice de crecimiento (h ⁻¹)	0,49	1,20	1,12	0,94	0,96	0,63	0,55	0,60	0,42

La cepa aislada de *Shewanella* creció mejor con una salinidad de aproximadamente 15 ppt (5 ppt de NaCl + 10 ppt de triptona), y el índice de crecimiento decayó con concentraciones de sal más altas. El índice de crecimiento se redujo considerablemente con salinidades de 11 y 60 ppt.

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 a partir de la presente descripción de la invención.

REIVINDICACIONES

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

5 1. Un método para enriquecer una población microbiana; el método comprende:

 a) proporcionar una muestra ambiental de un fluido de un yacimiento de petróleo que comprende una población microbiana autóctona; y

10 b) cultivar esa muestra en un medio que comprende sal, al menos una fuente de carbono y un aceptor de electrones seleccionado de aceptor de electrones orgánico y aceptor de electrones de ión metálico para obtener una población
15 microbiana enriquecida;

caracterizado porque la proporción de células de *Shewanella* en la población microbiana enriquecida de (b) es mayor que la proporción de células de *Shewanella* en la muestra ambiental de (a).

20 2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque el medio de (b) tiene una concentración de sal que está entre aproximadamente 10 ppt y 55 ppt.

 3. El método de conformidad con la reivindicación
25 1, que además comprende una etapa después de (b) para

cultivar la población microbiana enriquecida de (b) en un medio que tiene una concentración de sal que está entre aproximadamente 15 ppt y 35 ppt para obtener una segunda población microbiana enriquecida.

5 4. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque el aceptor de electrones es un aceptor de electrones orgánico y caracterizado además porque las células de *Arcobacter* están presentes en la población microbiana enriquecida de (b).

10 5. El método de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado además porque la concentración de sal es de al menos aproximadamente 40 ppt.

 6. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque al menos una fuente de
15 carbono de (b) se selecciona del grupo que consiste en acetato, lactato, piruvato, butirato, y formato.

 7. Un método para aislar una cepa del género *Shewanella*; el método comprende:

 a) proporcionar una muestra ambiental de un fluido
20 de un yacimiento de petróleo que comprende una población microbiana autóctona;

 b) cultivar esa muestra en un medio que comprende sal, al menos una fuente de carbono y un aceptor de electrones seleccionado de aceptor
25 de electrones orgánico y aceptor de electrones

de ión metálico para obtener una población microbiana enriquecida;

- c) cultivar la población microbiana enriquecida de (b) en un medio que tiene una concentración de sal que está entre aproximadamente 10 ppt y 40 ppt para obtener colonias aisladas; y
- d) realizar el cribado de las colonias aisladas de (c) por análisis de secuencias de ADNr contra secuencias de ADNr microbiano conocidas;

10 caracterizado porque se identifica al menos una cepa de *Shewanella*.

8. El método de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado además porque el medio de (b) tiene una concentración de sal que está entre aproximadamente 10 ppt y 40 ppt.

9. El método de conformidad con la reivindicación 1 o 7, caracterizado además porque el ion metálico se selecciona del grupo que consiste en Fe(III), Mn(IV), Cr(IV), y mezclas de estos.

20 10. El método de conformidad con la reivindicación 1 o 7, caracterizado además porque el aceptor de electrones orgánico se selecciona del grupo que consiste en fumarato, N-óxido de trimetilamina, sulfóxido de dimetilo, piruvato, glicina, y mezclas de estos.

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

- 5 a) proporcionar una población microbiana enriquecida obtenida por el método de conformidad con la reivindicación 1 o 3;
 - b) introducir la población microbiana enriquecida de (a) en un yacimiento de petróleo;
 - 10 c) introducir una solución de nutrientes que comprende al menos una fuente de carbono y al menos un aceptor de electrones en el yacimiento de petróleo; y
 - d) recuperar petróleo del yacimiento de petróleo;
- caracterizado porque el cultivo de la población microbiana enriquecida mejora la recuperación de petróleo.

RESUMEN DE LA INVENCION:

Se presentan métodos para enriquecer poblaciones microbianas que son autóctonas en fluidos de yacimientos de petróleo para obtener poblaciones enriquecidas con *Shewanella* y cepas aisladas de *Shewanella* útiles para mejorar la recuperación de petróleo de un yacimiento de petróleo. Adicionalmente, las poblaciones enriquecidas pueden contener bacterias que pertenecen al género *Arcobacter*.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Hendrickson, Edwin
Luckring, Abigail

<120> Enriquecimiento de fluidos de yacimientos de petróleo con shewanella

<130> 28908 (CL5496)

<150> 61/570,553

<151> 2011-12-14

<160> 4

<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> 1500

<212> ADN

<213> Shewanella indica

<400> 3

ttgatcatgg ctcagattga acgctggcgg caggcctaac acatgcaagt cgagcggtaa 60

catttcaaaa gcttgctttt gaagatgacg agcggcggac gggtgagtaa tgcctgggaa 120

tttgcccatt tgtgggggat aacagttgga aacgactgct aataccgcat acgccctacg 180

ggggaaagca ggggaccttc gggccttgcg ctgatggata agcccagggtg ggattagcta 240

gtaggtgagg taatggctca cctaggcaac gatccctagc tggctctgaga ggatgatcag 300

ccacactggg actgagacac ggcccagact cctacgggag gcagcagtgg ggaatattgc 360

acaatggggg aaaccctgat gcagccatgc cgcgtgtgtg aagaaggcct tcgggttgta	420
aagcactttc agcgaggagg aaagggtgta agttaatacc ttacatctgt gacgttactc	480
gcagaagaag caccggctaa ctccgtgcc a gcagccgcgg taatacggag ggtgcgagcg	540
ttaatcggaa ttactgggcg taaagcgtgc gcaggcgggtt tgttaagcga gatgtgaaag	600
ccccgggctc aacctgggaa ccgcatttcg aactggcaaa ctagagtctt gtagaggggg	660
gtagaattcc aggtgtagcg gtgaaatgcg tagagatctg gaggaatacc ggtggcgaag	720
gcggccccct ggacaaagac tgacgctcag gcacgaaagc gtggggagca aacaggatta	780
gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat gtctactcgg agtttggtgt cttgaacact	840
gggctctcaa gctaacgcat taagtagacc gcctggggag tacggccgca aggttaaaac	900
tcaaatgaat tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgatgcaac	960
gcgaagaacc ttacctactc ttgacatcca gagaactttc cagagatgga ttggtgcctt	1020
cgggaactct gagacaggtg ctgcatggct gtcgtcagct cgtgttgatga aatgttgggt	1080
taagtcccg aacgagcgca acccctatcc ttacttgcca gcgggtaatg ccgggaactt	1140
tagggagact gccggtgata aaccggagga aggtggggac gacgtcaagt catcatggcc	1200
cttacgagta gggctacaca cgtgctacaa tggtcggtac agagggttgc gaagccgcga	1260

ggtggagcta atctcataaa gccggtcgta gtccggattg gagtctgcaa ctcgactcca 1320

tgaagtcgga atcgctagta atcgtggatc agaatgccac ggtgaatacg ttcccgggcc 1380

ttgtacacac cgcccgtcac accatgggag tgggctgcac cagaagtaga tagcttaacc 1440

ttcgggaggg cgtttaccac ggtgtggttc atgactgggg tgaagtcgta acaaggtaac 1500

<210> 4

<211> 1426

<212> ADN

<213> *Arcobacter marinus*

<400> 4

ctggctcaga gtgaacgctg gcggcgtgct taacacatgc aagtcgaacg agaacgggat 60

tagcttgcta atctgtcagc taagtggcgc acgggtgagt aatatatagg taactgcct 120

tcaagagggg gataacagat ggaaacgtct gctaagaccc catatgcctt taatacaaaa 180

gtatgaaagg gaaatattta tagcttgaag atcggcctgt acagtatcag atagttggtg 240

aggtaatggc tcaccaagtc aatgacgctt aactggtttg agaggatgat cagtcacact 300

ggaactgaga cacgggccag actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tgcacaatgg 360

gggaaaccct gatgcagcaa cgccgctgag aggatgacac atttcggtgc gtaaactcct 420

tttatataag aagataatga cgggtattata tgaataagca cgggctaact ccgtgccagc	480
agccgcggtg atacggaggg tgcaagcgtt actcggaatc actgggcgta aagagcgtgt	540
aggcgtagat ataagtcaga agtgaaatcc aatagcttaa ctattgaact gcttttgaaa	600
ctgtctatct agagtatggg agaggtagat ggaatttctg gtgtaggggt aaaatccgta	660
gagatcagaa ggaataaccga ttgcgaaggc gatctactgg aacataactg acgctgagac	720
gcgaaagcgt ggggagcaaa caggattaga taccctggta gtccacgccc taaacgatgt	780
acactagttag ttgctatgct cgacatagca gtaatgcagt taacacatta agtgtaccgc	840
ctgggggagta cggtcgcaag attaaaactc aaaggaatag acggggaccc gcacaagcgg	900
tggagcatgt ggtttaattc gacgatacgc gaagaacctt acctggtctt gacatagtaa	960
gaaccattta gagatagatg ggtgtctgct tgcagaaact tatatacagg tgctgcacgg	1020
ctgtcgtcag ctctgtctgt gagatgttgg gttaagtccc gcaacgagcg caaccctcgt	1080
cattagttag taacacttcg ggtgagaact ctaatgagac tgcttacgca agtaggagga	1140
aggtgaggac gacgtcaagt catcatggcc cttacgacca gggctacaca cgtgctacaa	1200
tgggggtatac aaagagcagc gatacagtga tgtggagcaa atctaaaaaa tacctcccag	1260

ttcggattgt agtctgcaac tcgactacat gaagttggaa tcgctagtaa tcgtagatca 1320

gcaatgctac ggtgaatacg ttcccgggtc ttgtactcac cgcccgtcac accatgggag 1380

ttgatttcac tcgaagcggg gatgctaaga tagctaccct cctcag 1426

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 Interpreté Oficial inglés-español-inglés según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

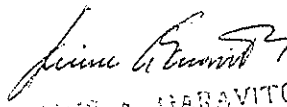
Traducción al español de legalizaciones en poder conferido por E.I. du Pont de Nemours and Company

APOSTILLA

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

Certificado

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


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

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

Se traduce lo siguiente después del texto del poder:

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

El 26 de febrero de 2008

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

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

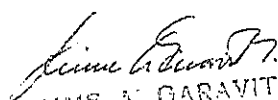
TRADUCCIÓN OFICIAL N° 2603081 al español de un documento escrito en inglés, efectuada por Jaime Armando Garavito Burgos, c.c. N° 19.130.702 de Bogotá, Traductor e Intérprete Oficial inglés-español-inglés según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia de la República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

El 26 de febrero de 2008 el suscrito Notario

DA FE

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

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

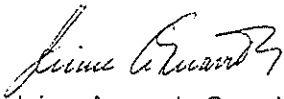

JAIME A. GARAVITO B 2
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
N° 034 de enero 11 de 1983
MINISTERIO DE JUSTICIA

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.

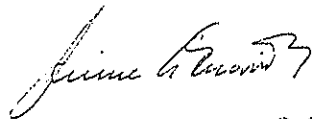


Jaime Armando Garavito Burgos

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

TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
DE LENGUA ESPAÑOL AL INGLES
MINISTERIO DE JUSTICIA

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Patricia Panariello

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

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

Certified

5. at Dover, Delaware

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

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0345347

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State

POWER OF ATTORNEY

The undersigned.

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

1007 Market Street
Wilmington, Delaware 19898 US

declares that it hereby grants to

ALVARO CORREA-ORDÓÑEZ 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

William D. Macorahay

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-ORDÓÑEZ 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, enseññas, lemas comerciales y nombres de dominio; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Los procesos para la protección del consumidor, competencia desleal, oposiciones, cancelaciones, nulidades, medidas cautelares, infracciones, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general procesos civiles, penales, administrativos relacionados con estos derechos. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del caso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

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

Dado y firmado en

A los _____ días del mes de _____ de 2008

Firma de la persona que firma el Poder

NOTARIAL CERTIFICATION

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

CERTIFIES

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

CERTIFICACION NOTARIAL

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

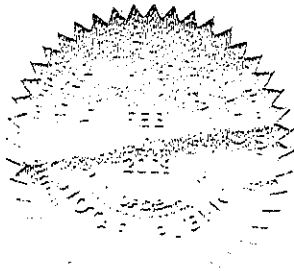
DA FE

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

Patricia Panariello

Patricia Panariello, Notary Public

El Notario Público



VIII-2-1	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	In relation to this international application E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1(i v)		an assignment from HENDRICKSON, Edwin to E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY, dated 12 November 2012 (12.11.2012)
VIII-2-1(i v)		an assignment from LUCKRING, Abigail to E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY, dated 12 November 2012 (12.11.2012)