DESCRIPCIÓN

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA REDUCIR EL SULFURO DE HIDRÓGENO Y LA CORROSIÓN DE INFLUENCIA MICROBIANA EN EL PETRÓLEO CRUDO, EL GAS NATURAL Y EN EL EQUIPO ASOCIADO

REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de las siguientes solicitudes provisionales de los EE. UU.: número de serie 62/456,979, presentada el 9 de febrero de 2017; Número de serie 62/463,864, presentada el 27 de febrero de 2017; Número de serie 62/507,904, presentada el 18 de mayo de 2017; y número de serie 62/528,731, presentado el 5 de julio de 2017, cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las composiciones de hidrocarburos son recursos críticos para la producción de combustibles, lubricantes, plásticos y muchos otros productos. Debido a la alta demanda de composiciones de hidrocarburos, la seguridad y la eficiencia de su producción y transmisión son esenciales. Un factor importante que afecta la seguridad y la eficiencia de la producción de petróleo crudo y gas natural es la presencia de gas de sulfuro de hidrógeno (H_2S). El gas H_2S se encuentra naturalmente en el petróleo y el gas natural en cantidades bajas; sin embargo, cuando los niveles de H_2S se elevan, se dice que el petróleo o el gas se vuelven "amargos".

El sulfuro de hidrógeno es una preocupación en la industria del petróleo y el gas por una variedad de razones. Por ejemplo, el H_2S se puede convertir en un contaminante del aire cerca de las refinerías de petróleo y en las áreas de extracción de petróleo y gas. Las liberaciones atmosféricas de H_2S representan una preocupación importante para la salud pública. El H_2S es extremadamente tóxico. La exposición a concentraciones superiores a 100 ppm puede causar daño a los órganos internos, y las exposiciones superiores a 600 ppm pueden ser rápidamente fatales.

Otro grupo de compuestos que contienen azufre también puede estar presente en los campos de petróleo y gas. Estos compuestos orgánicos de azufre conocidos como mercaptanos, contienen un grupo sulfhidrilo unido a carbono y se encuentran en muchas corrientes de hidrocarburos, principalmente como impureza. Son similares a los alcoholes, pero con un átomo de azufre (S) que reemplaza al átomo de oxígeno. Algunos mercaptanos presentan olores fuertes y pueden causar graves trastornos en la vida diaria. Los seres humanos son muy sensibles a los mercaptanos en niveles muy bajos. Por esta razón, los mercaptanos se utilizan como odorizantes en el gas natural comercial y de consumo para señalar las fugas de gas. Algunos mercaptanos pueden causar corrosión y, a menudo, provocar fallas en la prueba de la tira de cobre bajo ciertas condiciones. Los mercaptanos también pueden afectar negativamente la catálisis y los lechos de adsorción de sólidos, como el gel de sílice o la alúmina, al competir por el acceso a los mismos sitios activos. La eliminación de mercaptano es necesaria para reducir las emisiones de azufre, ya que la combustión y la emisión de compuestos que contienen mercaptano conducirán a la formación de SO_x.

Aparte de los problemas de salud directos, el H_2S y los mercaptanos causan la corrosión de los equipos de producción y transmisión de petróleo y gas.

La corrosión de tuberías, válvulas, accesorios y tanques puede causar una avería en los sistemas de recolección de petróleo y gas y puede ser una seria amenaza para los empleados y para el público. Además, la reparación y sustitución de equipos corroídos puede ocasionar gastos sustanciales.

La corrosión que resulta de la presencia de microorganismos, i.e., la corrosión inducida por microbios (MIC), es un problema importante para la producción y transmisión de petróleo y gas. Cuando las superficies de un pozo u otras superficies están expuestas a ambientes naturales, son colonizadas rápidamente por bacterias que están presentes de forma natural en el ambiente circundante, que a su vez puede formar una biopelícula. Las capas superiores de biopelículas son en su mayoría aeróbicas, mientras que las regiones debajo podrían ser anaeróbicas debido al agotamiento de oxígeno por la biopelícula.

Ciertos microorganismos pueden colonizar estos nichos anaeróbicos y generar subproductos que reducen la calidad del petróleo crudo y el gas natural, causan la corrosión de los metales y representan una amenaza importante para la salud y el medio ambiente. La MIC se ha implicado en el deterioro de los metales en, por ejemplo, oleoductos y plataformas petrolíferas marinas en las industrias petroleras y navieras. Otros entornos también se ven afectados, incluidos los sistemas de recirculación de agua de refrigeración en entornos industriales e instalaciones de tratamiento de aguas residuales y tuberías.

Los microorganismos que son responsables de la MIC incluyen bacterias reductoras de sulfato ("SRB") y bacterias productoras de ácido ("APB"). Las APB producen compuestos que inducen la corrosión a través de la fermentación anaeróbica. Estos compuestos pueden incluir ácidos orgánicos, tales como ácidos grasos volátiles y alcoholes. Como resultado de la producción de ácido orgánico,

el pH debajo de una biopelícula APB puede ser considerablemente más bajo que el del fluido a granel, lo que contribuye al deterioro de las estructuras en las que crecen las bacterias.

Las SRB y archaea obtienen energía oxidando compuestos orgánicos o hidrógeno molecular (H_2) mientras reducen el sulfato ($SO^{2-}{}_4$) a H_2S. En cierto sentido, estos organismos "respiran" sulfato en lugar de oxígeno en forma de respiración anaeróbica. La mayoría de las SRB también pueden reducir otros compuestos de azufre inorgánicos oxidados, como sulfito, tiosulfato o azufre elemental a sulfuro de hidrógeno.

Las SRB contribuyen significativamente al aumento de las concentraciones de H_2S y mercaptano en el petróleo crudo y el gas natural, lo que afecta la calidad del petróleo y el gas, así como la seguridad e integridad de los equipos y la producción de campos de petróleo y gas natural. Además, la producción SRB de H_2S conduce a la corrosión progresiva del hierro en ambientes anóxicos ricos en sulfato. La SRB también puede corroer el hierro por la utilización directa del metal en si mismo, que es probablemente el proceso primario que conduce la corrosión del hierro en ambientes anóxicos que contienen sulfato.

Además, el H_2S producido por la SRB se metaboliza a través de organismos que oxidan el azufre, como el *tiobacilo*, en ácido sulfúrico, uno de los ácidos más fuertes conocidos. La degradación del ácido sulfúrico puede causar daños extremos en las tuberías y otros equipos utilizados en las industrias de petróleo y gas, y se ha encontrado que causa miles de millones de dólares en daños por corrosión cada año en los EE. UU.

La estrategia preferida para eliminar la biocorrosión depende de qué organismos están presentes en el ambiente que se está tratando. Por ejemplo, la susceptibilidad de las arqueas a los agentes antimicrobianos es diferente de la susceptibilidad de las proteobacterias. Las arqueas se caracterizan, por ejemplo, por su resistencia de amplio espectro a los agentes antimicrobianos. Específicamente, las paredes de las arqueas carecen de peptidoglicano (por lo tanto, son gramnegativos), haciéndolas resistentes a muchos agentes antimicrobianos que interfieren con la biosíntesis del peptidoglicano. Las arqueas son susceptibles, sin embargo, a agentes antimicrobianos que interfieren con la síntesis de proteínas.

Por otro lado, las proteobacterias pueden tener diferentes susceptibilidades y/o resistencia debido a otros factores como, por ejemplo, los tipos de peptidoglicanos que contienen, la presencia de cápsulas, la formación de esporas y la modificación de dianas moleculares. Por lo tanto, a la luz de estas diferencias, el desarrollo y la aplicación de una estrategia antibacteriana de amplio espectro con alta eficacia es deseable para eliminar las bacterias corrosivas y reducir el H_2S en petróleo crudo, gas natural y salmuera de pozos.

Las estrategias convencionales de inhibición de la corrosión implican una variedad de estrategias. Estos incluyen la modificación del pH, el potencial redox y/o la resistividad del entorno en el que se instalará el equipo; recubrimientos inorgánicos; protección catódica; y el uso de biocidas “tradicionales”. Sin embargo, muchas de estas estrategias no son prácticas en las operaciones de producción de petróleo y gas.

De estos métodos para combatir la biocorrosión, los métodos más comunes generalmente incluyen biocidas tradicionales. Los biocidas oxidantes, como los compuestos clorantes, se pueden usar en algunos sistemas, así como

los biocidas no oxidantes, como los compuestos de tipo amina y los aldehídos. Los biocidas no oxidantes son más estables y pueden usarse en una variedad de entornos. A pesar del hecho de que los biocidas se utilizan comúnmente, los costos de los biocidas y el daño potencial causado por la liberación de grandes cantidades de compuestos inorgánicos en el medio ambiente son significativos.

Un método alternativo, que se ha hecho popular en los últimos años, es el tratamiento con nitrato. La tecnología de nitrato se basa en el crecimiento selectivo de bacterias reductoras de nitrato ("NRB"), que reemplazan a las dañinas SRB y reducen la capacidad de las SRB para crecer ampliamente. Muchos de los compuestos de nitrato son solubles en agua, no se disuelven en aceite, no son sensibles a los niveles de sal y tienen baja toxicidad. Además, los compuestos de nitrato se pueden consumir completamente, su actividad aumenta con el tiempo y no son sensibles a la temperatura.

A pesar de que el costo unitario de los nitratos no es alto, el costo del tratamiento a gran escala, como en una configuración de petróleo y gas, puede ser extremadamente alto. Además, los tratamientos con nitrato presentan otros inconvenientes. Por ejemplo, pueden ser ineficientes para las líneas de gravedad y pueden aumentar los niveles de nitrógeno en las aguas residuales. Además, el gas N_2 resultante (o el NO_3 residual) puede presentar problemas para las plantas de tratamiento de agua; los costos para el modo de prevención pueden ser excesivos en líneas de tiempo de retención largas, que pueden verse afectadas por los altos niveles de DBO; y el modo de oxidación bio-mediado puede requerir varias horas, haciendo que los nitratos sean menos efectivos en ciertas aplicaciones.

Por lo tanto, el daño a las industrias del petróleo y el gas natural causado por la MIC, en particular el daño causado por el H_2S, sigue siendo profundo. Cada año, estas industrias experimentan una pérdida de miles de millones de dólares debido a los efectos de la corrosión, la necesidad de limpiar el gas natural y el petróleo “ácido”, y la implementación de medidas para reducir los diversos peligros ambientales causados por el H_2S.

Como se señaló anteriormente, muchos tratamientos con biocidas no son amigables con el medio ambiente y no son altamente eficientes. Los tratamientos con nitratos pueden ser más seguros y efectivos, pero pueden tener costos significativos.

Por lo tanto, existe la necesidad en el arte de un medio eficaz, amigables con el medio ambiente y económicamente aceptable para reducir el H_2S y los mercaptanos, y prevenir o inhibir el crecimiento de SRB en formaciones de petróleo y gas y en las superficies del equipo utilizado en todos los aspectos de la producción de petróleo y gas.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCIÓN.

La presente invención proporciona composiciones y métodos amigables con el medio ambiente para reducir y/o eliminar el sulfuro de hidrógeno (H_2S) y otros compuestos que contienen azufre en el petróleo y el gas natural al mismo tiempo que mejora la recuperación del petróleo. En una implementación, esto se logra mediante el control eficiente de bacterias reductoras de sulfato (SRB). Las composiciones y los métodos también se pueden usar para reducir la "acidez" del petróleo crudo y el gas.

La presente invención proporciona además composiciones y métodos para reducir y/o eliminar la corrosión inducida por microbios ("MIC").

Los métodos y composiciones se pueden utilizar en la industria del petróleo y el gas, la agricultura, la limpieza ambiental y otras industrias donde el crecimiento de biopelículas y otros microbios causa complicaciones como, por ejemplo, la generación de subproductos tóxicos como el H_2S y los mercaptanos, la corrosión de los equipos, y reducción de la calidad de los productos manufacturados.

En ciertas implementaciones, la presente invención proporciona materiales y métodos para mejorar la calidad del petróleo y/o el gas al mismo tiempo que mejora la recuperación del petróleo, tratando los sitios de perforación con composiciones que comprenden microorganismos y/o sus productos secundarios.

En implementaciones preferidas, se proporciona una primera composición para reducir el H_2S y controlar las bacterias biocorrosivas presentes en los entornos de producción de petróleo y gas natural al tiempo que mejora la recuperación del petróleo, en donde la primera composición comprende una mezcla antimicrobiana de biosurfactante, un agente quelante y uno o más eliminadores de H_2S.

En algunas implementaciones, la mezcla antimicrobiana de biosurfactante comprende uno o más biosurfactantes. El uno o más biosurfactantes pueden incluir glicolípidos como, por ejemplo, soporolípidos, ramnolípidos y/o una combinación de los mismos. Ventajosamente, los biosurfactantes se pueden usar en concentraciones relativamente bajas para inhibir el crecimiento de bacterias, en particular, bacterias grampositivas.

En algunas implementaciones, la mezcla de biosurfactante antimicrobiano comprende además uno o más biosurfactantes lipopéptidos, tales como, por ejemplo, surfactina. El uso de surfactina amplía el espectro de la actividad antimicrobiana para incluir bacterias gramnegativas.

En algunas implementaciones, la primera composición comprende además un agente quelante. En implementaciones específicas, el agente quelante es EDTA.

En algunas implementaciones, la primera composición comprende además uno o más eliminadores de H_2S capaces de convertir H_2S en formas más inertes. El uno o más eliminadores de H_2S pueden ser, por ejemplo, soluciones de nitrato o nitrito. En implementaciones específicas, los eliminadores de H_2S se seleccionan de sales de nitrato o nitrito, que incluyen, entre otros, nitrato de sodio, nitrito de sodio, nitrato de amonio, nitrito de amonio, nitrato de potasio y nitrito de potasio. En otra implementación, el eliminador de H_2S puede incluir glioxal.

En ciertas implementaciones, la primera composición puede comprender una o más sustancias biológicas naturales con propiedades antimicrobianas conocidas, particularmente contra microorganismos gramnegativos. En una implementación, la sustancia biológica natural puede comprender nisina, un polipéptido antimicrobiano obtenido mediante el cultivo de *Lactococcus lactis*. En otra implementación, la sustancia biológica natural puede comprender citronella (extracto de hierba de limón). La citronela se puede usar para suprimir las bacterias gramnegativas y grampositivas, así como algunos hongos y levaduras.

En una implementación, se proporciona una segunda composición para estabilizar y prolongar los efectos antimicrobianos y reductores de sulfuro de

hidrógeno, así como la recuperación mejorada de petróleo de la primera composición, por ejemplo, evitando que cualquier SRB restante se multiplique.

La segunda composición puede comprender un microorganismo capaz de superar a la SRB residual para fuentes de energía y carbono comunes, suprimiendo así el recrecimiento de la SRB; y, opcionalmente, fuentes de nutrientes para asegurar el crecimiento efectivo del cultivo microbiano en condiciones anaeróbicas, incluidas, entre otras, nitritos, nitratos, fósforo, magnesio, fuentes de proteínas y/o carbono.

Preferiblemente, el microorganismo de la segunda composición está en forma de espora. Por consiguiente, en una implementación, la segunda composición puede comprender sustancias para mejorar la germinación de esporas, tales como, por ejemplo, L-alanina y/o manganeso.

En una implementación, el microorganismo de la segunda composición es una cepa de bacterias productora de biosurfactantes formadora de esporas. En implementaciones preferidas, las bacterias pueden introducirse como bacterias reductoras de nitrato ("NRB").

En una implementación, la bacteria es una especie de *Bacillus* clade. En una implementación, la bacteria es una especie de *Pseudomonas* clade. En implementaciones preferidas, las bacterias de la segunda composición son una cepa de *Bacillus subtilis*. Incluso más específicamente, el *Bacillus subtilis* puede ser *B. subtilis var.* locuses de las cepas B1 y/o B2, que son productores efectivos del lipopéptido surfactina.

En una implementación, la bacteria es una cepa de *Pseudomonas*, tal como, por ejemplo, P. aeruginosa. La P. aeruginosa es un productor efectivo de biosurfactantes ramnolipidos.

En una implementación, la primera y la segunda composiciones se pueden usar para inhibir la producción de H_2S por parte de la SRB y otras bacterias biocorrosivas mientras se mejora la recuperación de petróleo y/o gas. Ventajosamente, las composiciones pueden tener propiedades antimicrobianas de amplio espectro, lo que significa que se pueden usar para controlar, por ejemplo, bacterias grampositivas y gramnegativas, así como otros microorganismos biocorrosivos. En una implementación, las bacterias biocorrosivas están en forma de un biofilm.

En una implementación, la primera y segunda composiciones se pueden usar para reducir la corrosión y el deterioro de los equipos y estructuras metálicas en las cuales crecen las bacterias biocorrosivas, específicamente, la corrosión y el deterioro de los equipos y estructuras utilizados para la producción de petróleo crudo y gas natural.

En una implementación, se proporciona un método de dos fases para mejorar la producción de petróleo y gas natural. Específicamente, los métodos se pueden usar para inhibir la producción de H_2S por parte de la SRB y otras bacterias biocorrosivas, así como para reducir la "acidez" del petróleo crudo y el gas, al mismo tiempo que mejoran la recuperación de petróleo y gas. Los métodos pueden utilizarse además para reducir la conversión de petróleo dulce en petróleo y gas acido, aumentar la conversión de petróleo y gas ácidos en petróleo y gas dulces y/o preservar la dulzura del petróleo y el gas. Los métodos pueden usarse además para reducir el contenido de H_2S y mercaptanos en el petróleo dentro o fuera de un pozo.

En ciertas implementaciones, el método de dos fases se puede usar además para reducir y/o eliminar la corrosión microbiana ("MIC") de los equipos y estructuras utilizadas para la producción de petróleo crudo y gas natural.

En una implementación, la fase uno del método comprende aplicar la primera composición de la invención objeto a una formación que contiene petróleo y gas, por ejemplo, inyectando la primera composición lo más profundamente posible en un pozo; encerrándola en la formación; bombeando la composición; y abriendo la formación para reanudar la recuperación de petróleo y/o gas.

Preferiblemente, la fase uno se lleva a cabo mientras se monitorean continuamente los niveles de sulfuro de hidrógeno dentro de la formación.

En una implementación de la fase uno, la etapa de cierre en la formación se lleva a cabo hasta que el nivel de sulfuro de hidrógeno se reduce a una concentración deseada. Por ejemplo, el período cerrado puede durar de aproximadamente 3 a aproximadamente 60 días, o hasta que los niveles de sulfuro de hidrógeno se reduzcan a una concentración de aproximadamente 0 ppm a aproximadamente 50 ppm, más preferible de aproximadamente 0 ppm a aproximadamente 25 ppm.

La fase uno del método puede servir como tratamiento inicial para (a) controlar las bacterias biocorrosivas, (b) reducir la concentración de H_2S en la formación y (c) mejorar la recuperación de petróleo y gas de la formación.

En una implementación, la fase dos del método comprende recuperar petróleo y/o gas de la formación hasta que se observe un aumento de la concentración de sulfuro de hidrógeno; aplicar la segunda composición de la presente invención a la formación, por ejemplo, inyectándola lo más

profundamente posible en el pozo; encerrándola en la formación; y abriendo la formación para reanudar la recuperación de petróleo y/o gas.

Preferiblemente, la fase dos se lleva a cabo mientras se controlan continuamente los niveles de sulfuro de hidrógeno dentro de la formación.

En una implementación, el aumento de la concentración de sulfuro de hidrógeno que se observa antes de la aplicación de la segunda composición en la fase dos es un aumento de aproximadamente 1 ppm a aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 100 ppm, o más, por encima de la concentración más baja observada. En una implementación, el aumento de la concentración de sulfuro de hidrógeno que se observa antes de la aplicación de la segunda composición es cualquier aumento que lleve la concentración de sulfuro de hidrógeno a un nivel de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 ppm, o más.

En una implementación de la fase dos, la etapa de cierre en la formación se lleva a cabo hasta que el nivel de sulfuro de hidrógeno se reduce a una concentración deseada. Por ejemplo, el período cerrado puede durar de aproximadamente 3 a aproximadamente 60 días, o hasta que los niveles de sulfuro de hidrógeno se reduzcan a una concentración de aproximadamente 0 ppm a aproximadamente 50 ppm, más preferible de aproximadamente 0 ppm a aproximadamente 25 ppm.

La fase dos del método puede servir para mejorar el control de las bacterias biocorrosivas, la reducción de la concentración de sulfuro de hidrógeno y la recuperación mejorada de petróleo y gas. La fase dos también puede servir para estabilizar y prolongar los efectos antimicrobianos y reductores de sulfuro de

hidrógeno de la fase uno, por ejemplo, evitando que cualquier SRB restante se multiplique.

En una implementación del método objeto, solo la fase uno se emplea sin la fase dos. En una implementación, la fase dos se emplea sin la fase uno de antemano.

Ventajosamente, la presente invención se puede usar sin liberar grandes cantidades de compuestos inorgánicos en el medio ambiente. Además, las composiciones y los métodos utilizan componentes que son biodegradables y toxicológicamente seguros. Por lo tanto, la presente invención se puede utilizar en la producción de petróleo y gas (y otras industrias) como un tratamiento "verde".

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra la inhibición del crecimiento de *Bacillus* subtilis var. Locuses B1 y B2 por soporolípidos.

La Figura 2 muestra la producción diaria de petróleo, la producción de gas y la concentración de H_2S antes y después del tratamiento con la fase 1 y la fase 2 de los métodos objeto en un pozo horizontal (Speechley Sand, PA).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona composiciones y métodos amigables con el medio ambiente para reducir y/o eliminar el sulfuro de hidrógeno (H_2S) y otros compuestos que contienen azufre en el petróleo y el gas natural al mismo tiempo que mejora la recuperación del petróleo. En una implementación, esto se logra mediante el control eficiente de bacterias reductoras de sulfato (SRB). Las composiciones y los métodos también se pueden usar para reducir la "acidez" del petróleo crudo y el gas.

La presente invención proporciona además composiciones y métodos para reducir y/o eliminar la corrosión inducida por microbios ("MIC").

Los métodos y composiciones se pueden utilizar en la industria del petróleo y el gas, la agricultura, la limpieza ambiental y otras industrias donde el crecimiento de biopelículas y otros microbios causa complicaciones como, por ejemplo, la generación de subproductos tóxicos como el H_2S y los mercaptanos, la corrosión de los equipos, y reducción de la calidad de los productos manufacturados.

En ciertas implementaciones, la presente invención proporciona materiales y métodos para mejorar la calidad del petróleo y/o el gas al mismo tiempo que mejora la recuperación del petróleo, tratando los sitios de perforación con composiciones que comprenden microorganismos y/o sus productos secundarios.

Definiciones seleccionadas

Como se usa en este documento, la referencia a una "composición a base de microbios" significa una composición que comprende componentes que se produjeron como resultado del crecimiento de microorganismos u otros cultivos celulares. Por lo tanto, la composición a base de microbios puede comprender los propios microbios y/o subproductos del crecimiento microbiano. Los microbios pueden estar en estado vegetativo, en forma de esporas, en forma de micelio, en cualquier otra forma de propágulo, o en una mezcla de estos. Los microbios pueden ser planctónicos o en forma de biofilm, o una mezcla de ambos. Los subproductos del crecimiento pueden ser, por ejemplo, metabolitos, componentes de la membrana celular, proteínas expresadas y/u otros componentes celulares. Los microbios pueden estar intactos o lisados. En implementaciones preferidas,

los microbios están presentes, con sustrato en el que se cultivaron, en la composición a base de microbios. Las células pueden estar presentes, por ejemplo, en una concentración de 1×10^4, 1×10^5, 1×10^6, 1×10^7, 1×10^8, 1×10^9, 1×10^{10} o 1×10^{11} o más propágulos por mililitro de la composición. Como se usa en este documento, un propágulo es cualquier parte de un microorganismo a partir del cual un organismo nuevo y/o maduro puede desarrollarse, incluyendo, entre otros, células, esporas, conidios, micelios, brotes y semillas.

La presente invención proporciona además "productos basados en microbios", que son productos que deben aplicarse en la práctica para lograr el resultado deseado. El producto a base de microbios puede ser simplemente la composición a base de microbios recolectada del proceso de cultivo de microbios. Alternativamente, el producto a base de microbios puede comprender ingredientes adicionales que se han agregado. Estos ingredientes adicionales pueden incluir, por ejemplo, estabilizadores, búfer, portadores apropiados, como agua, soluciones salinas o cualquier otro portador apropiado, nutrientes agregados para apoyar el crecimiento microbiano adicional, potenciadores del crecimiento no nutritivos y/o agentes que facilitan el seguimiento de los microbios y/o la composición en el ambiente al que se aplica. El producto a base de microbios también puede comprender mezclas de composiciones a base de microbios. El producto a base de microbios también puede comprender uno o más componentes de una composición a base de microbios que se han procesado de alguna manera tal como, entre otros, filtración, centrifugación, lisado, secado, purificación y similares.

Como se usa en este documento, "recolectado" en el contexto de la fermentación de microorganismos se refiere a la eliminación de una parte o la totalidad de la composición a base de microbios de un recipiente de crecimiento.

En algunas implementaciones, los microbios utilizados de acuerdo con la presente invención son "sobreproductores de surfactantes". Por ejemplo, la cepa puede producir al menos 0,1-10 g/L, e.g., 0,5-1 g/L de surfactante. Por ejemplo, las bacterias pueden producir al menos 10%, 25%, 50%, 100%, 2 veces, 5 veces, 7,5 veces, 10 veces, 12 veces, 15 veces o más surfactante en comparación con otras cepas microbianas de recuperación de petróleo. Específicamente, el *Bacillus* subtilis ATCC 39307 se usa aquí como una cepa de referencia.

Tal como se usa en el presente documento, "aplicar" una composición o producto se refiere a ponerlo en contacto con un objetivo o sitio de manera que la composición o producto pueda tener un efecto en ese objetivo o sitio. El efecto puede deberse, por ejemplo, al crecimiento microbiano y/o a la acción de un biosurfactante u otro subproducto del crecimiento. Por ejemplo, las composiciones o productos a base de microbios pueden inyectarse en pozos de petróleo y/o en tuberías, bombas, tanques, etc. asociados con pozos de petróleo.

Como se usa en este documento, "surfactante" se refiere a un compuesto que reduce la tensión superficial (o tensión interfacial) entre dos líquidos o entre un líquido y un sólido. Los surfactantes actúan como detergentes, agentes humectantes, emulsionantes, agentes espumantes y/o dispersantes. Un surfactante producido por microorganismos se conoce como un "biosurfactante".

Como se usa en este documento, "mercaptán" es otro término para un tiol. Los mercaptanos son compuestos orgánicos de azufre que contienen un grupo sulfhidrilo unido a carbono. Su estructura química es similar a los alcoholes, pero comprende un átomo de azufre en lugar del átomo de oxígeno. Algunos mercaptanos, en particular las formas puras, presentan fuertes olores desagradables, parecidos al ajo o huevos podridos. Otros son responsables de los

aromas de café tostado o pomelo. Los seres humanos son muy sensibles a los mercaptanos, incluso en niveles muy bajos. Cualquier referencia al H_2S dentro de la solicitud en cuestión incluirá mercaptanos y otros compuestos que contienen azufre.

Como se usa en el presente documento, una "biopelícula" es un agregado complejo de microorganismos, tales como bacterias, en donde las células se adhieren entre sí en una superficie. Las células en las biopelículas son fisiológicamente distintas de las células planctónicas del mismo organismo, que son células individuales que pueden flotar o nadar en un medio líquido.

Tal como se usa en el presente documento, "producción de petróleo y gas natural" se refiere a todas y cada una de las operaciones involucradas en la extracción de petróleo crudo y/o gas natural de la tierra, el procesamiento y su posible compra y uso por parte de los consumidores. La producción de petróleo y gas natural puede incluir, pero no se limita a, perforación, bombeo, recuperación, fracking, inundación de agua, transmisión, procesamiento, refinación, transporte y almacenamiento de petróleo y/o gas.

Un "metabolito" se refiere a cualquier sustancia producida por el metabolismo o una sustancia necesaria para participar en un proceso metabólico particular. Un metabolito puede ser un compuesto orgánico que es un material de partida (e.g., glucosa), un intermedio (e.g., acetil-CoA) o un producto final (e.g., n-butanol) del metabolismo. Los ejemplos de metabolitos pueden incluir, entre otros, enzimas, toxinas, ácidos, solventes, alcoholes, proteínas, carbohidratos, vitaminas, minerales, microelementos, aminoácidos, polímeros y surfactantes.

Un "entorno de producción de petróleo y gas natural" se refiere a cualquier entorno, equipo, estructura o superficie, ya sea natural o artificial, en el que ocurran uno o más aspectos de la producción y el procesamiento de petróleo y gas natural, incluidos, entre otros, formaciones que contienen petróleo y gas, plataformas de perforación, refinerías de petróleo, pozos, barras de perforación de pozos de petróleo, líneas de flujo, separadores, bombas, tubos, tuberías, cubiertas, válvulas, accesorios, sistemas de recolección y tanques de almacenamiento.

Como se usa en el presente documento, el término "control" usado en referencia a la actividad producida por los biosurfactantes o los microorganismos productores de biosurfactantes se extiende al acto de matar, deshabilitar, inmovilizar o reducir el número de poblaciones de un organismo, o hacer que el organismo sea sustancialmente incapaz de causar daño. Con respecto a un biofilm, el control puede referirse además a interrumpir la formación de biofilms, y/o desmantelar un biofilm existente.

Como se usa en este documento, el término "bacterias biocorrosivas" o "microorganismo biocorrosivo" significa cualquier agrupación taxonómica de bacterias (o microorganismos) que se sabe contribuyen a la corrosión microbiana ("MIC") de materiales metálicos y/o no metálicos. Los ejemplos no limitantes incluyen quimioautótrofos, bacterias reductoras de sulfato, bacterias oxidantes de hierro, bacterias oxidantes de azufre, bacterias reductoras de nitrato, metanógenos y bacterias productoras de ácido. Estas bacterias pueden reducir el metal directamente, generar productos metabólicos que son corrosivos (e.g., gas de sulfuro de hidrógeno) y/o provocar la formación de biopelículas que pueden alterar el entorno local para promover la corrosión.

Como se usa en el presente documento, la frase "mejorar la calidad" en referencia a la calidad del petróleo y/o gas puede incluir reducir la conversión de petróleo dulce y gas en petróleo ácido y gas, aumentando la conversión de petróleo y gas ácidos en petróleo dulce y gas, preservando el dulzor del petróleo y el gas, reduciendo la concentración de compuestos que contienen azufre, como el sulfuro de hidrógeno y los mercaptanos en el petróleo y/o el gas (ya sea dentro del pozo o fuera del pozo, e.g., en un tanque de almacenamiento), e inhibiendo el crecimiento de la SRB y otras bacterias biocorrosivas en el petróleo y el gas.

Composiciones para la Reducción de Sulfuro de Hidrógeno y Mercaptanos.

La presente invención proporciona usos ventajosos para microbios, así como los subproductos de su crecimiento, tales como biosurfactantes. En ciertas implementaciones, la presente invención proporciona productos basados en microbios, así como sus usos en la producción de petróleo mejorado. En implementaciones específicas, los métodos y composiciones descritos aquí utilizan microorganismos y/o sus subproductos de crecimiento para mejorar la calidad del petróleo y el gas, mejorar la integridad del equipo usado para producir petróleo y gas, y mejorar la recuperación de petróleo y gas de una formación.

En implementaciones preferidas de la presente invención, se proporcionan una primera y una segunda composiciones para reducir el H_2S y los mercaptanos, y controlar las bacterias biocorrosivas presentes en entornos de producción de petróleo y gas natural. Debido a la reducción de las concentraciones de H_2S, las composiciones pueden prevenir, reducir y/o eliminar aún más la corrosión y el deterioro de los equipos y estructuras en los que crecen las bacterias biocorrosivas, particularmente las que están hechas de metal. En una implementación específica, las composiciones se pueden usar para reducir la MIC

y el deterioro del equipo y las estructuras utilizadas para la producción de petróleo y gas natural.

En implementaciones preferidas, la primera composición comprende una mezcla antimicrobiana de biosurfactante, un agente quelante y uno o más eliminadores de H_2S.

En algunas implementaciones, la mezcla antimicrobiana de biosurfactante comprende uno o más biosurfactantes. Preferiblemente, el uno o más biosurfactantes comprenden al menos un glicolípido y al menos un lipopéptido. Ventajosamente, los biosurfactantes se pueden usar en concentraciones relativamente bajas para inhibir el crecimiento de bacterias, incluidas las bacterias Gramnegativas y Grampositivas.

Los biosurfactantes son un grupo estructuralmente diverso de sustancias tensoactivas producidas por microorganismos. Todos los biosurfactantes son anfifilos. Se componen de dos partes: un grupo polar (hidrófilo) y un grupo no polar (hidrófobo). Debido a su estructura anfifílica, los biosurfactantes aumentan el área de superficie de las sustancias hidrófobas insolubles en agua, aumentan la biodisponibilidad del agua de dichas sustancias y cambian las propiedades de las superficies de las células bacterianas.

Los biosurfactantes se acumulan en las interfaces, lo que reduce la tensión interfacial y conduce a la formación de estructuras micelulares agregadas en solución. La capacidad de los biosurfactantes para formar poros y desestabilizar las membranas biológicas permite su uso como agentes antibacterianos, antifúngicos y hemolíticos. Combinados con las características de baja toxicidad y biodegradabilidad, los biosurfactantes son ventajosos para uso en

la industria del petróleo y el gas como inhibidores efectivos del crecimiento de la SRB y una reducción resultante de la producción de sulfuro de hidrógeno.

Los biosurfactantes incluyen glicolípidos de bajo peso molecular, lipopéptidos, flavolípidos, fosfolípidos y polímeros de alto peso molecular tales como lipoproteínas, complejos de lipopolisacáridos-proteínas y complejos de polisacáridos-proteínas-ácidos grasos. La cadena de hidrocarburo de un ácido graso actúa como el resto lipófilo común de una molécula de biosurfactante, mientras que la parte hidrófila está formada por grupos éster o alcohol de lípidos neutros, por el grupo carboxilato de ácidos grasos o aminoácidos (o péptidos), ácido orgánico en el caso de los flavolípidos, o, en el caso de los glicolípidos, por el carbohidrato.

Los biosurfactantes microbianos son producidos por una variedad de microorganismos, como bacterias, hongos y levaduras. Los microorganismos productores de biosurfactante de ejemplo incluyen *Pseudomonas* spp. (*P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. florescens*, *P. fragi*, *P. syringae*); *Pseudozyma* spp. (*P. aphidis*); *Flavobacterium* spp.; *Pichia* spp. (*P. anomala, P. lynferdii, P. guilliermondii, P. sydowiorum*), *Bacillus* spp. (*B. subtilis, B. amyloliquefaciens, B. pumillus, B. cereus, B. licheniformis*); *Wickerhamomyces* spp. (*W. anomalus*); *Starmerella* spp. (*S. bombicola*); *Candida* spp. (*C. albicans, C. rugosa, C. tropicalis, C. lipolytica, C. torulopsis*); *Rhodococcus* spp.; *Arthrobacter* spp.; *Campylobacter* spp.; *Cornybacterium* spp., y muchos otros. Los biosurfactantes pueden obtenerse mediante procesos de fermentación conocidos en el arte.

En algunas implementaciones, los biosurfactantes usados en la mezcla antimicrobiana incluyen glicolípidos como los ramnolípidos (RLP), los

soporolípidos (SLP), los lípidos de la trehalosa o los lípidos de manosileritritol (MEL).

En ciertas implementaciones, el uno o más biosurfactantes pueden incluir uno o más glicolípidos tales como, por ejemplo, soporolípidos, ramnolípidos, o una combinación de los mismos.

En algunas implementaciones, la mezcla de biosurfactante antimicrobiano comprende además un biosurfactante lipopéptido, por ejemplo, surfactina o liquenisina. Varias bacterias *Bacillus* son capaces de producir lipopéptidos, como *B. subtilis, B. licheniformis y B. amyloliquefaciens*, entre otros.

La surfactina en particular es una de una serie de biosurfactantes lipopéptidos denominados porens. Tiene propiedades antimicrobianas, antivirales, antifúngicas y, en particular, sus efectos antibacterianos en bacterias Grampositivas y Gramnegativas. Por lo tanto, el uso de surfactina amplía el espectro de la actividad antimicrobiana para incluir bacterias Gramnegativas. La surfactina se puede obtener a partir de procesos de fermentación conocidos en el arte.

En algunas implementaciones, los biosurfactantes de la primera composición están en forma purificada. En otras implementaciones, los biosurfactantes se producen *in situ* por microorganismos presentes en el sitio de aplicación.

Los biosurfactantes se pueden usar para inhibir el crecimiento de bacterias en concentraciones relativamente bajas. En implementaciones preferidas, la concentración total de biosurfactante utilizada en la composición objeto es de 1,000 ppm a 3,000 ppm o más. En una implementación específica, la concentración de biosurfactante es de aproximadamente 2,500 ppm.

La mezcla de biosurfactantes utilizada en la presente invención puede formularse utilizando cualquier número de combinaciones y proporciones. En ciertas implementaciones, la mezcla de biosurfactante comprende SLP, RLP y surfactina. En una implementación, la mezcla de biosurfactante comprende SLP en una proporción del 30% al 90% de la mezcla. En una implementación, la mezcla de biosurfactante comprende RLP en una proporción del 10% al 60% de la mezcla. En una implementación, la mezcla de biosurfactante comprende surfactina en una proporción de 2% a 40% de la mezcla. En una implementación, la mezcla de biosurfactante comprende SLP, RLP y surfactina en una proporción de 60/30/10%. En otra implementación, la mezcla de biosurfactante comprende SLP, RLP y surfactina en una proporción de 40/40/20%. En implementaciones preferidas, la mezcla de biosurfactante comprende SLP, RLP y surfactina en una proporción de 15:1:1.

En algunas implementaciones, la composición comprende además un agente quelante o quelante. Como se usa en este documento, "quelante" o "agente quelante" significa un agente activo capaz de eliminar un ión metálico de un sistema formando un complejo de modo que el ión metálico no pueda participar o catalizar fácilmente la formación de radicales de oxígeno.

Los ejemplos de agentes quelantes adecuados para la presente invención incluyen, pero no se limitan a, ácido dimercaptosuccínico (DMSA), ácido 2,3-dimercaptopropanosulfónico (DMPS), ácido alfa lipoico (ALA), tetrahidrofurfuril disulfuro de tiamina (TTFD), penicilamina, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), y ácido cítrico.

Ventajosamente, el agente quelante aumenta la eficacia de la mezcla de biosurfactante antimicrobiano modificando las paredes celulares de, por ejemplo,

bacterias gramnegativas, para ser más susceptibles al tratamiento con surfactante. En consecuencia, la capacidad de permear las bacterias gramnegativas amplía el espectro de las capacidades antimicrobianas para la presente invención.

El agente quelante se puede agregar a la composición en cantidades de hasta 5 g/L o más. En implementaciones específicas, el agente quelante es EDTA a una concentración de aproximadamente 4 g/L a aproximadamente 5 g/L.

En algunas implementaciones, la composición comprende además uno o más eliminadores de H_2S. Tal como se usa en el presente documento, "eliminador de sulfuro de hidrógeno" se refiere a cualquier producto químico que puede reaccionar con una o más especies que contienen azufre, incluidos los mercaptanos, y puede convertirlo en una forma más inerte. La eliminación efectiva se basa en lograr una reacción química completa e irreversible entre el eliminador y una o más especies que contienen azufre.

El uno o más eliminadores de H_2S utilizados en la composición objeto pueden ser, por ejemplo, soluciones de nitrato o nitrito. En ciertas implementaciones, los eliminadores de H_2S se seleccionan de sales de glioxal y nitrato o nitrito, que incluyen, entre otros, nitrato de sodio, nitrito de sodio, nitrato de amonio, nitrito de amonio, nitrato de potasio y nitrito de potasio. En implementaciones específicas, el eliminador de H_2S es 5 g/L de nitrato de potasio y/o 5 g/L de nitrato de sodio y/o 5 g/L de glioxal.

En una implementación, la potencia de los efectos antimicrobianos de la primera composición puede mejorarse aún más mediante la adición de una o más sustancias biológicas naturales con propiedades antimicrobianas conocidas, incluidas las propiedades antimicrobianas contra microorganismos gramnegativos.

En una implementación, la sustancia biológica natural puede comprender nisina, un polipéptido antimicrobiano obtenido mediante el cultivo de *Lactococcus lactis*. La concentración total de nisina incluida en la primera composición puede ser de al menos 200 ppm, 250 ppm, 300 ppm o más.

En una implementación, la sustancia biológica natural es la citronela (extracto de hierba de limón). La citronela es una sustancia económica y derivada de las plantas que se puede usar para suprimir las bacterias Gramnegativas y Grampositivas, así como algunos hongos y levaduras. La concentración total de citronela incluida en la primera composición puede ser de aproximadamente 30 ppm a aproximadamente 100 ppm, más preferible de aproximadamente 50 ppm.

En una implementación, la primera composición puede comprender cualquier número de biosurfactantes, quelantes, sustancias antimicrobianas naturales y eliminadores de sulfuro de hidrógeno descritos anteriormente, en cualquier combinación, de modo que se pueda controlar el espectro más amplio posible de bacterias biocorrosivas y se pueda reducir la mayor cantidad de sulfuro de hidrógeno y los mercaptanos.

En una implementación, se proporciona una segunda composición, que comprende un microorganismo capaz de superar a la SRB residual para fuentes de energía y carbono comunes, por ejemplo, una bacteria reductora de nitrógeno, suprimiendo así el recrecimiento de la SRB; y, opcionalmente, fuentes de nutrientes para asegurar el crecimiento efectivo de microorganismos en condiciones anaeróbicas.

En una implementación, el microorganismo usado en la segunda composición comprende una cepa de *Bacillus* capaz de producir biosurfactantes

lipopéptidos, por ejemplo, *B. subtilis, B. licheniformis, B. firmus, B. laterosporus, B. megaterium* y/o *B. amyloliquefaciens*. Preferiblemente, la cepa de *Bacillus* se selecciona de *Bacillus subtilis var. Locuses* cepas B1 y/o B2, que son productores efectivos de surfactina.

En una implementación, B1 y/o B2 sirven como bacterias reductoras de nitrato ("NRB"). En implementaciones preferidas, la concentración de crecimiento estable inicial de B1 y/o B2 dentro de la segunda composición está entre 10^5 y 10^7 UFC/ml. Incluso más preferiblemente, la concentración inicial de crecimiento estable de B1 y/o B2 es de al menos 10^6 UFC/ml de la segunda composición.

En algunas implementaciones, las cepas de *Bacillus* usadas de acuerdo con la presente invención son capaces de prosperar en condiciones de bajo oxígeno y/o alto contenido de sal. Así, en algunas implementaciones, la cepa de *Bacillus* se cultiva en condiciones anaeróbicas.

El uso de otras especies de *Bacillus*, como *B. licheniformis*, que produce liquenisina, y *B. amyloliquefaciens*, que produce lipopéptidos cíclicos y fengicina, también se contempla en la presente invención.

En una implementación, la segunda composición comprende además fuentes de nutrientes, que incluyen, entre otros, nitritos, nitratos, fósforo, magnesio, fuentes de proteínas y/o carbono.

En una implementación, las fuentes de nutrientes se agregan a la segunda composición de la siguiente manera: aproximadamente 1,0 a aproximadamente 10 g/L de NH_4NH_3; al menos 0,5 g/L de $\underline{KNO_3}$; al menos 0,2 g/L de Mg $(NO_3)_2$; y aproximadamente 2,0 a aproximadamente 6,0 g/L de un carbohidrato, tal como melaza o glucosa, y 0,1-0,5 g/L de extracto de levadura.

En una implementación, la segunda composición comprende además una o más sustancias para mejorar la germinación del microorganismo. Es decir, la activación y/o la esporulación de los microbios se puede mejorar agregando cantidades micromolares de L-alanina, manganeso, L-valina y L-asparagina o cualquier otro potenciador de germinación conocido a la segunda composición.

De acuerdo con la presente invención, pueden usarse otras cepas microbianas que incluyen, por ejemplo, otras cepas bacterianas capaces de acumular cantidades significativas de, por ejemplo, glicolípidos y/o lipopéptidos-biosurfactantes. Por ejemplo, las cepas de *Bacillus* se pueden usar solas, o en combinación con otro microorganismo, como una bacteria *Pseudomonas* clado. *Pseudomonas* aeruginosa, por ejemplo, es un productor efectivo de ramnolípidos.

Otros biosurfactantes útiles de acuerdo con la presente invención incluyen manoproteínas, beta-glucano y otros metabolitos que tienen propiedades bioemulsionantes y reductoras de la tensión en la superficie/interfacial.

Ventajosamente, en una implementación, las composiciones y métodos objeto se pueden usar para evitar que las especies SRB en entornos de producción de petróleo y gas y formaciones de petróleo y gas desarrollen resistencia a los tratamientos antibacterianos.

Ventajosamente, las presentes composiciones se pueden usar sin liberar grandes cantidades de compuestos inorgánicos en el medio ambiente. Además, las composiciones utilizan componentes que son biodegradables y toxicológicamente seguros. Por lo tanto, la presente invención se puede utilizar en

todas las operaciones de producción de petróleo y gas como un tratamiento "verde".

Bacterias reductoras de azufre y MIC

En una implementación, la composición se puede usar para controlar la SRB y otras bacterias biocorrosivas. En una implementación, las bacterias biocorrosivas están en forma de un biofilm.

Muchas SRB pertenecen a las phylum *Proteobacterias*. De ellas, un grupo de anaerobios obligados se encuentran dentro de la clase *Deltaproteobacteria*. Este grupo incluye *Desulfuromonas, Desulfurella, Geobacter* y *Pelobacter*. Otras clases de Proteobacterias comprenden microaerófilos, que incluyen *Wolinella, Campylobacter, Shewanella, Sulphurospirillum* y *Geospirillum bamesi*.

Muchas otras SRB pertenecen a arqueas de una clase filogenéticamente diversa y pertenecen (pero no se limitan) a los siguientes órdenes: *Thermococcales, Thermoproteales, Pyrodictales* y *Sulfolobales*. Además, las SRB se encuentran en varias otras líneas filogenéticas. Actualmente, se conocen 60 géneros que contienen más de 220 especies de SRB.

En ciertas implementaciones, las composiciones de la presente invención pueden tener propiedades antimicrobianas de amplio espectro, lo que significa que pueden usarse para controlar bacterias tanto Grampositivas como Gramnegativas, así como otros microorganismos biocorrosivos. Otros ejemplos de microorganismos que pueden ser controlados por la presente composición, que son responsables de los procesos de deterioro en el gas natural y el petróleo y que se han aislado del equipo de petróleo, agua salada, petróleo y gas incluyen,

entre otros, los siguientes: Methanobacterium curvum, Methanocalculus halotolerans, Methanoculleus spp., Methanofollis spp. (e.g., M. liminatans), Methanosarcina spp. (e.g., M. barkeri, M. siciliae), Methanospirillum hungatei, Anaerobaculum mobile, Thermodesulfovibrio yellowstonii, Desulfovibrio spp. (e.g., D. vulgaris), Thermotoga spp. (e.g., T. hypogea, T. neapaitan), Clostridium spp. (e.g., C. sporogenes, C. bifermentas, C. celerecrescens), Desulfotomaculum spp. (e.g., D. kuznetsorii), Desulfovibrio desulfuricans, Citrobacter freundii, Cetobacterium somerae, Klebsiella pneumonia, Acinetobacter spp. (e.g., A. junii), E. coli y Staphylococcus auriculari.

En una implementación, la composición puede inhibir la producción de H_2S por parte de la SRB y otra bacteria biocorrosiva controlando las bacterias biocorrosivas. En otra implementación, la composición puede reducir la concentración de sulfuro de hidrógeno presente en una formación que contiene petróleo o en un equipo de producción de petróleo.

Cultivo de microorganismos

En algunas implementaciones, se proporcionan métodos para cultivar microorganismos y/o producir sus subproductos de crecimiento, por ejemplo, biosurfactantes, para uso en las composiciones y métodos objeto. Los microorganismos cultivados según la presente invención pueden ser bacterias formadoras de esporas. Estos microorganismos pueden ser naturales, o microorganismos genéticamente modificados. Por ejemplo, los microorganismos pueden transformarse con genes específicos para exhibir características específicas. Los microorganismos también pueden ser mutantes de una cepa deseada. Los procedimientos para hacer mutantes son bien conocidos en el arte

microbiológico. Por ejemplo, la luz ultravioleta y la nitrosoguanidina se utilizan ampliamente para este fin.

En implementaciones preferidas, los microorganismos son bacterias, incluyendo bacterias Grampositivas y Gramnegativas. Las bacterias pueden ser, por ejemplo, *Bacillus* (e.g., B. subtilis, B. licheniformis, B. firmus, B. laterosporus, B. megaterium, B. amyloliquifaciens), Clostridium (e.g., C. butyricum, C. tyrobutyricum, C. Acetobutyricum, Clostridium NIPER 7 y C. beijerinckii), Azobacter (e.g., A. vinelandii, A. chroococcum), *Pseudomonas* (e.g., P. chlororaphis subsp. aureofaciens (Kluyver), P. aeruginosa), *Agrobacterium radiobacter, Azospirillumbrasiliensis, Rhizobium, Sphingomonas paucimobilis, Ralslonia eulropha,* y/o *Rhodospirillum rubrum*.

En implementaciones específicas, el microbio es una cepa de *Bacillus* capaz de producir biosurfactantes lipopéptido, por ejemplo, B*. subtilis, B. licheniformis, B. firmus, B. laterosporus, B. megaterium y/o B. amyloliquefaciens*. Preferiblemente, la cepa de *Bacillus* se selecciona de *Bacillus subtilis var. Locuses* cepas B1 y/o B2, que son productores efectivos de surfactina.

El uso de otras especies de *Bacillus*, como *B. licheniformis*, que produce liquenisina, y *B. amyloliquefaciens*, que produce lipopéptidos cíclicos y fengicina, también se contempla en la presente invención.

En una implementación, el microbio es una cepa no patógena de *Pseudomonas*, tal como, e.g., *P. aeruginosa*. Preferiblemente, la cepa de *Pseudomonas* es un productor de biosurfactantes ramnolipidos (RLP).

La presente invención utiliza métodos para el cultivo de microorganismos y la producción de metabolitos microbianos y/u otros subproductos del crecimiento microbiano. La presente invención utiliza además procesos de cultivo que son

adecuados para el cultivo de microorganismos y la producción de metabolitos microbianos a una escala deseada. Los sistemas de cultivo microbiano típicamente usarían fermentación de cultivo sumergido; sin embargo, también se pueden utilizar sistemas de cultivo de superficie e híbridos. Como se usa en este documento, "fermentación" se refiere al crecimiento de células en condiciones controladas. El crecimiento podría ser aeróbico o anaeróbico.

En una implementación, las composiciones de acuerdo con la presente invención se obtienen a través de procesos de cultivo que van desde escalas pequeñas a grandes. Estos procesos de cultivo incluyen, pero no se limitan a, cultivo sumergido, cultivo en superficie, fermentación en estado sólido (SSF) y combinaciones de los mismos.

En una implementación, la presente invención proporciona materiales y métodos para producir un biosurfactante mediante el cultivo de una cepa microbiana de la presente invención en condiciones apropiadas para el crecimiento y la producción de biosurfactante; y purificando el biosurfactante. La presente invención también proporciona métodos para producir enzimas u otros metabolitos mediante el cultivo de una cepa microbiana de la presente invención en condiciones apropiadas para el crecimiento y la expresión de metabolitos; y purificando la enzima u otro metabolito.

En una implementación, la presente invención proporciona materiales y métodos para la producción de biomasa (e.g., material celular viable), metabolitos extracelulares (e.g., moléculas pequeñas y proteínas excretadas), nutrientes residuales y/o componentes intracelulares (e.g., enzimas y otras proteínas).

El recipiente de crecimiento microbiano utilizado de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier fermentador o reactor de cultivo para uso industrial. En una implementación, el recipiente puede tener controles/sensores funcionales o puede estar conectado a controles/sensores funcionales para medir factores importantes en el proceso de cultivo, tales como pH, oxígeno, presión, temperatura, potencia del eje del agitador, humedad, viscosidad y/o densidad microbiana y/o concentración de metabolitos.

En una implementación adicional, el recipiente también puede controlar el crecimiento de microorganismos dentro del recipiente (e.g., la medición del número de células y las fases de crecimiento). Alternativamente, se puede tomar una muestra diaria del recipiente y someter a enumeración mediante técnicas conocidas en el arte, como la técnica de recubrimiento por dilución. El recubrimiento por dilución es una técnica simple que se utiliza para estimar el número de bacterias en una muestra. La técnica también puede proporcionar un índice mediante el cual se pueden comparar diferentes entornos o tratamientos.

En una implementación, el método incluye complementar el cultivo con una fuente de nitrógeno. La fuente de nitrógeno puede ser, por ejemplo, nitrato de potasio, nitrato de amonio, sulfato de amonio, fosfato de amonio, amoníaco, urea y/o cloruro de amonio. Estas fuentes de nitrógeno se pueden usar independientemente o en una combinación de dos o más.

El método de cultivo puede proporcionar oxigenación al cultivo en crecimiento. Una implementación utiliza el movimiento lento del aire para eliminar el aire que contiene poco oxígeno e introducir aire oxigenado. El aire oxigenado se puede complementar diariamente con aire ambiente mediante mecanismos que incluyen impulsores para la agitación mecánica del líquido, y rociadores de aire

para suministrar burbujas de gas al líquido para la disolución del oxígeno en el líquido.

El método puede comprender además complementar el cultivo con una fuente de carbono. La fuente de carbono es típicamente un carbohidrato, tal como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, trehalosa, manosa, manitol y/o maltosa; ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido fumárico, ácido cítrico, ácido propiónico, ácido málico, ácido malónico y/o ácido pirúvico; alcoholes tales como etanol, propanol, butanol, pentanol, hexanol, isobutanol y/o glicerol; grasas y aceites tales como aceite de soya, aceite de salvado de arroz, aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de sésamo y/o aceite de linaza. Estas fuentes de carbono pueden usarse independientemente o en una combinación de dos o más.

En una implementación, los factores de crecimiento y nutrientes traza para microorganismos están incluidos en el medio. Esto es particularmente preferido cuando se cultivan microbios que son incapaces de producir todas las vitaminas que requieren. Los nutrientes inorgánicos, incluidos los elementos traza como hierro, zinc, cobre, manganeso, molibdeno y/o cobalto también pueden incluirse en el medio. Además, se pueden incluir fuentes de vitaminas, aminoácidos esenciales y microelementos, por ejemplo, en forma de harinas o alimentos, como harina de maíz, o en forma de extractos, como extracto de levadura, extracto de papa, extracto de carne, extracto de soya, extracto de cáscara de plátano y similares, o en formas purificadas. También pueden incluirse aminoácidos tales como, por ejemplo, los útiles para la biosíntesis de proteínas, e.g., L-alanina.

En una implementación, también se pueden incluir sales inorgánicas. Las sales inorgánicas utilizables pueden ser dihidrógeno fosfato de potasio, fosfato de hidrógeno dipotásico, fosfato de hidrógeno disódico, sulfato de magnesio, cloruro de magnesio, sulfato de hierro, cloruro de hierro, sulfato de manganeso, cloruro de

manganeso, sulfato de zinc, cloruro de plomo, sulfato de cobre, cloruro de calcio, carbonato de calcio. y/o carbonato de sodio. Estas sales inorgánicas se pueden usar independientemente o en una combinación de dos o más.

En algunas implementaciones, el método para el cultivo puede comprender además añadir ácidos y/o antimicrobianos adicionales en el medio líquido antes y/o durante el proceso de cultivo. Los agentes antimicrobianos o antibióticos se utilizan para proteger el cultivo contra la contaminación. Además, también se pueden agregar agentes antiespumantes para prevenir la formación y/o acumulación de espuma cuando se produce gas durante el cultivo.

El pH de la mezcla debe ser adecuado para el microorganismo de interés. Se pueden usar búfer y reguladores de pH, como carbonatos y fosfatos, para estabilizar el pH cerca de un valor preferido. Cuando los iones metálicos están presentes en altas concentraciones, puede ser necesario el uso de un agente quelante en el medio líquido.

El método y el equipo para el cultivo de microorganismos y la producción de los subproductos microbianos se pueden realizar en un proceso discontinuo, casi continuo o continuo.

Los microbios se pueden cultivar en forma planctónica o como biopelícula. En el caso de la biopelícula, el recipiente puede tener dentro un sustrato sobre el cual los microbios pueden crecer en un estado de biopelícula. El sistema también puede tener, por ejemplo, la capacidad de aplicar estímulos (como la tensión de cizallamiento) que estimulan y/o mejoran las características de crecimiento de la biopelícula.

En una implementación, el método para el cultivo de microorganismos se lleva a cabo a aproximadamente 5° a aproximadamente 100°C, preferiblemente,

15 a 60°C, más preferiblemente 25 a 50°C. En una implementación adicional, el cultivo puede llevarse a cabo continuamente a una temperatura constante. En otra implementación, el cultivo puede estar sujeto a temperaturas cambiantes.

En una implementación, el equipo utilizado en el método y el proceso de cultivo es estéril. El equipo de cultivo tal como el reactor/recipiente puede estar separado de, pero conectado a, una unidad de esterilización, e.g., una autoclave. El equipo de cultivo también puede tener una unidad de esterilización que esteriliza in situ antes de comenzar la inoculación. El aire se puede esterilizar por métodos conocidos en el arte. Por ejemplo, el aire ambiente puede pasar a través de al menos un filtro antes de introducirse en el recipiente. En otras implementaciones, el medio se puede pasteurizar u opcionalmente, no se puede añadir calor, donde se puede aprovechar el uso de una baja actividad de agua y un bajo pH para controlar el crecimiento bacteriano.

El contenido de biomasa del caldo de fermentación puede ser, por ejemplo, de 5 g/l a 180 g/l o más. En una implementación, el contenido de sólidos del caldo es de 10 g/l a 150 g/l.

En una implementación, la presente invención proporciona además un método para producir metabolitos microbianos tales como etanol, ácido láctico, beta-glucano, proteínas, péptidos, intermedios metabólicos, ácido graso poliinsaturado y lípidos. El contenido de metabolito producido por el método puede ser, por ejemplo, al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90%.

El subproducto de crecimiento microbiano producido por microorganismos de interés puede retenerse en los microorganismos o secretarse en el medio líquido. En otra implementación, el método para producir subproductos de crecimiento microbiano, tales como biosurfactantes, puede comprender además etapas de concentración y purificación del subproducto de crecimiento microbiano

de interés. En una implementación adicional, el medio líquido puede contener compuestos que estabilizan la actividad del subproducto de crecimiento microbiano.

En una implementación, toda la composición de cultivo microbiano se elimina al finalizar el cultivo (e.g., al lograr, por ejemplo, una densidad de esporas deseada, o densidad de un metabolito específico en el caldo). En este procedimiento de lote, se inicia un lote completamente nuevo después de la recolección del primer lote.

En otra implementación, solo una parte del producto de fermentación se elimina en un momento dado. En esta implementación, la biomasa con células viables permanece en el recipiente como inoculante para un nuevo lote de cultivo. La composición que se elimina puede ser un caldo sin células o contener células. De esta manera, se crea un sistema casi continuo.

Ventajosamente, el método no requiere equipos complicados o un alto consumo de energía. Los microorganismos de interés pueden cultivarse en pequeña o gran escala en el sitio. De manera similar, los metabolitos microbianos u otros subproductos también pueden producirse en grandes cantidades en el sitio de necesidad.

Ventajosamente, los productos basados en microbios pueden producirse en ubicaciones remotas. Las instalaciones de crecimiento de microbios pueden operar fuera de la red utilizando, por ejemplo, energía solar, eólica y/o hidroeléctrica.

Preparación de productos con base en microbios

Un producto a base de microbios de la presente invención es simplemente el caldo de fermentación que contiene el microorganismo y/o los metabolitos

microbianos producidos por el microorganismo y/o cualquier nutriente residual. El producto de la fermentación se puede utilizar directamente sin extracción ni purificación. Si se desea, la extracción y la purificación se pueden lograr fácilmente utilizando métodos o técnicas de extracción y/o purificación estándar descritos en la literatura.

Los microorganismos en el producto a base de microbios pueden estar en forma activa o inactiva. Preferiblemente, los microorganismos están en forma de esporas.

Los productos basados en microbios pueden usarse sin más estabilización, conservación y almacenamiento. Ventajosamente, el uso directo de estos productos basados en microbios preserva una alta viabilidad de los microorganismos, reduce la posibilidad de contaminación por agentes extraños y microorganismos indeseables, y mantiene la actividad de los subproductos del crecimiento microbiano.

Los microbios y/o el caldo resultante del crecimiento microbiano pueden eliminarse del recipiente de crecimiento y transferirse, por ejemplo, a través de tuberías para uso inmediato.

En otras implementaciones, los microbios y/o el caldo se pueden colocar en recipientes del tamaño apropiado, teniendo en cuenta, por ejemplo, el uso previsto, el método de aplicación contemplado, el tamaño del tanque de fermentación y cualquier modo de transporte desde la instalación de crecimiento a la ubicación de uso. Por lo tanto, los contenedores en los que se coloca el producto a base de microbios pueden ser, por ejemplo, de 1 galón a 1,000 galones o más. En otras implementaciones, los contenedores son de 2 galones, 5 galones, 25 galones o más.

Al recolectar los microbios y/o el caldo de los recipientes de crecimiento, se pueden agregar componentes adicionales a medida que el producto cosechado se coloca en contenedores y/o se canaliza (o se transporta para uso). Los aditivos pueden ser, por ejemplo, búfer, portadores, otras composiciones a base de microbios producidos en la misma o diferente instalación, modificadores de la viscosidad, conservantes, nutrientes para el crecimiento de microbios, agentes de rastreo, solventes, biocidas, otros microbios y otros ingredientes específicos para un uso previsto.

Otros aditivos adecuados, que pueden estar contenidos en las formulaciones de acuerdo con la invención, incluyen sustancias que se usan habitualmente para tales preparaciones. Los ejemplos de dichos aditivos incluyen surfactantes, agentes emulsionantes, lubricantes, agentes búfers, agentes de control de la solubilidad, agentes de ajuste del pH, conservantes, estabilizantes y agentes resistentes a la luz ultravioleta.

En una implementación, el producto puede comprender además agentes búfers que incluyen orgánicos y aminoácidos o sus sales. Los búfers adecuados incluyen citrato, gluconato, tartarato, malato, acetato, lactato, oxalato, aspartato, malonato, glucoheptonato, piruvato, galactarato, glucarato, tartronato, glutamato, glicina, lisina, glutamina, metionina, cisteína, arginina y una mezcla de estos. También se pueden usar ácidos fosfóricos y fósforosos o sus sales. Los búfers sintéticos son adecuados para ser usados, pero es preferible usar búfers naturales tales como los orgánicos y los aminoácidos o sus sales enumerados anteriormente.

En una implementación adicional, los agentes de ajuste del pH incluyen hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, carbonato o bicarbonato de potasio, ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico y mezclas de los mismos.

El pH del producto a base de microbios debe ser adecuado para el microorganismo de interés. En una implementación preferida, el pH de la composición a base de microbios varía de 7,0 a 7,5.

En una implementación, se pueden incluir componentes adicionales tales como una preparación acuosa de una sal, e.g., bicarbonato o carbonato de sodio, sulfato de sodio, fosfato de sodio o bifosfato de sodio, en la formulación.

Ventajosamente, de acuerdo con la presente invención, el producto a base de microbios puede comprender caldo en el que se cultivaron los microbios. El producto puede ser, por ejemplo, al menos, en peso, 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75% o 100% de caldo. La cantidad de biomasa en el producto, en peso, puede ser, por ejemplo, entre el 0% y el 100%, incluidos todos los porcentajes entre ellos.

Opcionalmente, el producto puede ser almacenado antes de su uso. El tiempo de almacenamiento es preferiblemente corto. Por lo tanto, el tiempo de almacenamiento puede ser inferior a 60 días, 45 días, 30 días, 20 días, 15 días, 10 días, 7 días, 5 días, 3 días, 2 días, 1 día o 12 horas. En una implementación preferida, si hay células vivas en el producto, el producto se almacena a una temperatura fresca como, por ejemplo, menos de 20°C, 15°C, 10°C o 5°C. Por otro lado, una composición de biosurfactante se puede almacenar típicamente a temperaturas ambiente.

Producción local de productos a base de microbios

En implementaciones preferidas de la presente invención, una instalación de crecimiento de microbios produce microorganismos frescos de alta densidad y/o subproductos de crecimiento microbiano de interés en una escala deseada. La instalación de crecimiento de microbios puede estar ubicada en o cerca del sitio de aplicación. La instalación produce composiciones de alta densidad a base de microbios en cultivo discontinuo, casi continuo o continuo.

Las instalaciones de crecimiento de microbios distribuidos de la presente invención pueden ubicarse en el lugar donde se utilizará el producto a base de microbios. Por ejemplo, la instalación de crecimiento de microbios puede estar a menos de 300, 250, 200, 150, 100, 75, 50, 25, 15, 10, 5, 3 o 1 millas desde la ubicación de uso.

Debido a que el producto a base de microbios se genera localmente, sin recurrir a los procesos de estabilización, conservación, almacenamiento y transporte de microorganismos de la producción microbiana convencional, se puede producir una densidad mucho mayor de células vegetativas, esporas reproductivas, micelios, conidios y/u otros propágulos microbianos, lo que requerirá un volumen menor del producto a base de microbios para uso en la aplicación en el sitio o que permita aplicaciones microbianas de densidad mucho más alta donde sea necesario para lograr la eficacia deseada. Esto permite un biorreactor reducido (e.g., un tanque de fermentación más pequeño y suministros más pequeños de material iniciador, nutrientes, agentes de control de pH y agentes antiespumantes) que hacen que el sistema sea eficiente. La generación local del producto a base de microbios también facilita la inclusión del caldo de

crecimiento en el producto. El caldo puede contener agentes producidos durante la fermentación que son particularmente adecuados para el uso local.

Los cultivos robustos de microbios de alta densidad producidos localmente son más efectivos en el campo que los que se han sometido a la estabilización de las células vegetativas o se han sentado en la cadena de suministro durante algún tiempo. Los productos a base de microbios de la presente invención son particularmente ventajosos en comparación con los productos tradicionales en los que las células se han separado de los metabolitos y nutrientes presentes en los medios de crecimiento de fermentación. Los tiempos de transporte reducidos permiten la producción y entrega de lotes frescos de microbios y/o sus metabolitos en el momento y el volumen según lo requiera la demanda local.

Las instalaciones de crecimiento microbiano de la presente invención producen composiciones frescas a base de microbios, que comprenden los propios microbios, los metabolitos microbianos y/u otros componentes del caldo en el que se cultivan los microbios. Si se desea, las composiciones pueden tener una alta densidad de células vegetativas, células reproductoras, esporas, micelios, conidios o una mezcla de los mismos.

Ventajosamente, las composiciones se pueden adaptar para uso en una ubicación específica. En una implementación, la instalación de crecimiento de microbios está ubicada en, o cerca de, un sitio donde se utilizarán los productos a base de microbios.

Ventajosamente, estas instalaciones de crecimiento de microbios brindan una solución al problema actual de depender de productores industriales de gran tamaño cuya calidad del producto sufre debido a retrasos en el procesamiento

ascendente, cuellos de botella en la cadena de suministro, almacenamiento inadecuado y otras contingencias que impiden la entrega y aplicación oportunas de, por ejemplo, un producto viable, de alto recuento celular y el caldo y los metabolitos asociados en los que las células se cultivan originalmente.

Ventajosamente, en implementaciones preferidas, los sistemas de la presente invención aprovechan el poder de los microorganismos locales naturales y sus subproductos metabólicos para mejorar la producción de petróleo.

El tiempo de cultivo para los vasos individuales puede ser, por ejemplo, de 1 a 7 a 14 días o más. El producto de cultivo puede ser cosechado de varias formas diferentes.

Debido a que el producto a base de microbios se genera en el sitio o cerca del sitio de aplicación, sin el requisito de estabilización, conservación, almacenamiento prolongado y procesos de transporte extensivos de producción convencional, se puede generar una densidad mucho mayor de microorganismos vivos, lo que requiere un volumen mucho más pequeño del producto a base de microbios para uso en una aplicación en el sitio. Esto permite un biorreactor reducido (e.g., un tanque de fermentación más pequeño, suministros más pequeños de material iniciador, nutrientes, agentes de control de pH y agentes antiespumantes, etc.), no hay razón para estabilizar las células o separarlas de su caldo de cultivo y puede facilitar la portabilidad del producto, si lo desea.

Las instalaciones de crecimiento de microbios brindan versatilidad en la fabricación gracias a la capacidad de adaptar los productos a base de microbios para mejorar las sinergias con las geografías de destino.

La producción local y la entrega dentro de, por ejemplo, 24 horas de fermentación dan como resultado composiciones puras de alta densidad celular y costos de envío sustancialmente más bajos. Dadas las perspectivas de un rápido avance en el desarrollo de inoculantes microbianos más efectivos y potentes, los consumidores se beneficiarán enormemente de esta capacidad de entregar rápidamente productos a base de microbios.

Los microbios locales se pueden identificar según, por ejemplo, la tolerancia a la sal, la capacidad de crecer a altas temperaturas.

En una implementación, la composición de acuerdo con la presente invención se obtiene a través de procesos de cultivo que van desde escalas pequeñas (e.g., de laboratorio) a grandes (e.g., industriales). Estos procesos de cultivo incluyen, pero no se limitan a, cultivo sumergido/fermentación, cultivo de superficie, fermentación en estado sólido (SSF) y combinaciones de los mismos.

Métodos para reducir los compuestos que contienen azufre, inhibir la MIC y mejorar la recuperación de petróleo y gas

En una implementación, se proporciona un método de dos fases para mejorar la producción de petróleo y gas natural. Específicamente, los métodos se pueden usar para inhibir la producción de H_2S por parte de SRB y otras bacterias biocorrosivas, así como para reducir la "acidez" del petróleo crudo y el gas, al mismo tiempo que mejoran la recuperación de petróleo y gas. Los métodos pueden utilizarse además para reducir la conversión de petróleo dulce en petróleo y gas, aumentar la conversión de petróleo y gas ácidos en petróleo y gas dulces y/o preservar la dulzura del petróleo y el gas. Los métodos pueden usarse además para reducir el contenido de H_2S y mercaptanos en el petróleo dentro o fuera de un pozo.

En ciertas implementaciones, el método de dos fases se puede usar además para reducir y/o eliminar la corrosión microbiana ("MIC") de los equipos y estructuras utilizadas para la producción de petróleo crudo y gas natural.

En una implementación, la fase uno del método comprende aplicar la primera composición de la invención objeto a una formación que contiene petróleo y gas, por ejemplo, inyectando la primera composición lo más profundamente posible en un pozo; encerrándola en la formación; bombeando la composición; y abriendo la formación para reanudar la recuperación de petróleo y/o gas.

En implementaciones preferidas, la composición utilizada en la fase uno (i.e., la primera composición de la presente invención) comprende una mezcla antimicrobiana de biosurfactante, un agente quelante y uno o más eliminadores de H_2S.

En una implementación, la mezcla de biosurfactante antimicrobiano comprende uno o más biosurfactantes seleccionados de glicolípidos, e.g., soporolípidos, ramnolípidos y/o una combinación de los mismos, y lipopéptidos, e.g., surfactina, liquenisina, fengicina y/o una combinación de los mismos.

En una implementación, el agente quelante es EDTA.

En una implementación, el uno o más eliminadores de H_2S se seleccionan entre sales de glioxal y nitrato o nitrito, que incluyen, entre otros, nitrato de sodio, nitrito de sodio, nitrato de amonio, nitrito de amonio, nitrato de potasio y nitrito de potasio.

En una implementación, la primera composición comprende además una o más sustancias biológicas naturales con propiedades antimicrobianas conocidas, tales como, por ejemplo, nisina y/o citronela (extracto de hierba de limón).

Preferiblemente, la fase uno se lleva a cabo mientras se monitorean continuamente los niveles de sulfuro de hidrógeno dentro de la formación.

En una implementación de la fase uno, la etapa de cierre en la formación se lleva a cabo hasta que el nivel de sulfuro de hidrógeno se reduce a una concentración deseada. Por ejemplo, el período cerrado puede durar de aproximadamente 3 a aproximadamente 60 días, o hasta que los niveles de sulfuro de hidrógeno se reduzcan a una concentración de aproximadamente 0 ppm a aproximadamente 50 ppm, más preferible de aproximadamente 0 ppm a aproximadamente 25 ppm.

La fase uno del método está diseñada como tratamiento inicial para (a) controlar las bacterias biocorrosivas, como SRB, (b) reducir la concentración de H_2S en la formación, y (c) mejorar la recuperación de petróleo y gas de la formación.

En una implementación, la fase dos del método comprende la recuperación de petróleo y/o gas de la formación hasta que se observe un aumento de la concentración de sulfuro de hidrógeno; aplicar la segunda composición de la presente invención a la formación, por ejemplo, inyectándola lo más profundamente posible en el pozo; encerrándola en la formación; y abriendo la formación para reanudar la recuperación de petróleo y/o gas.

Preferiblemente, la fase dos se lleva a cabo mientras se controlan continuamente los niveles de sulfuro de hidrógeno dentro de la formación.

En una implementación, la composición utilizada en la fase dos (i.e., la segunda composición de la presente invención) comprende un microorganismo capaz de superar a la SRB residual para fuentes de carbono y energía comunes, suprimiendo así el recrecimiento de la SRB; y, opcionalmente, fuentes de nutrientes para asegurar el crecimiento efectivo del cultivo microbiano en condiciones anaeróbicas, incluidas, entre otras, nitritos, nitratos, fósforo, magnesio, fuentes de proteínas y/o carbono.

En una implementación, las fuentes de nutrientes se incluyen en la segunda composición de la siguiente manera: aproximadamente 1,0 a aproximadamente 10 g/L de NH_4NH_3; al menos 0,5 g/L de KNO_3; al menos 0,2 g/L de Mg $(NO_3)_2$; y aproximadamente 2,0 a aproximadamente 6,0 g/L de un carbohidrato, tal como melaza o glucosa, y 0,1-0,5 g/L de extracto de levadura.

Preferiblemente, el microorganismo de la segunda composición está en forma de espora. Por consiguiente, en una implementación, la segunda composición puede comprender sustancias para mejorar la germinación de esporas, tales como, por ejemplo, L-alanina y/o manganeso.

En una implementación, el microorganismo de la segunda composición es una cepa de bacterias productora de biosurfactantes formadora de esporas. En implementaciones preferidas, las bacterias pueden introducirse como bacterias reductoras de nitrato ("NRB").

En una implementación, la bacteria es una especie de *Bacillus* clade. En implementaciones preferidas, las bacterias de la segunda composición son una

cepa de *Bacillus subtilis*. Incluso más específicamente, el *Bacillus subtilis* puede ser *B. subtilis var. localiza* las cepas B1 y/o B2, que son productores efectivos del lipopéptido surfactina.

En una implementación, la bacteria es una cepa de *Pseudomonas*, tal como, por ejemplo, *P. aeruginosa. La P. aeruginosa* es un productor efectivo de biosurfactantes ramnolipidos.

En una implementación, la segunda composición comprende una combinación de una bacteria de *Bacillus* clade y una bacteria de *Pseudomonas* clade.

En una implementación, las esporas bacterianas germinan y se multiplican mientras producen biosurfactantes, como surfactina y/o ramnolípido, *in situ*. Por lo tanto, la fase dos, mejora los métodos al ampliar el espectro de las capacidades antimicrobianas a las bacterias Grampositivas y Gramnegativas. Como resultado, también se mejora la recuperación de petróleo crudo y gas natural a partir de formaciones que contienen petróleo y gas.

En una implementación, el aumento de la concentración de sulfuro de hidrógeno que se observa antes de la aplicación de la segunda composición en la fase dos es un aumento de aproximadamente 1 ppm a aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 100 ppm, o más, por encima de la concentración más baja observada. En una implementación, el aumento de la concentración de sulfuro de hidrógeno que se observa antes de la aplicación de la segunda composición es cualquier aumento que lleve la concentración de sulfuro de hidrógeno a un nivel de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 ppm, o más.

En una implementación de la fase dos, la etapa de cierre en la formación se lleva a cabo hasta que el nivel de sulfuro de hidrógeno se reduce a una concentración deseada. Por ejemplo, el período cerrado puede durar de aproximadamente 3 a aproximadamente 60 días, o hasta que los niveles de sulfuro de hidrógeno se reduzcan a una concentración de aproximadamente 0 ppm a aproximadamente 50 ppm, más preferible de aproximadamente 0 ppm a aproximadamente 25 ppm.

La fase dos del método está diseñada para repoblar el pozo y/o el reservorio con bacterias beneficiosas que pueden superar y sobrepasar cualquier SRB restante. La fase dos también puede servir para estabilizar y prolongar los efectos antimicrobianos y reductores de sulfuro de hidrógeno de la fase uno, por ejemplo, evitando que cualquier SRB restante se multiplique. Por lo tanto, la fase dos, mejora aún más el control de las bacterias biocorrosivas, la reducción de la concentración de sulfuro de hidrógeno y la recuperación de petróleo y gas.

En una implementación del método objeto, solo la fase uno se emplea sin la fase dos. En una implementación, la fase dos se emplea sin la fase uno de antemano. En otras palabras, si se determina que se ha producido una reducción suficiente de sulfuro de hidrógeno con el uso de la fase uno sola, la fase dos se puede omitir o retrasar opcionalmente, hasta que se determine que los niveles de sulfuro de hidrógeno están aumentando y/o esté ocurriendo una disminución en la recuperación de petróleo.

En ciertas implementaciones, la primera y/o la segunda composiciones se pueden aplicar en una cantidad que varía de 50 BBL a 1,000 BBL a 10,000 BBL, dependiendo de la cantidad de sulfuro de hidrógeno presente. En

implementaciones preferidas, las composiciones, primera y/o segunda se aplican en un intervalo entre 50 y 1,000 BBL.

En una implementación, se realiza una etapa para determinar la cantidad de sulfuro de hidrógeno (e.g., en ppm) presente en la formación antes de la fase uno y/o la fase dos del método en cuestión, seguido de una etapa para determinar el volumen necesario de la composición del tratamiento.

La aplicación de las composiciones de la presente invención se puede realizar durante las operaciones de perforación (e.g., mientras se perfora, mientras se dispara o se sale del orificio, mientras que el lodo circula, mientras se cubre, mientras se coloca un revestimiento de producción, y/o mientras se cementación, etc.), y/o como un tratamiento de producción. La aplicación puede comprender el bombeo durante 1 hora, 5 horas, 10 horas o más, dependiendo de la cantidad de composición que se aplique.

Además, la aplicación se puede realizar en cualquier equipo de producción de petróleo y gas, por ejemplo, en un pozo, cubierta, anillo, tubería, tanque, línea de flujo y/o separador.

En implementaciones preferidas, el método además comprende, después de completar la fase dos, una etapa de monitorizar continuamente las concentraciones de H_2S en la formación durante cualquier número de días o meses después del tratamiento para asegurar que los niveles de sulfuro de hidrógeno permanezcan controlados. Si los niveles de sulfuro de hidrógeno comienzan a aumentar nuevamente, los métodos se pueden repetir tantas veces como sea necesario.

En una implementación, el método se puede utilizar en configuraciones que no son de pozo para controlar el H_2S y/o los mercaptanos presentes en el petróleo y el gas. Al aplicar la primera y segunda composiciones a petróleo y/o gas fuera de un pozo, por ejemplo, después de la extracción de un pozo o durante el almacenamiento, los microbios de la presente invención pueden secuestrar el H_2S y/o los mercaptanos para que se precipiten como sales.

En una implementación, el contenido de sulfuro de hidrógeno del gas natural, en particular, puede reducirse usando un depurador biológico y las composiciones de la presente invención. Los depuradores biológicos utilizan la fijación microbiana para desulfurar el gas natural. En ciertos depuradores, el gas fluye a través de un recipiente que contiene medios, como una pantalla o una matriz líquida, sobre o en los cuales se alienta el crecimiento de microorganismos, como los de la presente invención. Luego se inyecta aire en el recipiente y el sulfuro de hidrógeno en el gas se oxida por reacciones químicas y biológicas.

Otras definiciones

El término de transición "que comprende", que es sinónimo de "que incluye" o "que contiene", es inclusivo o abierto y no excluye elementos o etapas adicionales del método no citados. Por el contrario, la frase de transición "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en la reivindicación. La frase de transición "que consiste esencialmente en" limita el alcance de una reivindicación a los materiales o etapas especificados "y aquellos que no afectan materialmente a las características básicas y novedosas" de la invención reivindicada.

A menos que se indique específicamente o sea obvio en el contexto, como se usa en el presente documento, el término "o" se entiende que es inclusivo. A menos que se indique específicamente o sea obvio a partir del contexto, como se

usa en este documento, los términos "uno", "una" y "el, la" se entienden como singular o plural.

A menos que se indique específicamente o sea obvio en el contexto, como se usa en este documento, el término "aproximadamente" se entiende dentro de un rango de tolerancia normal en el arte, por ejemplo, dentro de 2 desviaciones estándar de la media. Aproximadamente se puede entender dentro del 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05% o 0,01% del Valor establecido. A menos que se indique lo contrario en el contexto, todos los valores numéricos proporcionados en este documento están modificados por el término aproximadamente de.

La citación de una lista de grupos químicos en cualquier definición de una variable en este documento incluye definiciones de esa variable como cualquier grupo único o combinación de grupos listados. La citación de una implementación para una variable o aspecto en este documento incluye esa implementación como cualquier implementación única o en combinación con cualquier otra implementación o partes de la misma.

Cualquier composición o método proporcionado en este documento puede combinarse con una o más de cualquiera de las otras composiciones y métodos proporcionados en este documento.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción de las implementaciones preferidas de la misma, y de las reivindicaciones. Todas las referencias citadas en este documento se incorporan aquí como referencia.

EJEMPLOS

Se puede tener una mejor comprensión de la presente invención y de sus muchas ventajas a partir de los siguientes ejemplos, dados a modo de ilustración. Los siguientes ejemplos son ilustrativos de algunos de los métodos, aplicaciones, implementaciones y variantes de la presente invención. No deben considerarse como limitantes de la invención. Se pueden hacer numerosos cambios y modificaciones con respecto a la invención.

EJEMPLO 1 — EFECTO DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE BIOSURFACTANTE EN BACTERIAS GRAMPOSITIVAS

Se sembró un césped de *Bacillus subtilis* B1 y B2 grampositivas. Se colocaron 20 µl de soporolípidos al 2% en el centro de la placa y se incubaron durante la noche a 40 °C.

Después del cultivo durante la noche, como se muestra en la FIG. 1, estaba presente una zona clara en el centro del césped, lo que indica que los soporolípidos pueden inhibir eficazmente el crecimiento o matar a *B. subtilis*.

EJEMPLO 2 — PRODUCCIÓN DE *BACILLUS SUBTILIS*

La fermentación de *Bacillus subtilis var*. locuses se puede realizar en un reactor de 500 L con 350 L de un medio nutriente que contiene (g/L):

Glucosa	18
Melasa en Polvo	2
Sacarosa	1
KH_2PO_4	0,5
$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	2,1

KCl	0,1
$MgSO_4$	0,5
$CaCl_2$	0,05
Urea	2,5
NH_4Cl	1,24
Extracto de levadura	2
Peptona de maiz	0,5
TekNova elementos traza (mL)	1

La temperatura de cultivo es de 40°C, la estabilización del pH es de 6,8 a 7,0 y la estabilización de OD es del 30% (la concentración de oxígeno en el aire se toma como 100%). La duración del cultivo es de 24-32 horas. La concentración final del cultivo bacteriano no es inferior a 1×10^9 UFC/ml.

La cantidad de cultivo fabricado por un solo ciclo de fermentación permite la producción de más de 2,000 barriles de formulación de tratamiento final que contiene 10^6 UFC de esta cepa de *Bacillus*.

EJEMPLO 3: REDUCCIÓN COMPLETA DE SULFURO DE HIDRÓGENO EN UN CAMPO PETROLERO UTILIZANDO LA FASE UNO DEL MÉTODO DE DOS FASES

Antes del tratamiento, el nivel de sulfuro de hidrógeno en un pozo medía 400 ppm. Se inyectaron ochenta barriles de un tratamiento que comprendía 60% de SLP, 30% de RLP y 10% de surfactina en el pozo durante aproximadamente 5 horas. Luego se cerró el pozo durante 3 días. Después de reanudar la producción del pozo, los niveles de sulfuro de hidrógeno midieron 0 ppm. Esta es la primera fase del método objeto.

El tratamiento luego se puede complementar con la fase dos, en donde se aplican 1,000 barriles de producto a base de *Bacillus subtilis* (la segunda composición de la presente invención) al pozo durante el transcurso de

aproximadamente 8 horas. Los nutrientes pueden comprender, por ejemplo, 6 g de glucosa, 10 g/l de nitrato de amonio, 0,1-0,5 g/l de extracto de levadura, 0,5 g/l de KNO_3 y 0,2 g/l de Mg $(NO_3)_2$. La concentración final de biosurfactantes en un pozo puede estar aproximadamente entre 1,000 y 2,000 ppm y la concentración final de B1 puede ser, por ejemplo, 10^6 células/ml. Luego, los pozos de petróleo pueden cerrarse durante 4-7 días, o el tiempo que sea necesario para que el tratamiento tenga efecto.

El monitoreo de los pozos puede y debe ocurrir durante cualquier número de días o meses después del tratamiento para asegurar que los niveles de sulfuro de hidrógeno permanezcan controlados.

EJEMPLO 4: ESTIMULACIÓN DE POZOS Y TRATAMIENTO CON SULFURO DE HIDRÓGENO EN UN POZO HORIZONTAL MEDIANTE EL MÉTODO DE DOS FASES

Se trató un pozo horizontal con niveles de sulfuro de hidrógeno que oscilaron históricamente entre 200 y 400 ppm con los métodos de dos fases en cuestión. Los niveles de H_2S se probaron utilizando una bomba Draeger.

Fase uno

En el día 0, los niveles de H_2S en el sitio se midieron antes del tratamiento, así como diariamente durante todo el tratamiento. Se usó un camión de solvente para bombear 70 BBL de la primera composición de la invención en la caja del pozo. La mezcla de biosurfactante de la primera composición en este ejemplo comprende soporolípido, ramnolípido y surfactina en una proporción de 15:1:1.

Los 10 BBL de la primera composición también se bombearon en el tanque, la línea de flujo y el separador. Luego se cerró el pozo durante 4 días. Luego se reanudó el bombeo hasta que se recuperó el fluido de tratamiento. Los niveles de producción de H_2S y petróleo/gas se midieron diariamente (Figura 2).

Fase dos

En el día 13, se cargó con salmuera filtrada un tanque limpio certificado de 2,500 BBL. Se mezclaron 60 BBL de nutrientes con B1 concentrado usando un camión bomba. Los 863 BBL de la salmuera, los nutrientes y la composición B1 se bombearon hacia debajo de la cubierta a una velocidad de 3,4 a 4,0 BBL/min. El pozo se cerró durante 5 días, después de lo cual se reanudó el bombeo normal. Los niveles de producción de H_2S y petróleo y gas se midieron diariamente (Figura 2).

Resultados

La FIG. 2 muestra las mediciones de los niveles de H_2S con la producción diaria de petróleo y gas. Desde el tratamiento con los métodos objeto, el H_2S aumentó ligeramente, pero se mantuvo relativamente estable a 100 ppm.