

COMPOSICION Y METODOS PARA DIGESTION MEJORADA MICROBIANA
DE POLIMEROS EN POZOS DE FRACTURA

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUD RELACIONADA

Esta solicitud reivindica el beneficio de las siguientes solicitudes provisionales de EE.UU.: Serial No. 62/366,410, presentada el 3 de marzo de 2017; y Serial No. 62/528,718, presentada el 5 de julio de 2017; cada una de las cuales se incorpora acá por referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La fracturación hidráulica, o “fracturación” (fracking), de formaciones terrestres alrededor de un pozo es un proceso usado para aumentar la productividad de un pozo. Los pozos verticales estándar se someten a fracturación durante la producción original o para estimular la producción. Otras aplicaciones involucran el uso de pozos horizontales, en donde un pozo vertical es perforado a una profundidad deseada, en cuyo punto el taladro es girado para empezar a perforar horizontalmente. La porción horizontal de estos pozos se puede extender varios miles de pies en longitud.

Una vez ha ocurrido la perforación, miles de galones de fluido de “almohadilla”, un fluido a base de petróleo o a base de agua, son inyectados en una formación a presiones extremas. Esto causa fracturas o rajaduras a desarrollarse en la cara de la roca en el pozo. La inyección de fluido continua en el pozo luego hace que las fracturas aumenten en longitud y ancho. Después que se ha logrado un ancho suficiente, las partículas denominadas “apuntalantes” son adicionadas al fluido, a menudo recubiertas con materiales de polímero para ayudar en el funcionamiento adecuado en formaciones subterráneas estrechas. La arena de sílice es comúnmente utilizada como un apuntalante en aplicaciones de fracturación.

Después que ha cesado la inyección de fluido, el fluido de fracturación fluye fuera de las fracturas, permitiendo que las paredes de las fracturas se cierren con el apuntalante. Las partículas de apuntalante luego “apuntalan” las paredes de las fracturas aparte. Debido a que las partículas de apuntalante son normalmente mucho mayores que las partículas de la formación, la permeabilidad del fluido de una fractura apuntalada es mucho mayor a la de la formación natural; por lo tanto, la capacidad de flujo del pozo se aumenta. Al final de un tratamiento de fracturación, el fluido cargado de apuntalante es “lavado” del pozo en la formación por medio de un fluido de desplazamiento libre de apuntalante.

A pesar de los aumentos en la productividad de petróleo y gas asociados con el uso de la fracturación, pueden surgir ciertos inconvenientes y complicaciones, particularmente con relación al uso de apuntalantes. Por ejemplo, dependiendo del apuntalante utilizado, el apuntalante puede afectar la tasa de flujo del fluido de fracturación, y/o el apuntalante puede ser depositado de forma inadecuada, o no ser depósito en absoluto, en las fracturas. Como resultado, se ha desarrollado una variedad de soluciones para superar estas complicaciones, tal como recubrimientos de apuntalante y aditivos químicos de fluido de fracturación.

Los modelos teóricos generalmente indican que el ancho de una fractura en el pozo aumenta con la viscosidad efectiva del fluido inyectado en la fractura, la tasa de inyección del fluido y el volumen de fluido inyectado. El fluido de fracturación debe ser capaz de soportar las altas presiones necesarias para crear fracturas con un ancho que puede aceptar apuntalante. Idealmente, esto se hace sin usar grandes cantidades de fluido; sin embargo, la viscosidad de un fluido de fracturación está normalmente limitada por la pérdida de presión a medida que el fluido es bombeado hacia abajo en un pozo. Los fluidos de fracturación que son actualmente utilizados minimizan esta pérdida de presión al emplear soluciones de polímero que son altamente no newtonianas (adelgazamiento). De otra manera, la pérdida de presión debido a la fricción en la tubería únicamente permitiría la inyección a tasas muy

pequeñas. Los polímeros solubles en agua pueden ser reticulados para aumentar la viscosidad, y esta reticulación es algunas veces retrasada para disminuir la pérdida de presión en los tubulares.

También se pueden adicionar reductores de fricción a los fluidos de fracturación para reducir la presión de fricción durante el bombeo. Los reductores de fricción son típicamente polímeros solubles en agua de cadena larga y de alto peso molecular. Ellos operan al aumentar el flujo laminar y disminuir el flujo turbulento en agua a medida que es bombeado hacia abajo en el pozo, disminuyendo así la energía requerida para mover el agua y las partículas de apuntalante hacia abajo en el pozo.

Además, se pueden usar rompedores para reducir la viscosidad del fluido de fracturación antes que el fluido fluya de regreso hacia arriba del pozo. Después que el apuntalante es mezclado o recubierto con el fluido de fracturación viscoso y es bombeado hacia abajo para formar una fractura, el fluido de fracturación debe ser removido del paquete apuntalante. El fluido de fracturación sin quebrar que se dejó en la fractura puede reducir la permeabilidad del apuntalante, resultando en menos flujo de retorno de fluido y menos producción de petróleo y gas. Idealmente, el fluido de fracturación es removido sin mover el apuntalante de la fractura y sin dañar la conductividad del lecho de apuntalante. Para lograr esto, el fluido viscoso que lleva el apuntalante puede ser adelgazado a un estado cercano al agua usando quebradores, tal como enzimas u oxidantes.

El flujo de retorno de apuntalante de las fracturas y en el pozo puede también impedir la eficiencia de producción de petróleo y gas. Si el apuntalante fluye fuera de una fractura en el pozo, el ancho de la fractura disminuye y disminuye la productividad de hidrocarburo. Fibras poliméricas hechas de, por ejemplo, poliláctido, o ácido poliláctico (PLA), han sido usadas para prevenir el retorno de flujo de apuntalante. Las fibras de PLA ayudan a suspender el apuntalante en el fluido de fracturación y lo portan hacia abajo del pozo y en la formación. Las fibras

actúan para formar una red que estabiliza el apuntalante, el cual luego es depositado en las fracturas, mientras que se previene el asentamiento de apuntalante en el fondo de la fractura. Las fibras de poliláctido luego se disuelven, dejando “agujeros de gusano” a través de los cuales puede fluir gas y petróleo dentro del pozo. PLA también puede ser usado en la forma de bolas solubles y/o hojuelas como reductor de fricción.

Otro polímero biodegradable comúnmente utilizado en operaciones de fracturación es poliglicólido, o ácido poliglicólico (PGA), en la forma de bolas o fibras. A menudo se utilizan bolas de fracturación de tamaño variable para la fracturación de múltiples zonas frac. El uso de bolas permite que las zonas sin tratar sean aisladas de las zonas ya tratadas de modo que la presión hidráulica fractura las nuevas zonas en lugar de simplemente quebrantar las zonas ya fracturadas. El proceso involucra insertar una pluralidad de mangas frac, las cuales incluyen una manga deslizante accionada mecánicamente acoplada por un asiento de bola, en una zona sin tratar. Las mangas frac pueden tener asientos de bola progresivamente más pequeños.

Las bolas frac más pequeñas son insertadas en las mangas primero, pasando a través de todas menos la última y más pequeña manga frac, donde ellas se sientan. La presión aplicada de la superficie hace que la bola frac se presione contra el asiento de bola, el cual acopla mecánicamente una manga deslizante. La presión hace que la manga cambie mecánicamente, abriendo una pluralidad de puertos frac y exponiendo la formación. El fluido de fracturación a alta presión es inyectado desde la superficie, forzando al fluido de fracturación dentro de la formación, y la zona es fracturada. Después que la zona es fracturada, la segunda bola frac más pequeña es bombeada dentro del pozo, y se sienta en la manga disponible más lejana. Esa zona es fracturada, y el proceso se continúa con bolas frac cada vez más grandes, donde la bola más grande es insertada de última.

Adicionalmente, varios operadores de pozo usan gel de poliacrilamida (PAM) como reducir de fricción en cantidades alrededor de 1 a 2 partes por 1000 galones de agua; sin embargo, una vez el gel está en el fondo del pozo éste no sirve para otro propósito, no se degrada fácilmente, y no es fácilmente recuperado de regreso a la superficie. Se han hecho intentos inefectivos de romper el gel usando cromita de sodio o bromuro de sodio, pero a menudo dejan cantidades significativas de gel restante.

La utilidad de las sustancias de fracturación poliméricas está limitada por su capacidad de degradarse bajo las condiciones de temperatura y humedad que existen en un pozo, así como su capacidad de ser recuperadas de regreso hacia arriba del pozo. Aumentar la viscosidad de los fluidos de fracturación crea limitaciones incluso mayores, ya que los polímeros solubles en agua más comúnmente utilizados para aumentar la viscosidad no se degradan completamente. Por el contrario, ellos dejan un residuo que obstaculiza la capacidad de flujo del apuntalante restante en la fractura. Adicionalmente, los polímeros usados como reductores de fricción, quebradores, reticuladores, u otros aditivos pueden llevar a dificultades similares debido a su tasa de degradación lenta.

La tasa a la cual se degrada PLA o PGA, por ejemplo, es importante para la aplicación exitosa en entornos subterráneos, tal como los descritos anteriormente. Se piensa que la degradación de PLA y PGA procede principalmente a través de hidrólisis, y la tasa de degradación es altamente dependiente de las condiciones locales, por ejemplo, temperatura. Estos polímeros reticulados son sometidos a temperaturas muy altas en las formaciones, las cuales disminuyen rápidamente a medida que el fluido es bombeado a través de la tubería del pozo.

Por lo tanto, existe una necesidad por composiciones y métodos para degradar rápidamente y recuperar PLA, PGA y otras sustancias poliméricas usadas como reductores de fricción, quebradores, y/u otros aditivos de fluido de fracturación y recubrimientos.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención suministra microbios, así como subproductos de su crecimiento, tales como biotensoactivos, solventes y/o enzimas. La presente invención también suministra métodos para usar estos microbios y sus subproductos en operaciones de fracturación hidráulica para mejorar la disolución de aditivos de fluido de fracturación poliméricos y/o recubrimientos apuntalantes. Ventajosamente, los métodos de la presente invención son amigables con el medio ambiente, amigables en operación y económicos.

En modalidades preferidas, la presente invención suministra materiales y métodos para mejorar la producción de petróleo y gas al tratar una formación que contiene petróleo y gas que se somete a tratamiento de fracturación hidráulica con una composición a base de microbio capaz de disolver los polímeros que han sido aplicados como, por ejemplo, aditivos de fluido de fracturación y/o recubrimientos de apuntalante.

En una modalidad, la presente invención suministra una composición a base de microbio para mejorar la recuperación de petróleo y gas a partir de una formación con hidrocarburos, la composición comprende un microorganismo y/o sus subproductos de crecimiento. Los subproductos de crecimiento pueden ser, por ejemplo, biotensoactivos, solventes, enzimas y/u otros metabolitos.

En una modalidad, el microbio es una o más bacterias o levaduras productoras de biotensoactivo, solvente y/o enzima, o una combinación de los mismos. En una modalidad, la composición a base de microbio comprende una "levadura asesina", tal como, por ejemplo, *Wickerhamomyces anomalus*, y/o productos del crecimiento de esta especie. En una modalidad, el microbio es levadura *Starmerella*. En una modalidad, el microbio es una bacteria *Bacillus*.

En una modalidad, la composición a base de microbio puede además comprender enzimas que mejoran la degradación de polímeros, tales como, por ejemplo, proteasas, lipasas y/o esterasas.

En una modalidad, la composición a base de microbio puede además comprender materiales para mejorar el crecimiento de microbios durante la aplicación. Estos materiales pueden ser, por ejemplo, nutrientes y/o mejoradores de germinación. Las fuentes de nutriente pueden incluir, por ejemplo, nitrógeno, nitratos, nitritos, fósforo, magnesio y/o carbono. Los mejoradores de germinación pueden incluir, por ejemplo, L-alanina, L-valina, L-asparagina y/o manganeso en cantidades micromolares.

En ciertas modalidades, las composiciones de la presente invención tienen ventajas sobre, por ejemplo, biotensoactivos, solventes, y enzimas solas, incluyendo una o más de las siguientes: altas concentraciones de manoproteína como parte de la superficie externa de la pared celular de una levadura; la presencia de beta-glucano en paredes celulares de levadura; y la presencia de biotensoactivos y otros metabolitos (por ejemplo, ácido láctico, etanol, acetato de etilo, etc.) en el cultivo. Estos metabolitos pueden, por ejemplo, actuar como solventes.

En una modalidad, la presente invención suministra productos de fermentación de levadura que pueden ser usados para digerir, o mejorar la degradación de, polímeros en pozos de fracturación. El producto de fermentación de levadura puede ser obtenido por medio de cultivación de una levadura productora de biotensoactivo, solvente y/o enzima, tal como, por ejemplo, *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anómala*). El caldo de fermentación después de 7 días de cultivación a 25-30°C puede contener la suspensión celular de levadura y, por ejemplo, 4 g/L o más de biotensoactivo.

El producto de fermentación de levadura puede también ser obtenido por medio de cultivación de una levadura productora de biotensoactivo, solvente y/o enzima, tal como, por ejemplo, *Starmerella bombicola*. El caldo de fermentación

después de 5 días de cultivación a 25°C puede contener la suspensión celular de levadura y, por ejemplo, 100 g/L o más de biotensoactivo.

En una modalidad, la composición de acuerdo con la presente invención es obtenida a través de procesos de cultivación que varían de pequeña a gran escala. El proceso de cultivación puede ser, por ejemplo, cultivación sumergida, fermentación de estado sólido (SSF), y/o una combinación de éstos.

Como se muestra en las Figuras 1 y 2, los productos de fermentación de levadura pueden ser incubados con fluido de fracturación que comprende, por ejemplo, bolas PLA, por 24 horas. Una bola de PLA después de la incubación con producto de fermentación de levadura fue disuelta completamente, mientras que cuando se incubó por el mismo periodo de tiempo con agua sola, únicamente ocurrió el 1% de la disolución total (requiriendo aproximadamente un mes en disolverse completamente).

Ventajosamente, las presentes composiciones a base de microbio pueden ser usadas para digerir, o mejorar la degradación de, polímeros en, por ejemplo, pozos de fracturación. La presente composición puede también ser útil como una solución de retorno de flujo, en donde los biotensoactivos y otros subproductos del crecimiento microbiano pueden disminuir eficientemente la tensión superficial del agua a un rango deseable de, por ejemplo, 28-30 dinas/cm. Las composiciones también pueden ayudar a reducir la entrada de energía requerida para lavar los materiales de fracturación después del uso.

En una modalidad, la presente invención suministra un método para mejorar la eficiencia de producción de petróleo y gas al aplicar una composición que comprende un microorganismo productor de biotensoactivo, solvente y/o enzima, y/o un subproducto de crecimiento del mismo, a un pozo petrolero. El subproducto de crecimiento puede ser cualquier metabolito microbiano, tal como, por ejemplo, un biotensoactivo, un solvente y/o una enzima.

En una modalidad, el método puede ser usado para mejorar la recuperación de petróleo al aplicar la composición a base de microbio a un pozo petrolero que se somete a tratamiento de fracturación hidráulica.

El método puede además comprender adicionar materiales para mejorar el crecimiento de microbios y/o la germinación durante la aplicación (por ejemplo, adicionar nutrientes para promover el crecimiento microbiano y/o mejoradores de germinación). En una modalidad, las fuentes de nutriente pueden incluir, por ejemplo, nitrógeno, nitrato, fósforo, magnesio y/o carbono. En una modalidad, los mejoradores de germinación pueden incluir, por ejemplo, L-alanina, L-valina, L-asparagina y/o manganeso en cantidades micromolares.

En una modalidad, el método puede además comprender adicionar enzimas degradadoras de polímero al sitio con el fin de mejorar la degradación del polímero.

Preferiblemente, los microbios de la composición a base de microbio y/o sus subproductos de crecimiento pueden digerir rápidamente polímeros tales como ácido poliláctico (PLA) y/o ácido poliglicólico (PGA). Los microbios pueden ser inactivos, vivos (o viables), o en forma de espora, al momento de la aplicación.

En una modalidad, el microorganismo es una levadura, por ejemplo, *Wickerhamomyces anomalus* y/o *Starmerella bombicola*. En una modalidad, el microorganismo es una bacteria, tal como, por ejemplo, una especie de bacteria *Bacillus* clade. En una modalidad, se utiliza una combinación de microorganismos en la composición a base de microbio.

Los microorganismos pueden crecer *in situ* y producir compuestos activos en el sitio. En consecuencia, se puede lograr fácilmente y de forma continua una alta concentración de, por ejemplo, biotensoactivo, solvente, y/o enzima, y microorganismos productores de biotensoactivo en un sitio de tratamiento (por ejemplo, un pozo petrolero).

En una modalidad, la presente invención suministra métodos para recuperar sustancias poliméricas que permanecen en pozos de fracturación. Por ejemplo, los

biotensoactivos producidos por métodos y microorganismos de la presente invención pueden reducir la tensión interfacial de los fluidos usados para elevar las sustancias poliméricas de fracturación, tal como reductores de fricción de gel de poliacrilamida (PAM). En otra modalidad, los biotensoactivos pueden ser usados para escindir gel de PAM antes de la elevación,

La presente invención puede ser útil para completar el pozo, particularmente en operaciones de fracturación, así como para restaurar la salud de las formaciones de petróleo y gas. Por ejemplo, las presentes composiciones y los métodos pueden ayudar en la reparación de daños en la formación en las áreas que rodean un pozo, y pueden remediar polímeros (por ejemplo, PLA y PGA) y biopolímeros (por ejemplo, goma de guar y goma de xantano) que fueron dejados de operaciones de fracturación previas. Así, los canales taponados pueden ser abiertos dentro de las formaciones para permitir oportunidades de fracturación adicionales.

En una modalidad, la presente invención suministra métodos para producir un biotensoactivo, solvente, metabolito, y/o una enzima al cultivar una cepa de microbio de la presente invención bajo condiciones adecuadas para crecimiento y producción de tensoactivos, solvente, metabolito, y/o enzima; y al purificar el tensoactivo, solvente, metabolito, y/o enzima para posterior uso de acuerdo con la presente invención.

Ventajosamente, la presente invención puede ser usada sin liberar grandes cantidades de compuestos inorgánicos al ambiente. Adicionalmente, las composiciones y métodos utilizan componentes que son biodegradables y toxicológicamente seguros. Así, la presente invención puede ser usada en todas las posibles operaciones de producción de petróleo y gas como un tratamiento “verde”.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra una bola de PLA (izquierda) y una bola de PLA disuelta después de la aplicación de tratamiento de levadura (derecha).

La Figura 2 muestra la digestión de PLA por un periodo de 24 horas usando tratamiento de digestión de levadura (mitad) contra agua sola (derecha). La digestión de levadura resultó en disolución completa, mientras que el agua sola resultó únicamente en aproximadamente 1% de disolución.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención suministra microbios, así como subproductos de su crecimiento, tales como biotensoactivos, solventes y/o enzimas. La presente invención también suministra métodos para utilizar estos microbios y sus subproductos en operaciones de fracturación hidráulica para mejorar la disolución de aditivos de fluidos poliméricos de fracturación y/o recubrimientos apuntalantes. Ventajosamente, los métodos de la presente invención son amigables con el medio ambiente, amigables en operación y económicos.

En modalidades preferidas, la presente invención suministra materiales y métodos para mejorar la producción de petróleo y gas mediante el tratamiento de una formación que contiene petróleo y gas que se somete a tratamiento de fracturación hidráulica con una composición a base de microbio capaz de disolver los polímeros que han sido aplicados como, por ejemplo, aditivos de fluido de fracturación y/o recubrimientos de apuntalantes.

En una modalidad, la presente invención suministra una composición a base de microbio para mejorar la recuperación de petróleo y gas a partir de una formación de hidrocarburos, la composición comprende un microorganismo y/o sus subproductos de crecimiento. Los subproductos de crecimiento pueden ser, por ejemplo, biotensoactivos, solventes, enzimas y/u otros metabolitos.

En una modalidad, la presente invención suministra un método para mejorar la eficiencia de producción de petróleo y gas al aplicar una composición que comprende un microorganismo productor de biotensoactivo, solvente y/o enzima, o un subproducto de crecimiento de los mismos, a un pozo petrolero. El subproducto

de crecimiento puede ser cualquier metabolito microbiano, tal como, por ejemplo, un biotensoactivo, un solvente y/o una enzima.

Definiciones Seleccionadas

Como se usa acá, referencia a una “composición a base de microbio” significa una composición que comprende componentes que fueron producidos como resultado del crecimiento de microorganismos u otros cultivos celulares. Así, la composición a base de microbio puede comprender los microbios como tales y/o subproductos del crecimiento microbiano. Los microbios pueden estar en un estado vegetativo, en forma de spora, en forma de micelio, en cualquier otra forma de propágulo, o una mezcla de éstos. Los microbios pueden ser planctónicos o en una forma de biopelícula, o una mezcla de ambos. Los subproductos de crecimiento pueden ser, por ejemplo, metabolitos, componentes de membrana celular, proteínas expresadas, y/u otros componentes celulares. Los microbios pueden ser intactos o lisados. En modalidades preferidas, los microbios están presentes, con caldo en los cuales ellos fueron cultivados, en la composición a base de microbio. Las células pueden estar presentes a, por ejemplo, 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 acá, un propágulo es cualquier porción de un microorganismo a partir del cual se puede desarrollar un organismo nuevo y/o maduro, incluyendo pero no limitado a, células, esporas, conidios, micelios, brotes y semillas.

La presente invención además suministra “productos a base de microbio”, los cuales son productos que van a ser aplicados en la práctica para lograr un resultado deseado. El producto a base de microbio puede ser simplemente la composición a base de microbio cosechada del proceso de cultivación de microbio. Alternativamente, el producto a base de microbio puede comprender ingredientes adicionales que han sido adicionados. Estos ingredientes adicionales pueden

incluir, por ejemplo, estabilizadores, amortiguadores, portadores adecuados, tal como agua, soluciones salinas, o cualquier otro portador adecuado, nutrientes adicionados para soportar crecimiento microbiano adicional, mejoradores de crecimiento no nutrientes, tales como hormonas de planta y/o agentes que facilitan el rastreo de los microbios y/o la composición en el ambiente al cual se aplican. El producto a base de microbio puede también comprender mezclas de composiciones a base de microbio. El producto a base de microbio puede también comprender uno o más componentes de una composición a base de microbio que ha sido procesada en alguna forma tal como, pero no limitado a, filtrado, centrifugación, lisado, secado, purificación y similares.

Como se usa acá, una molécula de ácido nucleico “aislada” o “purificada”, polinucleótido, polipéptido, proteína o compuesto orgánico tal como una molécula pequeña (por ejemplo, aquellas describas más adelante), es sustancialmente libre de otros compuestos, tal como material celular, con el cual está asociada en la naturaleza. Como se usa acá, referencia a “aislado” en el contexto de una cepa microbiana significa que la cepa es removida del ambiente en el cual existe en la naturaleza. Así, la cepa aislada puede existir como, por ejemplo, un cultivo biológicamente puro, o como esporas (u otras formas de la cepa) en asociación con un portador.

En ciertas modalidades, los compuestos purificados son al menos 60% en peso (peso seco) el compuesto de interés. Preferiblemente, la preparación es al menos 75%, más preferiblemente al menos 90%, y más preferiblemente 99% en peso el compuesto de interés. Por ejemplo, un compuesto purificado es uno que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 98%, 99%, o 100% (p/p) del compuesto deseado en peso. La pureza se mide por cualquier método estándar adecuado, por ejemplo, por cromatografía de columna, cromatografía de capa delgada, o análisis de cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC). Un polinucleótido (ácido

ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN)) purificado o aislado es libre de los genes o secuencias que lo linden en su estado que ocurre naturalmente.

Como se usa acá, “aplicar” una composición o producto se refiere a ponerlo en contacto con un objetivo o sitio de modo que la composición o producto puede tener un efecto sobre ese objetivo o sitio. El efecto se puede deber a, por ejemplo, crecimiento microbiano y/o la acción de un biotensioactivo u otro subproducto de crecimiento. Por ejemplo, las composiciones o productos a base de microbio pueden ser inyectadas en pozos petroleros y/o la tubería, bombas, tanques, etc. asociados con pozos petroleros.

Como se usa acá, una “biopelícula” es un agregado complejo de microorganismos, tal como bacterias, en donde las células se adhieren entre sí. Las células en las biopelículas son fisiológicamente distintas de células planctónicas del mismo organismo, las cuales son células simples que pueden flotar o nadar en un medio líquido.

Como se usa acá, “cosechado” en el contexto de fermentación de microorganismos se refiere a remover algo o toda la composición a base de microbio a partir de un recipiente de crecimiento.

Un “metabolito” se refiere a cualquier sustancia producida por el metabolismo o una sustancia necesaria para tomar parte en un proceso metabólico particular. Un metabolito puede ser un compuesto orgánico que es un material de inicio (por ejemplo, glucosa), un intermedio (por ejemplo, acetilo-CoA), o un producto final (por ejemplo, n-butanol) del metabolismo. Ejemplos de metabolitos pueden incluir, pero no se limitan a, enzimas, toxinas, ácidos, solventes, alcoholes, proteínas, carbohidratos, vitaminas, minerales, microelementos, aminoácidos, polímeros, y biotensioactivos.

Como se usa acá, “modular” es intercambiable con alterar (por ejemplo, aumentar o disminuir). Dichas alteraciones son detectadas por métodos estándar conocidos en el arte tal como los descritos acá.

Como se usa acá “tensoactivo” se refiere a un compuesto que reduce la tensión superficial (o tensión interfacial) entre dos líquidos o entre un líquido y un sólido. Los tensoactivos actúan como detergentes, agentes humectantes, emulsionantes, agentes espumantes, y/o dispersantes. Un tensoactivo producido por microorganismos es referido como un “biotensoactivo”.

En algunas modalidades, los microbios usados de acuerdo con la presente invención son “sobreproductores de tensoactivo”. Por ejemplo, la cepa puede producir al menos 0.1-10 g/L, por ejemplo, 0.5-1 g/L de tensoactivo. Por ejemplo, la cepa puede producir por lo menos 10%, 25%, 50%, 100%, 2 veces, 5 veces, 7.5 veces, 10 veces, 12 veces, 15 veces o más tensoactivo en comparación con otras cepas microbianas de recuperación de petróleo. En una modalidad, cuando se utiliza *Bacillus subtilis* de acuerdo con la presente invención, acá se utiliza *Bacillus subtilis* ATCC 39307 como una cepa de referencia.

Se entiende que los rangos provistos acá son taquigrafía para todos los valores dentro del rango. Por ejemplo, un rango de 1 a 20 se entiende que incluye cualquier número, combinación de números, o subrango del grupo que consiste de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 así como todos los valores decimales involucrados entre los enteros anteriormente mencionados tal como, por ejemplo, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, y 1.9. Con respecto a los subrangos, los “subrangos anidados” que se extienden desde cualquier punto final del rango están específicamente contemplados. Por ejemplo, un subrango anidado de un rango ejemplar de 1 a 50 puede comprender 1 a 10, 1 a 20, 1 a 30, y 1 a 40 en una dirección, o 50 a 40, 50 a 30, 50 a 20, y 50 a 10 en la otra dirección.

Como se usa acá, “reduce” se refiere a una alteración negativa de por lo menos 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, o 100%.

Como se usa acá, “referencia” se refiere a una condición estándar o de control.

Como se usa acá, “producción de petróleo y gas natural” se refiere a cualquiera y todas las operaciones involucradas en la extracción de petróleo crudo y/o gas natural a partir de la tierra, procesamiento, y a través de su compra eventual y el uso por parte de consumidores. La producción de petróleo y gas natural puede incluir, pero no se limita a, perforación, bombeo, recuperación, fracturación, inundación, transmisión, procesamiento, refinación, transporte, y almacenamiento de petróleo y/o gas.

Como se usa acá, “mejorar la recuperación de petróleo y gas” significa aumentar o mejorar la calidad y/o cantidad de petróleo y/o gas extraído y finalmente producido a partir de un sitio que contiene petróleo y gas.

Como se usa acá, “polímero” se refiere a cualquier compuesto macromolecular preparado al unir una o más unidades moleculares similares, o monómeros, juntos. Los polímeros incluyen polímeros sintéticos y naturales. Los polímeros ejemplares incluyen caucho, almidones, resinas, goma de guar, neopreno, nylon, PVC, silicona, celulosa, poliestireno, polietileno, polipropileno, poliacrilonitrilo, poliaminas, polisacáridos, polinucleótidos, tereftalato de adipato de polibutileno (PBAT), polihidroxialcanoatos (PHA), succinato de polibitleno (PBS), policaprolactona (PCL), ácido poliglicólico (PGA), polihidroxibutiratos (PHB), poliésteres tal como poliláctido (PLA), poliacrilamidas (PAM), y otros.

Como se usa acá, “degradación” de un polímero puede ser usado intercambiabilmente con “disolución”, “digestión”, y “remediación” y se refiere al quiebre o despolimerización del polímero en moléculas más solubles en agua y de bajo peso molecular capaces de fluir hacia afuera de una fractura de pozo. La degradación puede ocurrir por cualquier medio, incluyendo pero no limitado a degradación foto inducida, degradación térmica, degradación química, tal como ozonolisis, hidrolisis, u oxidación, y biodegradación.

Como se usa acá, “enzima degradadora de polímero” se refiere a cualquier enzima capaz de degradar o mejorar la degradación o disolución de un polímero.

Ejemplos no limitantes de enzimas degradadoras de polímero incluyen proteasas (o proteinasas, o enzimas de proteinasa), esterasas, y lipasas. Las enzimas de proteasa han sido mostradas por acelerar la hidrólisis o degradación de PLA. Las esterasas y lipasa pueden también ser adecuadas para otros polímeros degradables, tal como poli(hidroxibutiratos) o poliésteres alifáticos. Típicamente, estas enzimas son aisladas a partir de plantas, animales, bacterias, y hongos, y también pueden ser obtenidas comercialmente.

El término transicional “que comprende” el cual es sinónimo con “que incluye” o “que contiene” es inclusivo o de extremo abierto y no excluye elementos adicionales, no definidos o pasos de método. En contraste, la frase transicional “que consiste de” excluye cualquier elemento, paso, o ingrediente no especificado en la reivindicación. La frase transicional “que consiste esencialmente de” limita el alcance de una reivindicación a los materiales o pasos especificados “y aquellos que no afectan materialmente las características básicas y novedosas” de la invención reivindicada.

A menos que se indique específicamente o que sea obvio a partir del contexto, como se usa acá, el término “o” se entiende que es inclusivo. A menos que se indique específicamente o que sea obvio a partir del contexto, como se usa acá, se entiende que los términos “un”, “uno”, y “el” son singulares o plurales.

A menos que se indique específicamente o que sea obvio a partir del contexto, como se usa acá, el término “aproximadamente” se entiende como dentro de un rango de tolerancia normal en el arte, por ejemplo, dentro de 2 desviaciones estándar de la media. “Aproximadamente” puede ser entendido como dentro de 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05%, o 0.01% del valor indicado. A menos que sea de otra forma claro a partir del contexto, todos los valores numéricos suministrados acá son modificados por el término aproximadamente.

La definición de un listado de grupos químicos en cualquier definición de una variable acá incluye las definiciones de esa variable como cualquier grupo o

combinación simple de grupos enunciados. La definición de una modalidad para una variable o aspecto acá incluye esa modalidad como cualquier modalidad simple o en combinación con cualquier otras modalidades o porciones de las mismas.

Cualquier composición o método provistos acá pueden ser combinados con uno o más de cualquiera de las otras composiciones y métodos provistos acá.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción de las modalidades preferidas de la misma, y de las reivindicaciones. Todas las referencias citadas acá se incorporan por referencia.

Crecimiento de Cepas Microbianas de Acuerdo Con la Presente Invención

Los microorganismos crecidos de acuerdo con los sistemas y métodos de la presente invención pueden ser, por ejemplo, bacterias, levadura, y/o hongos. Estos microorganismos pueden ser naturales, o microorganismos genéticamente modificados. Por ejemplo, los microorganismos pueden ser transformados con genes específicos para exhibir características específicas. Los microorganismos pueden también ser mutantes de una cepa deseada. Como se usa acá, “mutante” significa una cepa, variante genética o subtipo de un microorganismo de referencia, en donde el mutante tiene una o más variantes genéticas (por ejemplo, una mutación de punto, mutación sin sentido, eliminación, duplicación, mutación de desplazamiento de marco o expansión de repetición) en comparación con el microorganismo de referencia. Los procedimientos para hacer mutantes son bien conocidos en el arte microbiológico. Por ejemplo, mutagénesis de UV y nitroguanidina son usados extensivamente hacia este fin.

En una modalidad, el microorganismo es una levadura u hongo. Las especies de levadura y hongo para uso de acuerdo con la presente invención, incluyen *Candida*, *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, *S. boulardii* *sequela*, *S. torula*), *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Wickerhamomyces* (por ejemplo, *W. anomalus*), *Starmerella* (por ejemplo, *S. bombicola*), *Mycorrhiza*, *Mortierella*,

Phycomyces, *Blakeslea*, *Thraustochytrium*, *Phythium*, *Entomophthora*, *Aureobasidium pullulans*, *Pseudozyma aphidis*, *Fusarium venenatum*, *Aspergillus*, *Trichoderma* (por ejemplo, *T. reesei*, *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. viride*), y/o *Rhizopus spp.*

En una modalidad, la levadura es una levadura asesina. Como se usa acá, “levadura asesina” significa una cepa de levadura caracterizada por su secreción de proteínas o glicoproteínas tóxicas, a las cuales la cepa como tal es inmune. Las exotoxinas secretadas por levaduras asesinas son capaces de matar otras cepas de levadura, hongos, o bacterias. Por ejemplo, los microorganismos que pueden ser controlados por levadura asesina incluyen *Fusarium* y otros hongos filamentosos. Ejemplos de levaduras asesinas de acuerdo con la presente invención son aquellas que pueden ser usadas de forma segura en las industrias de alimentos y fermentación, por ejemplo, cerveza, vino, y fabricación de pan; aquellas que pueden ser usadas para controlar otros microorganismos que pueden contaminar dichos procesos de producción; aquellas que pueden ser usadas en el biocontrol para conservación de alimentos; aquellas que pueden ser usadas para el tratamiento de infecciones con hongos en humanos y plantas; y aquellas que pueden ser usadas en tecnología de ADN recombinante. Dichas levaduras pueden incluir, pero no se limitan a, *Wickerhamomyces*, *Pichia* (por ejemplo, *P. anomala*, *P. guilliermondii*, *P. kudriavzevii*, *P. occidentalis*), *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, (por ejemplo, *H. uvarum*), *Ustilago maydis*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Torulopsis*, *Ustilago*, *Williopsis*, *Zygosaccharomyces* (por ejemplo, *Z. bailii*), y otras.

En ciertas modalidades, la cepa microbiana es una levadura *Pichia* seleccionada de *Pichia anomala* (*Wickerhamomyces anomalus*), *Pichia guilliermondii*, y *Pichia kudriavzevii*. *Wickerhamomyces anomalus*, en particular, es un producto efectivo de varios solventes, enzimas, toxinas asesinas, así como biotensioactivos soforolípidos.

En una modalidad, la cepa microbiana es seleccionada del clado *Starmerella*. Un cultivo de un microbio *Starmerella* útil de acuerdo con la presente invención, *Starmerella bombicola*, puede ser obtenido de la Colección de Cultivo Tipo Americano (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA, 20110-2209 EE.UU. El depósito ha sido asignado con el número de acceso ATCC No. 22214 por el depositante.

En una modalidad, la presente invención suministra el uso de la cepa de levadura ATCC 22214 y mutantes de la misma. Esta cepa es un producto efectivo de biotensoactivos soforolípidos.

En modalidades preferidas, los microorganismos son bacterias, incluyendo bacterias de Gram positivo y Gram negativo. Las bacterias pueden ser, por ejemplo *Bacillus* (por ejemplo, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. firmus*, *B. laterosporus*, *B. megaterium*, *B. amyloliquifaciens*), *Clostridium* (*C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*, *C. acetobutyricum*, *Clostridium* NIPER 7, y *C. beijerinckii*), *Azobacter* (*A. vinelandii*, *A. chroococcum*), *Pseudomonas* (*P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* (Kluyver), *P. aeruginosa*), *Agrobacterium radiobacter*, *Azospirillum brasiliensis*, *Rhizobium*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Ralstonia eulropha*, y/o *Rhodospirillum rubrum*.

En una modalidad, el microorganismo es una cepa de *B. subtilis*, tal como, por ejemplo, *B. subtilis* var. *Locuses* B1 o B2, los cuales son productores efectivos de, por ejemplo, surfactina y otros biotensoactivos, así como biopolímeros. Esta descripción incorpora por referencia la Publicación Internacional No. WO 2017/044953 A1 en la medida que es consistente con las enseñanzas divulgadas acá. En otra modalidad, el microorganismo es una cepa de *Bacillus licheniformis*, el cual es un productor efectivo de biotensoactivos así como biopolímeros, tales como levan.

En ciertas modalidades, la presente invención utiliza cepas de *Bacillus subtilis* con producción mejorada de biotensoactivo en comparación con *Bacillus subtilis* tipo salvaje así como en comparación con otros microbios usados en la

recuperación de petróleo. Dichos *Bacillus subtilis* han sido denominados como miembros de la serie B, incluyendo, pero no limitados a, B1, B2 y B3.

En modalidades preferidas, dichas cepas se caracterizan por la producción mejorada de biotensoactivos en comparación con las cepas *Bacillus subtilis* de tipo salvaje. En ciertas modalidades, las cepas *Bacillus subtilis* han aumentado la producción de solvente de biopolímero y/o enzima.

La serie de cepa B de *Bacillus subtilis* produce más biotensoactivo en comparación con las cepas de referencia de *Bacillus subtilis*. Además, las cepas *Bacillus subtilis* sobreviven bajo condiciones de alta sal y anaeróbicas mejor que otras cepas *Bacillus* bien conocidas. Las cepas también son capaces de crecer bajo condiciones anaeróbicas. Las cepas de serie B de *Bacillus subtilis* también pueden ser usadas para producir enzimas que degradan o metabolizan productos de petróleo u otros.

En ciertas modalidades, las cepas *Bacillus subtilis* son tolerantes a la sal. La tolerancia a la sal puede ser con respecto a cualquiera o más de una variedad de sales. Por ejemplo, la sal puede ser una sal monovalente tal como una sal de sodio o potasio, por ejemplo, NaCl o KCl, o una sal divalente tal como una sal de magnesio o calcio, por ejemplo, MgCl₂ o CaCl₂, o una sal trivalente.

En algunas modalidades, las cepas *Bacillus subtilis* son capaces de prosperar bajo condiciones de bajo oxígeno.

Otras cepas microbianas incluyendo, por ejemplo, cepas capaces de acumular cantidades significativas de, por ejemplo, biotensoactivos glioclípidos, pueden ser usadas de acuerdo con la presente invención. Otros subproductos microbianos útiles de acuerdo con la presente invención incluyen manoproteína, beta glucano y otros metabolitos que tienen propiedades bioemulsionantes y reductoras de tensión superficial o interfacial.

Crecimiento de Microbios de Acuerdo con la Presente Invención

La presente invención utiliza métodos para cultivar microorganismos y producción de metabolitos microbianos y/o otros subproductos de crecimiento microbiano. La presente invención además utiliza procesos de cultivación que son adecuados para la cultivación de microorganismos y la producción de metabolitos microbianos a una escala deseada. Estos procesos de cultivación incluyen, pero no se limitan a, fermentación sumergida, fermentación de estado sólido (SSF), y combinaciones de éstos.

Los sistemas de cultivación microbiana típicamente utilizarían fermentación de cultivo sumergida; sin embargo, también se puede utilizar cultivo superficial y sistemas híbridos. Como se usa acá “fermentación” se refiere al crecimiento de células bajo condiciones controladas. El crecimiento puede ser aeróbico o anaeróbico.

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

El recipiente de crecimiento de microbio usado de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier fermentador o reactor de cultivación para uso industrial. En una modalidad, el recipiente puede tener controles/sensores funcionales o puede conectarse a controles/sensores funcionales para medir factores importantes en el proceso de cultivación, tal como pH, oxígeno, presión, temperatura, potencia del eje agitador, humedad, viscosidad y/o densidad microbiana y/o concentración de metabolitos.

En una modalidad adicional, el recipiente también puede ser capaz de monitorear el crecimiento de microorganismos dentro del recipiente (por ejemplo, medición de número de células y fases de crecimiento). Alternativamente, se puede tomar una muestra diaria del recipiente y se somete a enumeración por medio de

técnicas conocidas en la técnica, tal como técnica de ubicación en placas de dilución. Las placas de dilución es una técnica simple usada para estimar el número de bacterias en una muestra. La técnica también puede suministrar un índice por el cual se pueden comparar los diferentes ambientes o tratamientos.

En una modalidad, el método incluye complementar el cultivo con una fuente de nitrógeno. La fuente de nitrógeno puede ser, por ejemplo, nitrato de potasio, sulfato de amonio, nitrato de amonio, fosfato de amonio, amonio, urea, y/o cloruro de amonio. Estas fuentes de nitrógeno pueden ser usadas de forma independiente o en una combinación de dos o más.

El método de cultivación puede suministrar oxigenación al cultivo en crecimiento. Una modalidad utiliza movimiento lento de aire para remover el aire que contiene bajo oxígeno e introducir aire oxigenado. El aire oxigenado puede ser aire de ambiente complementado diariamente a través de mecanismos que incluyen propulsores para agitación mecánica del líquido, y aspersores de aire para suministrar burbujas de gas al líquido para disolución del oxígeno en el líquido.

El método puede además comprender 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 canola, aceite de arroz, aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de sésamo, y/o aceite de linaza; etc. Estas fuentes de carbono pueden ser usadas de forma independiente o en una combinación de dos o más.

En una modalidad, los factores de crecimiento y nutrientes de rastreo para microorganismos están incluidos en el medio. Esto es particularmente preferido cuando se crecen microbios que son incapaces de producir todas las vitaminas que requieren. Nutrientes inorgánicos, incluyendo elementos de rastreo tales como

hierro, zinc, cobre, manganeso, molibdeno y/o cobalto pueden también estar incluidos en el medio. Además, fuentes de vitamina, aminoácidos esenciales, y microelementos pueden ser incluidos, por ejemplo, en la forma de harinas o comidas, tal como harina de maíz, o en la forma de extractos, tal como extracto de levadura, extracto de papa, extracto de carne, extracto de soya, extracto de cáscara de banano, y similares, o en forma purificada. Aminoácidos tales como, por ejemplo, aquellos útiles para biosíntesis de proteínas, también pueden ser incluidos, por ejemplo, L-Alanina.

En una modalidad, también se pueden incluir sales inorgánicas. Las sales inorgánicas utilizables pueden ser fosfato de dihidrógeno de potasio, fosfato de hidrógeno de dipotasio, fosfato de hidrógeno de disodio, 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 pueden ser usadas de forma independiente o en una combinación de dos o más.

En algunas modalidades, el método para cultivación puede además comprender adicionar ácidos adicionales y/o antimicrobianos en el medio líquido antes, y/o durante el proceso de cultivación. Agentes antimicrobianos o antibióticos son usados para proteger el cultivo contra contaminación. Adicionalmente, también se pueden usar agentes antiespumantes para prevenir la formación y/o acumulación de espuma cuando se produce gas durante la cultivación.

El pH de la mezcla debe ser adecuado para el microorganismo de interés. Amortiguadores, y reguladores de pH, tal como carbonatos y fosfatos, pueden ser usados para estabilizar el pH cerca a un valor preferido. Cuando iones de metal están presentes en altas concentraciones, puede ser necesario el uso de un agente quelante en el medio líquido.

El método y equipo para cultivación de microorganismos y producción de los subproductos microbianos pueden ser realizados en un proceso por lotes, uno casi continuo, o un proceso continuo.

Los microbios pueden ser crecidos en forma plantónica o como una biopelícula. En el caso de biopelícula, el recipiente puede tener dentro de él un sustrato con el cual los microbios pueden crecer en un estado de biopelícula. El sistema también puede tener, por ejemplo, la capacidad de aplicar estímulo (tal como esfuerzo de corte) que promueve y/o mejora las características de crecimiento de la biopelícula.

En una modalidad, el método para cultivación de microorganismos es llevado a cabo de aproximadamente 5°C a aproximadamente 100°C, preferiblemente, 15 a 60°C, más preferiblemente 25 a 50°C. En una modalidad adicional, la cultivación puede ser llevada a cabo continuamente a una temperatura constante. En otra modalidad, la cultivación puede ser sujeto a temperaturas cambiantes.

En una modalidad, el equipo usado en el método y proceso de cultivación es estéril. El equipo de cultivación tal como el reactor/recipiente puede ser separado, pero conectado a, una unidad de esterilización, por ejemplo, un autoclave. El equipo de cultivación puede también tener una unidad de esterilización que esteriliza in situ antes de iniciar la inoculación. El aire puede ser esterilizado por métodos conocidos en el arte. Por ejemplo, el aire de ambiente puede pasar a través de por lo menos un filtro antes de ser introducido en el recipiente. en otras modalidades, el medio puede ser pasteurizado u, opcionalmente, sin calor adicionado en absoluto, donde el uso de una actividad baja de agua y bajo pH puede ser explotado 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 modalidad, el contenido de sólidos del caldo es de 10 g/l a 150 g/l.

El subproducto de crecimiento microbiano producido por los microorganismos de interés puede retenerse en los microorganismos o puede ser secretado en el medio de crecimiento. En otra modalidad, el método para producir subproducto de crecimiento microbiano puede además comprender pasos para concentrar y purificar el subproducto de crecimiento microbiano de interés. En una modalidad adicional, el medio de crecimiento puede contener compuestos que estabilizan la actividad del subproducto de crecimiento microbiano.

En una modalidad, los metabolitos son producidos al cultivar una cepa de microbio de la presente invención bajo condiciones adecuadas para el crecimiento y la producción de metabolitos; y, opcionalmente, purificar el metabolito. El metabolito puede ser cualquier biotensoractivo, enzima, solvente, proteína, ácido, toxina, u otro compuesto producido por el crecimiento del microbio.

En una modalidad, toda la composición de cultivación microbiana es removida al completar la cultivación (por ejemplo, al lograr una densidad celular deseada, o densidad de un metabolito especificado en el caldo). En este procedimiento por lotes, se inicia un lote completamente nuevo al cosechar el primer lote.

En otra modalidad, únicamente una porción del producto de fermentación es removida en cualquier momento. En esta modalidad, la biomasa con células viables permanece en el recipiente como un inoculante para un nuevo lote de cultivación. La composición que es removida puede ser un caldo libre de células o puede contener células. De esta forma, se crea un sistema casi continuo.

Composiciones a Base de Microbio

En una modalidad, la presente invención suministra una composición a base de microbio para mejorar la recuperación de petróleo y gas de una formación de hidrocarburos, la composición comprende un microorganismo y/o sus subproductos

de crecimiento. Los subproductos de crecimiento pueden ser, por ejemplo, biotensoactivos, solventes, enzimas y/u otros metabolitos.

La presente composición puede ser usada para degradar, o mejorar la degradación de, aditivos poliméricos en pozos de fracturación hidráulica. La composición puede ser usada para digerir eficientemente ácido poliláctico (PLA) usado como reductor de fricción, quebrados, u otro aditivo de fluido de fracturación. La composición también puede ser usada para digerir, por ejemplo, fibras de PLA, bolas, u hojuelas. La composición también puede ser usada para digerir eficientemente poliglicólido (PGA), por ejemplo, en la forma de fibras o bolas de fracturación. La composición puede además ser usada para mejorar la recuperación de petróleo y/o gas.

Ventajosamente, las presentes composiciones a base de microbio pueden ser usadas para digerir, o mejorar la degradación de, polímeros en, por ejemplo, pozos de fracturación. La presente composición puede además ser útil como una solución de retroceso de flujo, en donde los biotensoactivos y otros subproductos de crecimiento microbiano pueden disminuir eficientemente la tensión superficial del agua a un rango deseable de, por ejemplo, 28 a 30 dinas/cm. Las composiciones pueden también ayudar a reducir la entrada de energía requerida para lavar los materiales de fracturación después del uso.

En modalidades preferidas, la composición a base de microbio comprende microorganismos y/o sus subproductos. En una modalidad, los microbios usados en los métodos de la presente invención son una o más bacterias productoras de biotensoactivo, solvente y/o enzima o levaduras, o una combinación de los mismos. En una modalidad, la composición a base de microbio comprende una "levadura asesina", tal como, por ejemplo, *Wickerhamomyces anomalus*, y/o productos del crecimiento de esta especie. En una modalidad, el microbio es una levadura clado *Starmerella*. En una modalidad, el microbio es una bacteria clado *Bacillus*.

La composición a base de microbio puede comprender el medio de fermentación que contiene un cultivo vivo y/o metabolitos microbianos producidos por los microorganismos y/o cualquier nutriente residual. El producto de fermentación puede ser usado directamente sin extracción o purificación. Si se desea, la extracción y purificación se puede lograr fácilmente usando métodos o técnicas estándar de extracción y/o purificación descritas en la literatura.

La composición a base de microbio puede comprender caldo o medio en el cual fueron crecidos los microbios. El producto puede ser, por ejemplo, al menos, en peso, 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75% o 100% el caldo. La cantidad de biomasa en el producto, en peso, puede ser, por ejemplo, cualquiera de 0% a 100% inclusive de todos los porcentajes entre los mismos.

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

Se pueden adicionar componentes adicionales a la composición a base de microbio, por ejemplo, agentes amortiguadores, portadores, otras composiciones a base de microbio producidos en una instalación diferente o la misma, modificadores de viscosidad, conservantes, nutrientes para crecimiento de microbio, agentes de rastreo, biocida, otros microbios, tensoactivos, agentes emulsionantes, lubricantes, agentes de control de estabilidad, agentes de ajuste de pH, conservantes, estabilizantes, y agentes resistentes a luz ultravioleta.

En una modalidad, enzimas degradadoras de polímero pueden ser incluidas en la composición a base de microbio. Las enzimas útiles de acuerdo con la presente invención pueden incluir, por ejemplo, proteinasas, esterasas, lipasas, oxidorreductasas, hidrolasas, liasas, celulasas, hemicelulasas, pectinasas, xantanasa, mananasa, α -galactosidasa, amilasa, y mezclas de las mismas, las cuales son capaces de degradar sustancias poliméricas a niveles de pH

encontrados en formaciones subterráneas. En una modalidad, la enzima es pronasa. En otra modalidad, la enzima es proteinasa K.

En ciertas modalidades, las enzimas pueden ser secadas por pulverización, liofilizadas, o similares. En ciertas modalidades, las enzimas de las composiciones pueden ser provistas, *entre otros*, en una forma purificada, en una forma parcialmente purificada, como células completas, como lisados celulares completos, o cualquier combinación de los mismos. La concentración de las enzimas debe ser una cantidad efectiva para acelerar la hidrólisis del polímero degradable en el pozo a un grado deseado en condiciones dadas. Por ejemplo, si se desea una tasa de hidrólisis relativamente más rápida, entonces se puede incluir una concentración mayor de la enzima seleccionada o mezcla de enzimas. La cantidad actual incluida dependerá de, *entre otros*, la temperatura del pozo, la concentración del polímero degradable, la enzima particular seleccionada, y la tasa de hidrólisis deseada.

En una modalidad, la composición a base de microbio puede además comprender materiales para mejorar el crecimiento de microbios durante la aplicación. Estos materiales pueden ser, por ejemplo, nutrientes y/o mejoradores de germinación. Las fuentes de nutrientes pueden incluir, por ejemplo, nitrógeno, nitratos, nitrilos, fósforo, magnesio y/o carbono, o cualquier otra fuente de nutriente que pueda ser usada para cultivar los microbios provistos en esta divulgación. Los mejoradores de germinación pueden incluir, por ejemplo, L-alanina, L-valina, L-asparagina y/o manganeso en cantidades micromolares.

En una modalidad, la composición puede además comprender agentes amortiguadores, incluyendo orgánicos y aminoácidos o sus sales, para estabilizar el pH cerca a un valor preferido. Los amortiguadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, citrato, gluconato, tartarato, malato, acetato, lactato, oxalato, aspartato, malonato, glucoheptonato, piruvato, galactarato, glucarato, tartronato, glutamato, glicina, lisina, glutamina, metionina, cisteína, arginina y mezclas de los mismos. También se pueden utilizar ácidos fosfóricos o fósforo o sus sales. Los

amortiguadores sintéticos son adecuados para ser usados pero es preferible usar amortiguadores naturales tales como aminoácidos y orgánicos o sus sales.

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

El pH de la composición a base de microbio debe ser adecuado para el microorganismo de interés. En una modalidad preferida, el pH de la composición a base de microbio está en el rango de 7.0 a 7.5.

En una modalidad, componentes adicionales tales como una preparación acuosa de una sal, tal como bicarbonato de sodio o carbonato, sulfato de sodio, fosfato de sodio, o bifosfato de sodio, pueden ser incluidos en la composición a base de microbio.

En ciertas modalidades, las composiciones de la presente invención tienen ventajas sobre, por ejemplo, biotensoactivos o enzimas solas, incluyendo una o más de las siguientes: altas concentraciones de manoproteína (un bioemulsionante) como parte de la superficie externa de pared celular de levadura; la presencia de biopolímero beta-glucano (un emulsionante) en paredes celulares de levadura; la presencia de biotensoactivos en el cultivo que son capaces de reducir la tensión superficial y la interfacial; y la presencia de solventes y/o metabolitos (por ejemplo, ácido láctico, etanol, acetato de etilo, etc.).

Preparación de Productos a Base de Microbio

Un producto a base de microbio 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 fermentación puede ser usado directamente sin extracción o purificación. Por ejemplo, los microbios y/o caldo que resultan del crecimiento

microbiano pueden ser removidos del recipiente de crecimiento y transferidos por medio, por ejemplo, de tubería para uso inmediato.

Si se desea, la extracción y purificación puede lograrse fácilmente usando métodos o técnicas estándar de extracción y/o purificación descritos en la literatura.

Al cosechar la composición a base de microbio de los recipientes de crecimiento, se pueden adicionar componentes adicionales a medida que el producto cosechado es ubicado en contenedores y/o enviados por tubos (o transportados de otra forma para uso). Los aditivos pueden ser, por ejemplo, amortiguadores, portadores, otras composiciones a base de microbio producidas en la misma o diferente instalación, modificadores de viscosidad, conservantes, nutrientes para crecimiento de microbios, mejoradores de germinación, y similares.

En una modalidad, la composición (microbios, caldo, o microbios y caldo) puede ser ubicada en contenedores de tamaño adecuado, tomando en consideración, por ejemplo, el uso destinado, el método de aplicación contemplado, el tamaño del tanque de fermentación, y cualquier modo de transportación desde la instalación de crecimiento de microbios a la ubicación de uso. Así, los contenedores en los cuales se ubica la composición a base de microbio pueden ser, por ejemplo, de 1 galón a 1000 galones o más. En otras modalidades, los contenedores son de 2 galones, 5 galones, 25 galones o más grandes.

Otras cepas microbianas incluyendo, por ejemplo, otras cepas de hongos capaces de digerir polímeros tales como PLA o acumular cantidades significativas de, por ejemplo, biosurfactantes glicolípidos y/o solventes y/o enzimas pueden ser usadas de acuerdo con la presente invención. Los biotensoactivos y solventes que son útiles de acuerdo con la presente invención incluyen manoproteína, beta glucano, etanol, ácido láctico y otros metabolitos que tienen, por ejemplo, propiedades bioemulsionantes y de reducción de tensión superficial/interfacial. Las enzimas útiles de acuerdo con la presente invención incluyen enzimas degradadoras de polímero que son capaces de degradar sustancias poliméricas en

condiciones (por ejemplo, pH y temperatura) presentes en una formación subterránea.

Otros aditivos adecuados, los cuales pueden estar contenidos en las formulaciones de acuerdo con la invención, incluyen sustancias que son habitualmente usadas para dichas preparaciones. Ejemplos de dichos aditivos incluyen tensoactivos, agentes emulsionantes, lubricantes, agentes amortiguadores, agentes de control de solubilidad, agentes de ajuste de pH, conservantes, estabilizadores y agentes resistentes a luz ultravioleta.

En una modalidad, la composición puede además comprender agentes amortiguadores incluyendo aminoácidos y orgánicos o sus sales. Los amortiguadores 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 los mismos. También se pueden utilizar ácidos fosfóricos y fósforo o sus sales. Amortiguadores sintéticos son adecuados para ser usados pero es preferible usar amortiguadores naturales tales como aminoácidos y orgánicos o sus sales indicados anteriormente.

En una modalidad adicional, los agentes de ajuste de pH incluyen hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, carbonato de potasio o bicarbonato, ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico o una mezcla.

En una modalidad, composiciones adicionales tales como una preparación acuosa de una sal como ácido poliprótico tal como bicarbonato de sodio o carbonato, sulfato de sodio, fosfato de sodio, bifosfato de sodio, pueden ser incluidos en la formulación.

Ventajosamente, de acuerdo con la presente invención, el producto a base de microbio puede comprender el caldo en el cual fueron crecidos los microbios. El producto puede ser, por ejemplo, al menos, en peso, 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75%

o 100% caldo. La cantidad de biomasa en el producto, en peso, puede ser, por ejemplo, cualquiera de 0% a 100% inclusive de todos los porcentajes entre éstos.

Opcionalmente, el producto puede ser almacenado antes de su uso. El tiempo de almacenamiento es preferiblemente corto. Así, el tiempo de almacenamiento puede ser menos de 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 modalidad preferida, si hay células vivas presentes en el producto, el producto es almacenado a una temperatura fría, tal como, por ejemplo, menos de 20°C, 15°C, 10°C, o 5°C. Por otro lado, una composición de biotensoactivo puede típicamente ser almacenada a temperaturas ambiente.

En una modalidad, la presente invención suministra productos de fermentación de levadura que pueden ser usados para digerir, o mejorar la digestión de, polímeros en pozos de fracturación. El producto de fermentación de levadura puede ser obtenido por medio de cultivación de una levadura productora de biotensoactivo, solvente y/o enzima, tal como, por ejemplo, *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anómala*). El caldo de fermentación después de 7 días de cultivación a 25-30°C puede contener la suspensión celular de levadura y, por ejemplo, 4 g/L o más de biotensoactivo.

El producto de fermentación de levadura puede también ser obtenido por medio de cultivación de una levadura productora de biotensoactivo, solvente y/o enzima, tal como, por ejemplo, *Starmerella bombicola*. El caldo de fermentación después de 5 días de cultivación a 25°C puede contener la suspensión celular de levadura y, por ejemplo, 100 g/L o más de biotensoactivo.

En una modalidad, la composición de acuerdo con la presente invención es obtenida a través de procesos de cultivación que varían de pequeña a gran escala. El proceso de cultivación puede ser, por ejemplo, cultivación sumergida, fermentación de estado sólido (SSF), y/o una combinación de los mismos.

Los microorganismos en la composición a base de microbio pueden estar en una forma activa o inactiva. Los microorganismos pueden estar en forma vegetativa, forma de spora o cualquier otra forma de propágulo microbiano, o una combinación de los mismos. Los productos a base de microbio pueden ser usados son estabilización, conservación, y almacenamiento adicionales. Ventajosamente, el uso directo de estos productos a base de microbio conserva una alta viabilidad de los microorganismos, reduce la posibilidad de contaminación de agentes extraños y microorganismos indeseables, y mantiene la actividad de los subproductos de crecimiento microbiano.

Producción Local de Productos a Base de Microbio

En modalidades preferidas de la presente invención, una instalación de crecimiento de microbio produce microorganismos frescos de alta densidad y/o subproductos de crecimiento microbiano de interés a una escala deseada. La instalación de crecimiento de microbio puede ubicarse en o cerca del sitio de aplicación. La instalación produce composiciones a base de microbio de alta densidad en cultivación en lotes, casi continua, o continua.

Las instalaciones de crecimiento de microbio distribuidas de la presente invención pueden ubicarse en la ubicación donde será usado el producto a base de microbio (por ejemplo, una mina) o cerca a la ubicación de uso. Por ejemplo, la instalación de crecimiento de microbio puede estar a menos de 300, 250, 200, 150, 100, 75, 50, 25, 15, 10, 5, 3, o 1 milla de la ubicación de uso.

Debido a que el producto a base de microbio es generado localmente, sin recurso a los procesos de estabilización, conservación, almacenamiento y transporte de microorganismo de producción microbiana convencional, se puede generar una densidad mucho mayor de microbios vivos en un estado vegetativo o de propágulo, requiriendo de esta forma un volumen menor del producto a base de microbio para uso en la aplicación en el sitio o lo cual permite aplicaciones

microbianas de mucha mayor densidad donde sea necesario lograr la eficacia deseada. Esto permite un biorreactor reducido (por ejemplo, tanque de fermentación más pequeño, suministros más pequeños de material de inicio, nutrientes, agentes de control de pH, y agentes desespumantes) sin razón para estabilizar las células o separarlas de su caldo de cultivo, lo cual hace al sistema eficiente y facilita la transportabilidad del producto.

La generación local del producto a base de microbio también facilita la inclusión del caldo de crecimiento en el producto. El caldo puede contener agentes producidos durante la fermentación que son particularmente bien adecuados para uso local.

Los cultivos de microbios robustos, localmente producidos y de alta densidad, son más efectivos en el campo que aquellos que se han sometido a estabilización celular vegetativa o que se han sentado en la cadena de suministro por algún tiempo. Los productos a base de microbio de la presente invención son particularmente ventajosos en comparación con productos tradicionales en donde las células han sido separadas de los metabolitos y nutrientes presentes en el medio de crecimiento de fermentación. Los tiempos de transporte reducidos permiten la producción y entrega de lotes frescos de microbios y/o sus metabolitos al momento y volumen requerido por la demanda local.

Las instalaciones de crecimiento de microbio de la presente invención producen composiciones frescas a base de microbio, que comprenden los microbios como tal, metabolitos microbianos, y/u otros componentes del caldo en el cual han crecido los microbios. Si se desea, las composiciones pueden tener una alta densidad de células vegetativas o una mezcla de células vegetativas, esporas reproductivas, conidios, y/o micelios.

Ventajosamente, las composiciones se pueden adaptar para uso en una ubicación específica. En una modalidad, la instalación de crecimiento de microbio

está ubicada en, o cerca, de un sitio donde serán usados los productos a base de microbio.

Ventajosamente, estas instalaciones de crecimiento de microbio suministran una solución al problema actual de depender de productores lejanos de tamaño industrial cuya calidad del producto sufre debido a los retrasos de procesamiento, embotellamientos de la cadena de suministro, almacenamiento inadecuado, y otras contingencias que inhiben la entrega y aplicación a tiempo de, por ejemplo, un producto viable con conteo celular alto y el caldo asociado y los metabolitos en los cuales se crecieron originalmente las células.

Ventajosamente, en modalidades preferidas, los sistemas de la presente invención aprovechan la potencia de los microorganismos locales que ocurren naturalmente y sus subproductos metabólicos para mejorar la producción de petróleo. Las instalaciones de crecimiento de microbios suministran versatilidad de fabricación mediante la capacidad de adaptar los productos a base de microbio para mejorar la sinergia con las geografías de destino. Los microbios locales pueden ser identificados con base en, por ejemplo, tolerancia a la sal, y la capacidad de crecer a altas temperaturas.

El tiempo de cultivación para los recipientes individuales puede ser, por ejemplo, de 1 a 7 días o más. El producto de cultivación puede ser cosechado en cualquiera de un número de formas diferentes.

La producción local y la entrega dentro de, por ejemplo, 24 horas de fermentación resulta en composiciones puras con densidad celular alta y costos de envío sustancialmente menores. Dados los prospectos para el avance rápido en el desarrollo de inoculantes microbianos más efectivos y poderosos, los consumidores se beneficiarán en gran medida de esta capacidad de entregar rápidamente productos a base de microbio.

En una modalidad, la composición de acuerdo con la presente invención es obtenida mediante procesos de cultivación que varían de escalas pequeñas (por

ejemplo, de laboratorio) a grandes (por ejemplo, industriales). Estos procesos de cultivación incluyen, pero no se limitan a, cultivación/fermentación sumergida, fermentación de estado sólido (SSF), y combinaciones de éstos.

Ventajosamente, los productos a base de microbio pueden ser producidos en ubicaciones remotas. Las instalaciones de crecimiento de microbio pueden operar fuera de la red mediante el uso de, por ejemplo, energía solar, eólica, y/o hidroeléctrica.

Recuperación Mejorada de Petróleo y Gas y Degradación y Recuperación Mejorada de Polímero

En una modalidad, la presente invención suministra un método para mejorar el desempeño de pozos de petróleo y gas, o mejorar la recuperación de petróleo y gas, al mejorar la degradación de aditivos poliméricos utilizados en fluidos de fracturación, como recubrimientos de apuntalantes, o bolas de fracturación.

El método también puede ser útil para completar el pozo, particularmente en operaciones de fracturación, así como restauración de la salud de las formaciones de petróleo y gas (es decir, rejuvenecimiento de formaciones antiguas fracturadas). Por ejemplo, las presentes composiciones y métodos pueden ayudar en la reparación de daño de la formación en las áreas que rodean un pozo, y pueden remediar polímeros (por ejemplo, PLA y PGA) y biopolímeros (por ejemplo, goma de guar y goma de xantano) que fueron dejados de las operaciones previas de fracturación. Así, los canales taponados pueden ser abiertos dentro de formaciones para permitir oportunidades adicionales de fracturación.

En una modalidad, el método comprende aplicar una composición que comprende una o más cepas de microorganismos, y/o un subproducto de crecimiento de los mismos, a un pozo petrolero que se somete a tratamiento de fracturación hidráulica. El subproducto de crecimiento puede ser cualquier metabolito microbiano, tal como, por ejemplo, un biotensoactivo, un solvente y/o una

enzima. Este método puede ser aplicado a pozos verticales, así como a pozos horizontales.

Preferiblemente, los microbios de la composición a base de microbio y/o sus subproductos de crecimiento pueden digerir rápidamente polímeros, tales como PLA o PGA; así, el método puede mejorar la capacidad de recuperar recursos de hidrocarburo al reducir la acumulación de PLA, PGA, u otros polímeros y/o resinas dentro de las fracturas y pozos de fracturación.

En una modalidad, el microorganismo es una levadura, por ejemplo, *Wickerhamomyces anomalus* y/o *Starmerella bombicola*. En una modalidad, el microorganismo es una bacteria, tal como, por ejemplo, una especie de bacteria clado *Bacillus*. En una modalidad, se utiliza una combinación de microorganismos en la composición a base de microbio. El microbio puede ser vivo (o viable), o en forma de spora, al momento de la aplicación.

Los microorganismos pueden crecer *in situ* y producir compuestos activos en el sitio. En consecuencia, se puede lograr fácilmente y de forma continua una alta concentración de, por ejemplo, biotensoactivo, solvente, y/o enzima, y microorganismos productores de biotensoactivo en el sitio de tratamiento (por ejemplo, un pozo petrolero).

El método puede además comprender adicionar materiales para mejorar el crecimiento de microbios y/o la germinación durante la aplicación (por ejemplo, adicionar nutrientes para promover el crecimiento microbiano y/o mejoradores de germinación). En una modalidad, las fuentes de nutriente pueden incluir, por ejemplo, nitrógeno, nitrato, fósforo, magnesio y/o carbono. En una modalidad, los mejoradores de germinación pueden incluir, por ejemplo, L-alanina, L-valina, L-asparagina y/o manganeso en cantidades micromolares.

En una modalidad, el método puede además comprender adicionar enzimas degradadoras de polímero al sitio con el fin de mejorar la degradación de polímero.

El método puede ser realizado *in situ* al aplicar la composición y nutrientes opcionales y/u otros agentes directamente en un reservorio de petróleo o en fluido de fracturación.

En una modalidad, el tratamiento puede ser aplicado debajo de la carcasa de un pozo usando tubería estándar y/o tubería enrollada. Una bomba en la superficie del pozo fuerza el fluido de composición dentro de la formación, y la tubería ayuda a aislar diferentes zonas de fracturación de modo que todas las zonas dentro del pozo pueden ser alcanzadas. Algunos pozos pueden tener hasta 20 o más zonas de fracturación diferentes.

En una modalidad, la cantidad y concentración de la composición a base de microbio aplicada al pozo es determinada por la longitud de la zona de fracturación y la profundidad del pozo. Por ejemplo, el volumen de tratamiento aplicado puede variar de 300 galones a 3000 galones o más.

En una modalidad, el tratamiento es aplicado después que se completa la fracturación primaria, por ejemplo, hasta cinco o más años después. En otra modalidad, el tratamiento es aplicado una vez el pozo empieza a perder producción debido a la acumulación de polímero. En otra modalidad, el tratamiento es aplicado inmediatamente después que se ha completado la fracturación.

En una modalidad, el método puede además comprender el paso de aplicar calor al tratamiento de fracturación con el fin de acelerar más la tasa de degradación de polímero.

En una modalidad, la presente invención suministra métodos para producir una enzima degradadora de polímero al cultivar una cepa de microbio de la presente invención bajo condiciones adecuadas para el crecimiento y la producción de enzima; y opcionalmente, purificar la enzima.

Los métodos de la presente invención pueden ser usados para degradar una variedad de polímeros, particularmente aquellos usados como aditivos en fluidos de fracturación hidráulica. Ejemplos no limitantes de polímeros incluyen ácido

poliláctico, o poli(ácido láctico), o poliláctido (PLA), otros poliésteres, aditivos a base de guar, almidones, tereftalato de adipato de polibutileno (PBAT), polihidroxicanoatos (PHA), poliacrilamida (PAM), succinato de polibuteno (PBS), policaprolactona (PCL), ácido poliglicólico (PGA), polihidroxibutiratos (PHB) y/o mezclas de estos materiales. Las propiedades, incluyendo el tiempo de degradación bajo ambientes seleccionados, de dichos polímeros puede depender de la distribución de peso molecular, cristalinidad, copolímeros y aditivos.

En modalidades preferidas, la presente invención puede ser usada para degradar ácido poliláctico, o PLA. El PLA es un poliéster termoplástico biodegradable con un punto de ebullición de aproximadamente 150°C. Este es usado, por ejemplo, para hacer recipientes seguros para alimentos, partes moldeadas, películas, espumas, fibras, y como material para impresión en 3D. en la industria del petróleo y el gas, el PLA es usado como un aditivo en tratamientos de fracturación para aumentar la productividad de pozos de fracturación. Por ejemplo, las fibras de PLA son usadas para prevenir el retroceso de flujo de apuntalante, y las hojuelas de PLA y las bolas son usadas como reductores de fricción y quebradores.

En modalidades adicionales, la presente invención puede ser usada para degradar poliglicólico, o PGA. El PGA también es un poliéster termoplástico biodegradable con un punto de ebullición de aproximadamente 200°C. Este ha sido usado, por ejemplo, para hacer implantes médicos y portadores de entrega de medicamentos, así como suturas absorbibles. En la industria del petróleo y gas, el PGA ha sido usado como un agente liberador de tiempo para inhibidores de corrosión, un dispersante, un inhibidor de descomposición para lubricantes en equipos en movimiento, un agente desviador, o para disolver escala y prevenir la corrosión, o en la forma de bolas de fracturación para permitir la fracturación de zona.

PLA y PGA pueden derivarse de síntesis química o de recursos renovables, por ejemplo, de la fermentación de azúcar o almidón de maíz. PLA también puede ser producido de petróleo. Debido a las propiedades químicas de PLA y PGA, estos polímeros particulares pueden tomar días o incluso meses en degradarse usando, por ejemplo, agua u otros procesos naturales solos.

Así, la presente invención es ventajosa en que suministra composiciones y métodos para degradar, o mejorar la degradación de, polímeros tales como PLA o PGA que pueden acumularse en pozos de fracturación y disminuir la productividad de los pozos. Como se usa acá, “degradación mejorada” se refiere a disminuir el tiempo para que ocurra la degradación.

En una modalidad, la presente invención suministra métodos para recuperar, o traer a la superficie, sustancias poliméricas que permanecen en pozos de fracturación. Por ejemplo, los biotensoactivos producidos por métodos y microorganismos de la presente invención pueden reducir la tensión interfacial de fluidos. Así, los fluidos pueden luego ser usados para elevar las sustancias poliméricas de fracturación, tal como reductores de fricción de gel de poliacrilamida (PAM), con mayor facilidad y menos gasto de energía. En otra modalidad, los biotensoactivos pueden ser usados para escindir gel de PAM.

En otra modalidad, los productos y composiciones a base de microbio de la presente invención pueden ser usados en pozos que se someten a tratamientos de fracturación ácida. En fracturación ácida, ácidos tales como ácido clorhídrico, ácido fórmico, y ácido acético, son usados para grabar canales en la formación de roca de un pozo. Los desviadores son usados para crear barreras en ciertas perforaciones en la formación, dirigiendo así el ácido a otras áreas deseadas.

En una modalidad, se suministran métodos para remediar, es decir, degrada, ácidos y otros desviadores usados en tratamientos de ácido usando composiciones a base de microbio de la presente invención. En particular, se suministra un método para remediar desviadores de ácido benzoico, que comprende aplicar las

composiciones a base de microbio de la presente invención a un pozo que se somete a fracturación con ácido.

Las hojuelas y polvo de ácido benzoico son solubles en tolueno, xileno, alcohol, y algunos fluidos condensados, pero ellos se disuelven muy lentamente en agua o gas. El ácido benzoico a menudo es usado como un desviador debido a que es soluble en los fluidos encontrados normalmente en pozos; sin embargo, si no se dispersa o se mezcla bien, taponará las perforaciones. Cuando ocurre dicho tapón, este no se puede disolver rápidamente debido al flujo de fluido disminuido. Por ejemplo, los tapones de ácido benzoico pueden tomar seis meses o más en volver a productividad normal después de ser tratados con ácido benzoico.

EJEMPLOS

Se puede tener un mayor entendimiento de la presente invención y de sus varias ventajas a partir de los siguientes ejemplos, dados a modo de ilustración. Los siguientes ejemplos son ilustrativos de algunos de los métodos, aplicaciones, modalidades y variantes de la presente invención. Ellos no se deben considerar como limitantes de la invención. Se pueden hacer numerosos cambios y modificaciones con respecto a la invención.

EJEMPLO 1 – CULTIVACION DE PRODUCTOS DE LEVADURA *WICKERHAMOMYCES ANOMALUS* Y *STARMERELLA BOMBICOLA*

Se mantuvo cultivo de semilla al rayar cultivo líquido fresco en placa de agar de dextrosa de papa y creciendo el cultivo de semilla a 30°C por 3 días. Después, las placas de cultivo de semilla pueden ser almacenadas a 4°C por un máximo de 2 semanas.

Se utilizó medio YGSU para cultivar la levadura. Para *W. anomalus*, el pH inicial se ajustó a 5.5. El cultivo de semilla se transfirió de la placa de agar a un frasco de 1L con un volumen de trabajo de 200 mL. El cultivo fue cultivado en un

agitador a 30°C con una velocidad de agitación de 200 rpm. Después de 7 días, se observaron los biotensoactivos como una capa café de precipitado, con concentración de aproximadamente 4 g/L.

Para *S. bombicola*, el caldo de fermentación después de 5 días de cultivación a 25°C puede contener la suspensión celular de levadura y, por ejemplo, 100 g/L o más de biotensoactivo.

EJEMPLO 2 – TRATAMIENTO DE BOLAS DE PLA CON PRODUCTO DE LEVADURA

Como se muestra en las Figuras 1 y 2, los productos de fermentación de levadura pueden ser incubados con fluido de fracturación que contiene, por ejemplo, bolas PLA, por 24 horas. Una bola de PLA después de incubación con producto de fermentación de levadura fue disuelta completamente, mientras que cuando se incubó por el mismo periodo de tiempo con solo agua, únicamente ocurrió el 1% de disolución total (requiriendo aproximadamente un mes en disolverse completamente).