

P-2019/42214

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente No. **NC2019/0010273**

Solicitud de patente a nombre de **LOCUS OIL IP COMPANY, LLC**

Yo, CAROLINA DAZA MONTALVO identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, obrando como apoderada de la sociedad LOCUS OIL IP COMPANY, LLC, domiciliada en Ohio, Estados Unidos de América, solicitante de la patente de la referencia, en respuesta al oficio No. **10689** notificado electrónicamente el 12 de julio de 2021, relacionado con los requerimientos de fondo de la solicitud, atentamente me permito presentar la siguiente información:

1. Certificado de depósito del material biológico y Depósito de material biológico

El examinador ha indicado que *"De acuerdo con el artículo 26, literal j) de la Decisión 486, la solicitud de patente deberá contener entre otros elementos, el certificado de depósito del material biológico. En la presente solicitud se observa que el desarrollo de la invención involucra las cepas B1, B2 y B3 de Bacillus subtilis, por lo tanto, el solicitante debe:*

a. Allegar el certificado de depósito de Bacillus subtilis cepa B1 para verificar los datos de dicho certificado con respecto a los datos divulgados en la descripción de la solicitud (Pág. 25).

b. Indicar los depósitos y allegar los certificados de las cepas B2 y B3 puesto que corresponden a mutantes de la cepa B.1".

También indica *"La solicitud se refiere a un método para mejorar la cantidad de petróleo recuperable de una formación de petróleo, en donde el método comprende aplicar una bacteria de Bacillus subtilis de cepas B1, B2, o B3; lo cual es relativo a un material biológico, pero, la invención no está descrita de manera que pueda ser comprendida y*

ejecutada por una persona capacitada en la materia técnica. Se le recuerda al solicitante que los depósitos de las cepas B2 y B3 deben ser conforme a lo dispuesto en el Art. 29 D. 486."

En este respecto, debe tenerse en cuenta que las reivindicaciones, en su forma modificada, no incluyen el microbio *Bacillus subtilis* B1. No obstante, se adjunta a este memorial la copia del certificado de depósito. Además, debe tenerse en cuenta que las cepas B2 y B3 no se han depositado y el solicitante no tiene la intención de incluir estos microbios en las reivindicaciones. Por tanto, se ven superadas dichas objeciones.

2. Modificación al Título de la Solicitud

Respecto al requerimiento del examinador solicitando una modificación al título de la presente solicitud, se solicita amablemente que dicho título sea reemplazado por:

"MÉTODOS PARA MEJORAR LA RECUPERACIÓN DE PETRÓLEO"

3. Modificaciones a las Reivindicaciones y Claridad

Con fundamento en la facultad que confiere el artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, presento junto con este memorial nuevo capítulo reivindicatorio, el cual consta de doce (12) reivindicaciones y reemplaza completamente el capítulo presentado anteriormente. Las modificaciones realizadas se presentan a continuación:

3.1 Se ha modificado la reivindicación 1, incluyendo las características de las antiguas reivindicaciones 7, 12, 16, 17, 19, y 20, y se eliminó la expresión *"aplicar una bacteria productora de biotensoactivo y un subproducto de crecimiento de la misma, a la formación, en donde la bacteria es inactivada"*, con el fin de definir la materia a proteger y así superar las objeciones del examinador.

3.2 Se ha modificado la antigua reivindicación 24 (nueva reivindicación 11), incluyendo las características de las antiguas reivindicaciones 25, 27, 28, 31 y 32, con el fin de definir la materia a proteger.

3.3 Se ha modificado la antigua reivindicación 29 (nueva reivindicación 12), eliminando la expresión *"un subproducto de crecimiento microbiano"*, con el fin de superar las objeciones del examinador.

3.4 Se eliminaron las antiguas reivindicaciones 2 a 6, 11, 15, 26, y 33 a 35, de acuerdo con las modificaciones realizadas a las reivindicaciones independientes.

3.5 Las reivindicaciones restantes, así como sus dependencias, fueron reenumeradas.

En cuanto a estas modificaciones, me permito decir que las mismas no amplían de ninguna manera la materia objeto de la presente solicitud y se realizaron con el ánimo de superar las objeciones de claridad y patentabilidad planteadas por el examinador en su concepto técnico.

En consecuencia, nos permitimos indicar que el presente capítulo reivindicatorio, que incluye doce (12) reivindicaciones, se ajusta a las disposiciones del artículo 30 de la Decisión 486/00.

4. Descripción

El examinador ha indicado *"La descripción no divulga la invención de manera suficientemente completa para que la persona normalmente versada en la materia técnica correspondiente pueda ejecutarla, porque el método que comprende las cepas B2 y B3 de Bacillus subtilis no puede ser reproducido al no ser posible determinar las mutaciones presentadas en estas cepas con respecto a la cepa B1. y*

- Las unidades de medida "°F y galones" (por ejemplo, en la Pág. 29 y 30) no corresponden a la manera correcta de referirse a las unidades establecidas por el Sistema Internacional de Medidas, por lo tanto, se solicita hacer las modificaciones respectivas a lo largo de la memoria descriptiva (°C y L)."

En este respecto, se han eliminado de las reivindicaciones las referencias a las cepas B1, B2 y B3, por tanto, dicha objeción se supera.

Con respecto a las unidades mencionadas, se realiza la conversión al Sistema Internacional de Medidas de acuerdo con las sugerencias del examinador en las páginas 29, 30, 31, 36, 37 y 48. Por lo cual, se adjunta un nuevo capítulo descriptivo.

5. Pago de tasas

En relación con el número de reivindicaciones, atentamente nos permitimos decir que no se adjunta tasa por concepto de reivindicaciones adicionales, toda vez que el nuevo capítulo reivindicatorio tiene un menor número de reivindicaciones a las presentadas previamente, y en esencia es el mismo objeto, pero definido con mayor claridad.

Por otra parte, me permito adjuntar recibo por concepto de pago de tasa de modificación a las reivindicaciones y descripción, según lo establecido en la **Resolución No. 59669 de 2020**.

6. Novedad y Nivel Inventivo

El examinador establece que las reivindicaciones 1 a 3 y 5 a 10 carecen de novedad a la luz de las enseñanzas del documento WO2017/044953 (D1).

Adicionalmente, el examinador establece que las reivindicaciones 11 a 35 carecen de nivel inventivo a la luz de las enseñanzas descritas en los documentos WO2017/044953 (D1) y Elshafie, A. E., et al; *Frontiers in Microbiology* (D2).

A este respecto, me permito decir que el artículo 16 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece que la invención se considera nueva cuando no está comprendida en el estado de la técnica. Si de acuerdo con el espíritu de la norma legal indicada, la invención no se considera como nueva si está "*comprendida*" en el estado de la técnica, dicha norma se está refiriendo, naturalmente, a la totalidad del invento y no a alguno o a algunos de los componentes.

Aplicando lo anterior al caso concreto, para que las razones que aduce ese Despacho para desvirtuar la novedad fuesen ciertas, sería forzoso que se demostrara que la invención está comprendida en el estado de la técnica, específicamente en forma individual en el documento D1 de forma TOTAL, lo cual no sucede con la materia reclamada en el nuevo capítulo reivindicatorio.

Por lo tanto y teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, como mínimo la novedad debe contemplar los siguientes aspectos:

- Que la invención en estudio esté contenida de forma TOTAL y ABSOLUTA en cada uno de los documentos que se mencionan como anterioridades; y

- Que la invención en cuestión puede partir de conocimientos conocidos, caso en el cual habrá que hacer la comparación no de lo conocido sino de lo inédito y novedoso, teniendo que analizarse el valor agregado que aporta la invención con sus nuevas características al campo técnico al cual pertenece la solicitud en estudio.

En cuanto al nivel inventivo, me permito decir que el artículo 18 de la Decisión 486 establece que *"Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica"*.

Lo anterior significa que el análisis de nivel inventivo **NO** es una comparación de los objetos de las anterioridades y la solicitud en estudio. El análisis de nivel inventivo **debe demostrar** la obviedad de la invención y establecer cómo ésta no contiene un salto cualitativo, que demuestre su altura inventiva, teniendo en cuenta que se hace **necesario demostrar** que la invención analizada carece de nivel inventivo y hubiese sido obvia para una persona versada en la materia.

De acuerdo con lo anterior, la solicitante desea manifestar respetuosamente su desacuerdo, ya que teniendo en cuenta las modificaciones presentadas en el nuevo capítulo reivindicatorio, se superan las objeciones realizadas, por cuanto **dichas características no se encuentran divulgadas individualmente en los documentos citados por el examinador**, de acuerdo con los siguientes argumentos:

En primer lugar, ninguna de las referencias enseña la aplicación de un producto de fermentación de levadura que comprende células inactivadas de *S. bombicola* o *W. anomalus* y caldo de fermentación, junto con hidróxido de amonio, un solvente seleccionado entre alcohol isopropílico y etanol, y un agente quelante seleccionado entre ácido cítrico, citrato de sodio y EDTA, como se indica en las presentes reivindicaciones.

Además, aunque D1 generalmente enseña la administración de un microbio *Starmarella* a una formación junto con un microbio de la serie B de *Bacillus subtilis* en la reivindicación 25, los métodos de D1 incluyen necesariamente el microbio de la serie B de *B. subtilis* y/o subproductos de crecimiento del mismo. Las presentes reivindicaciones no mencionan la aplicación de ninguna bacteria o sus subproductos de crecimiento a la formación. Las presentes reivindicaciones utilizan levaduras, no bacterias, y exudan específicamente la aplicación de microbios vivos/activos. Por lo

tanto, no habría ninguna motivación para modificar las enseñanzas de D1 para llegar a las presentes reivindicaciones.

Además, D2 enseña solo composiciones libres de células, en lugar de productos de fermentación de levadura que comprenden células inactivadas. Ver la página 3, "El estudio se llevó a cabo ... utilizando caldo de biosurfactante libre de células...". Las presentes reivindicaciones incluyen células de levadura inactivas con el caldo, sin extracción del biosurfactante. Las ventajas de usar el cultivo en lugar de solo el biosurfactante son proporcionadas, por ejemplo, en la página 24, líneas 5-9 de la solicitud PCT. Por lo tanto, las presentes reivindicaciones no serían obvias sobre D2.

De esta forma, teniendo en cuenta que los documentos D1 y D2 **no mencionan, describen o sugieren**, en forma individual o en combinación, todas las características técnicas reclamadas como se describen en la presente invención, **dichas reivindicaciones son novedosas, e inventivas sobre el estado del arte**.

En este sentido, y siguiendo el Manual Andino de Patentes, la presente invención tal y como se encuentra definida en las reivindicaciones 1 a 12, tiene diferencias con el estado del arte e implicó un nivel inventivo durante su desarrollo, por lo cual debe ser considerada como novedosa e inventiva según las disposiciones de los artículos 16 y 18 de la Decisión 486.

7. Conclusión

Con las modificaciones introducidas y los argumentos presentados puede concluirse que:

- i) La presente solicitud es clara, concisa y está debidamente soportada en la descripción, cumpliendo con los requerimientos del Artículo 30 de la Decisión 486; y
- ii) Las reivindicaciones actuales son patentables sobre D1 y D2, cumpliendo así con los requerimientos de los Artículos 16 y 18 de la Decisión 486.

Por tanto, atentamente me permito solicitar a ese Despacho otorgar el privilegio de patente solicitado a la solicitud en estudio, toda vez que cumple a cabalidad con los requerimientos de la Decisión 486/00.

En consecuencia, solicitamos a ese Despacho pronunciarse en relación con todos los argumentos presentados en este memorial dando estricta aplicación al principio del debido proceso consagrado en el artículo 29 de la Constitución Nacional.

8. Anexos

- Nuevo capítulo reivindicatorio conformado por 12 reivindicaciones.
- Nuevo capítulo descriptivo.
- Copia del certificado de depósito para la cepa B1.
- Recibo de pago correspondiente a la Tasa de modificación a las reivindicaciones y descripción.

Señora Directora,



CAROLINA DAZA MONTALVO

C.C. 66.783.790 de Palmira Valle

TP-141563 CSJ

notificaciones@clarkemodet.com.co

REIVINDICACIONES MODIFICADAS

1. Un método para mejorar la cantidad de petróleo recuperable de una formación de petróleo, en donde el método comprende:
obtener un producto de fermentación de levadura que comprende una levadura de *Wickerhamomyces anomalus* o *Starmerella bombicola* y un caldo en el que se cultivó la levadura;
inactivar la levadura;
aplicar el producto de fermentación de levadura a la formación;
aplicar hidróxido de amonio a la formación;
aplicar un solvente seleccionado entre alcohol isopropilo y etanol a la formación; y
aplicar un agente quelante seleccionado entre ácido cítrico, citrato de sodio y EDTA a la formación.
2. El método de la reivindicación 1, que además comprende administrar uno o más compuestos de polímero a la formación.
3. El método de la reivindicación 2, en donde el uno o más compuestos de polímero se seleccionan de goma de xantano, goma de guar, hidrogeles, polisacárido, y polímeros de celulosa.
4. El método de la reivindicación 1, que además comprende administrar uno o más co-tensoactivos no biológicos a la formación.
5. El método de la reivindicación 1, en donde el producto de fermentación de levadura comprende un biotensoactivo glicolípido.
6. El método de la reivindicación 5, en donde el biotensoactivo es un soforolípido.
7. El método de la reivindicación 1, en donde el producto de fermentación de levadura, hidróxido de amonio, solvente y agente quelante, cuando están presentes en la formación, mejoran la recuperación de petróleo y también disuelven los depósitos de incrustaciones presentes en la formación.

8. El método de la reivindicación 1, en donde el producto de fermentación de levadura es producido en una ubicación 300 millas (482.8 km) o menos de la formación.
9. El método de la reivindicación 1, que además comprende aplicar uno o más biotensoactivos purificados a la formación.
10. El método de la reivindicación 9, en donde el uno o más biotensoactivos purificados son glicolípidos.
11. Una composición que comprende:
un caldo resultante de la fermentación de una levadura de *Wickerhamomyces anomalus* o *Starmerella bombicola*;
células de levadura inactivadas;
hidróxido de amonio;
un solvente seleccionado entre alcohol isopropilo y etanol; y
un agente quelante seleccionado entre ácido cítrico, citrato de sodio y EDTA.
12. La composición de la reivindicación 11, que además comprende un biotensoactivo seleccionado de glicolípidos, lipopéptidos y fosfolípidos.

PRODUCTOS MICROBIANOS Y USOS DE LOS MISMOS PARA MEJORAR
LA RECUPERACIÓN DE PETRÓLEO

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUD RELACIONADA

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de Estados Unidos con No. de serie 62/483,425, presentada el 9 de abril de 2017, la cual es incorporada acá por referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La alta demanda por combustibles fósiles necesita la producción eficiente de petróleo. A medida que los pozos petroleros maduran, se vuelve más difícil y costoso continuar bombeando petróleo a una tasa económicamente viable. Por lo tanto, hay una necesidad por desarrollar métodos mejorados para recuperación de petróleo. Uno de dichos mecanismos utiliza microbios y sus
15 subproductos.

 El petróleo existe en poros pequeños y fisuras angostas dentro del cuerpo de rocas de reservorio por debajo de la superficie de la tierra. La presión natural del reservorio hace que el petróleo fluya hacia arriba a la superficie, suministrando de esta forma la producción primaria; sin embargo, a medida que
20 la producción de petróleo progresa, la presión del reservorio se agota a un punto en el cual se requiere elevación o bombeo artificial para mantener una tasa económica de producción de petróleo.

 Cuando es necesario suministrar energía externa para que el reservorio logre la recuperación adicional de petróleo (recuperación secundaria), la energía
25 extra puede ser introducida al inyectar gas (inyección de gas) y/o agua (inundación con agua). Después de algunos años de operación en un campo, los fluidos inyectados fluyen preferencialmente a lo largo de capas altamente permeables que hacen que estos fluidos se deriven de las áreas saturadas de petróleo en el reservorio. Por lo tanto, una cantidad en aumento de agua (o gas)

se eleva con el petróleo y, al disminuir la relación de petróleo a agua, eventualmente se vuelve antieconómico continuar el proceso; en ese momento el campo debe ser abandonado.

La recuperación primaria generalmente resulta en una recuperación promedio de únicamente una fracción del petróleo originalmente presente en una formación con petróleo. La recuperación secundaria, por ejemplo, inundación con agua, generalmente recupera otro 10% al momento que se vuelve antieconómico continuar. No es inusual que permanezca de 60 a 70% del petróleo originalmente en la formación, incluso después que la recuperación secundaria alcanza su límite económico. En esta situación, se puede considerar una tercera etapa de recuperación de petróleo, también denominada producción terciaria.

En esta etapa terciaria, se emplean métodos técnicamente avanzados para modificar las propiedades de los fluidos del reservorio o las características de la roca de reservorio. En general, los métodos pueden clasificarse en cuatro categorías principales: métodos térmicos, métodos químicos, inyección miscible o de solvente, y métodos microbianos.

La Recuperación Mejorada de Petróleo por Microbio (MEOR) es un campo multidisciplinario que incorpora, entre otros, geología, química, microbiología, mecánica de fluidos, ingeniería de petróleo, ingeniería ambiental e ingeniería química. MEOR usa microorganismos y/o sus metabolitos para mejorar la recuperación de petróleo. Los métodos microbianos usados en MEOR pueden dirigirse a la limpieza del pozo con el fin de remover lodo y otros escombros que bloquean los canales donde fluye el petróleo; la estimulación del pozo mejora el flujo de petróleo desde el área de drenaje dentro del pozo; y las inundaciones mejoradas de agua aumentan la actividad microbiana al inyectar microbios seleccionados, y algunas veces nutrientes.

En MEOR, los nutrientes y microbios adecuados, los cuales preferiblemente crecen bajo las condiciones anaeróbicas del reservorio, son

inyectados en el reservorio. Los subproductos microbianos, los cuales pueden incluir biotensoactivos, biopolímeros, ácidos, solventes, gases, y enzimas, por ejemplo, pueden modificar las propiedades del petróleo y las interacciones entre petróleo, agua, y el medio poroso, alterar la permeabilidad de las formaciones subterráneas, y por último aumentar la movilidad de la recuperación de petróleo.

El interés en tensoactivos microbianos ha estado aumentando constantemente en los últimos años debido a su diversidad, naturaleza amigable con el medio ambiente, posibilidad de producción a gran escala, selectividad, desempeño bajo condiciones extremas, y aplicaciones potenciales en protección ambiental. Los tensoactivos producidos microbianamente, es decir, biotensoactivos, reducen la tensión interfacial entre agua y petróleo y, por lo tanto, se requiere una presión hidrostática menor para mover el líquido atrapado en los poros para superar el efecto capilar. En segundo lugar, los biotensoactivos contribuyen a la formación de micelas que suministran un mecanismo físico para movilizar petróleo en una fase acuosa en movimiento.

Hay una necesidad continua por métodos mejorados para la recuperación de petróleo, métodos particulares que pueden ser mantenidos por periodos extendidos de tiempo. Esto incluye necesidades por métodos mejorados para la recuperación mejorada de petróleo, tales como métodos que usan, por ejemplo, microorganismos y/o sus subproductos de crecimiento. Los biotensoactivos mejoran la emulsificación de hidrocarburos, tienen el potencial de solubilizar contaminantes de hidrocarburos y aumentan su disponibilidad por degradación microbiana. Estos compuestos también pueden ser usados en la recuperación mejorada de petróleo.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

En ciertas modalidades, la presente invención suministra microbios, así como sustancias, tales como biotensoactivos, solventes y/o enzimas, derivadas de estos microbios y el caldo de fermentación en el cual se producen. La presente

invención también suministra métodos para usar estos microbios y sus subproductos en la producción mejorada de petróleo.

Específicamente, la presente invención suministra acercamientos efectivos en costos y amigables con el medio ambiente para mejorar la
5 recuperación de petróleo. Ventajosamente, estos métodos pueden ser practicados sobre un amplio rango de temperaturas, incluyendo de 20 a 70°C, y mayores.

En algunas modalidades, la presente invención suministra materiales y métodos para mejorar la producción de petróleo al tratar un sitio productor de
10 petróleo, por ejemplo, una formación de petróleo o un pozo petrolero, con microorganismos y/o sus subproductos de crecimiento. En una modalidad, la presente invención puede ser útil para mejorar la recuperación de petróleo a partir de un pozo petróleo, por ejemplo, al estimular el flujo de petróleo desde el pozo mientras se disuelven incrustaciones dentro de la formación.

15 En algunas modalidades, la presente invención utiliza subproductos de crecimiento de levadura, tales como, por ejemplo, biotensoactivos. Los biotensoactivos son útiles en la industria de petróleo y gas por su capacidad de mejorar la recuperación de petróleo. Los biotensoactivos pueden mejorar las propiedades del petróleo y las interacciones entre petróleo, agua, y el medio
20 poroso en el cual se origina el petróleo y gas, aumentando de esta forma la movilidad, y consecuentemente, la recuperación de petróleo. Así, las composiciones y métodos de la presente invención pueden aumentar la recuperación de crudo y gas natural a partir de formaciones que contienen petróleo y gas al reducir dramáticamente tanto la tensión superficial como la
25 interfacial entre las sustancias dentro de las formaciones y al alterar la humectabilidad de las formaciones.

En una modalidad, la presente invención suministra productos de fermentación de levadura para mejorar la recuperación de petróleo a partir de una formación de petróleo. En una modalidad, el producto de fermentación de

levadura es obtenido por cultivación de levadura productora de biotensoactivo usando procesos 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. En una modalidad, los productos de levadura son cultivados usando una técnica de fermentación de levadura simplificada, la cual reduce el tiempo de cultivación en 50% y reduce la suplementación de fuente de carbono.

El producto de fermentación de levadura puede ser obtenido por medio de cultivación de una levadura productora de bioquímico, tal como, por ejemplo, *Pichia anomala* (*Wickerhamomyces anomalus*). 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 biotensoactivos glicolípidos.

El producto de fermentación de levadura también puede ser obtenido por cultivación de la levadura productora de biotensoactivo, *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, 150 g/L o más de biotensoactivos glicolípidos.

El producto de fermentación de levadura puede comprender el caldo de fermentación, separado de las células de levadura. En una modalidad, los biotensoactivos u otros subproductos de crecimiento en el caldo, son además separados del caldo y son purificados.

En algunas modalidades, la presente invención utiliza cepas de bacterias y subproductos de las mismas. Estos subproductos pueden incluir, por ejemplo, metabolitos, polímeros, biotensoactivos, enzimas, ácidos orgánicos, y solventes.

En ciertas modalidades, las bacterias son de cepas *Bacillus* que prosperan en ambientes de alta sal, tal como aquellos que a menudo se encuentran en un sitio de extracción de petróleo. En ciertas modalidades, las bacterias son cepas sobreproductoras de tensoactivo de *Bacillus*, lo que significa que dichas cepas se caracterizan por producción mejorada de biotensoactivo en comparación con

cepas *Bacillus* de tipo salvaje. En ciertas modalidades, las cepas *Bacillus* han aumentado la producción de enzimas.

En una modalidad, los microorganismos son cepas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, y/o *Bacillus amyoliquefaciens*. En modalidades preferidas, las bacterias están en forma de espora.

En algunas modalidades, las cepas de *Bacillus* son capaces de prosperar bajo condiciones de bajo oxígeno, facilitando de esta forma el crecimiento bajo condiciones microaerófilas y anaeróbicas. Bajo condiciones anaeróbicas, se pueden adicionar sales de nitrato para reemplazar oxígeno como un aceptador de electrones para soportar la respiración microaerófila y/o anaeróbica.

En una modalidad, las cepas *Bacillus subtilis* son, por ejemplo, *B. subtilis* var. *Locuses* cepas B1 y B2, las cuales son productoras efectivas de la surfactina de lipopéptido anfifílico.

En una modalidad, la presente invención suministra un método para mejorar la recuperación de petróleo al aplicar uno o más microorganismos capaces de producir subproductos bioquímicos útiles en un sitio productor de petróleo, por ejemplo, una formación de petróleo y/o un pozo petrolero. El método opcionalmente incluye adicionar nutrientes y/u otros agentes al sitio. En ciertas modalidades, los microorganismos son seleccionados de las cepas de *Bacillus*, incluyendo, pero no limitadas a, cepas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, y *Bacillus amyoliquefaciens*. En modalidades preferidas, las bacterias están en forma de espora.

El método también puede comprender adicionar un producto de fermentación de levadura, tal como el caldo de fermentación que resulta del cultivo de, por ejemplo, *Starmerella bombicola* o *Wickerhamomyces anomalus*. En una modalidad, las células de levadura pueden ser removidas del producto de fermentación de levadura y únicamente es aplicado el caldo que contiene biotensoactivos y otros exudados celulares. En una modalidad, el producto de

fermentación de levadura comprende biotensoactivos que han sido separados del caldo de fermentación y han sido purificados.

El método también puede comprender aplicar los microbios y/o subproductos de crecimiento microbiano con uno o más compuestos alcalinos.

- 5 El compuesto alcalino puede ser, por ejemplo, hidróxido de amonio.

En algunas modalidades, el método también puede comprender aplicar los microbios y/o subproductos de crecimiento microbiano con uno o más compuestos de polímero. Los compuestos de polímero pueden ser seleccionados de biopolímeros tales como, por ejemplo, hidrogeles, polisacáridos, goma de xantano, goma de guar, y polímeros de celulosa.

En algunas modalidades, el método también puede comprender aplicar los microbios y/o subproductos de crecimiento microbiano con uno o más tensoactivos no biológicos. Los tensoactivos pueden ser, por ejemplo, aniónicos, catiónicos, no iónicos o zwitteriónicos.

- 15 En una modalidad, los microbios y/o subproductos de crecimiento microbiano pueden ser aplicados con uno o más agentes quelantes para reducir, por ejemplo, disolver, incrustaciones que se han acumulado dentro de una formación de petróleo. Los agentes quelantes pueden ser, por ejemplo, ácido cítrico, EDTA, citrato de sodio y/o una combinación de los mismos.

- 20 En una modalidad, los microorganismos pueden germinar y crecer *in situ* dentro de una formación de petróleo o pozo petrolero, y producir allí biotensoactivos. En consecuencia, se puede lograr fácilmente y de forma continua una alta concentración de biotensoactivos y microorganismos productores de biotensoactivos en un sitio de tratamiento (por ejemplo, un pozo petrolero).

25 En algunas modalidades, los presentes productos a base de microbio y métodos pueden además ser usados para la remoción de parafina, licuefacción de asfalto sólido, y biorremediación de aguas contaminadas con hidrocarburo, suelos y otros sitios. Para dichos usos, los métodos pueden además comprender

adicionar solventes, tales como alcohol de isopropilo o etanol, con los microbios y/o subproductos de crecimiento microbiano.

En una modalidad, la presente invención suministra métodos para producir un biotensoactivo al cultivar una cepa de microbio de la presente invención bajo condiciones adecuadas para el crecimiento y la producción de biotensoactivos; y purificar el biotensoactivo. La presente invención también suministra métodos para producir solventes, enzimas u otras proteínas al cultivar una cepa de microbio de la presente invención bajo condiciones adecuadas para el crecimiento y la expresión de solvente, enzima y proteína; y purificar el solvente, enzima u otra proteína.

Los productos a base de microbio de la presente invención pueden ser usados en una variedad de configuraciones únicas debido a, por ejemplo, la capacidad de entregar eficientemente caldo de fermentación fresco con metabolitos activos; una mezcla de células y caldo de fermentación; composiciones con una alta densidad de células; productos a base de microbio en orden corta; y productos a base de microbio en ubicaciones remotas.

Ventajosamente, la presente invención puede ser usada sin liberar grandes cantidades de compuestos inorgánicos en el ambiente. Adicionalmente, las composiciones y métodos reivindicados utilizan componentes que son biodegradables y toxicológicamente seguros. Así, la presente invención puede ser usada en la producción de petróleo y gas (y otras industrias) como un tratamiento amigable con el medio ambiente.

DESCRIPCION DETALLADA

En ciertas modalidades, la presente invención suministra microbios, así como sustancias, tal como biotensoactivos, solventes y/o enzimas, derivadas de estos microbios y el caldo de fermentación en el cual son producidas. La presente invención también suministra métodos para usar estos microbios y sus subproductos en la producción mejorada de petróleo.

Específicamente, la presente invención suministra acercamientos efectivos en costo y amigables con el medio ambiente para mejorar la recuperación de petróleo. Ventajosamente, estos métodos pueden ser llevados a cabo por un rango amplio de temperaturas, incluyendo de 20 a 70°C, y
5 mayores.

En algunas modalidades, la presente invención suministra materiales y métodos para mejorar la producción de petróleo al tratar un sitio productor de petróleo con microorganismos y/o sus subproductos de crecimiento. En una modalidad, la presente invención puede ser útil para mejorar la recuperación de
10 petróleo a partir de una formación de petróleo o un pozo petrolero al, por ejemplo, estimular el flujo de petróleo desde la formación o pozo mientras se disuelven las incrustaciones allí.

En algunas modalidades, la presente invención utiliza subproductos de crecimiento de levadura, tales como, por ejemplo, biotensoactivos. Los
15 biotensoactivos son útiles en la industria de petróleo y gas por su capacidad de mejorar la recuperación de petróleo. Los biotensoactivos pueden modificar las propiedades del petróleo y las interacciones entre petróleo, agua, y el medio poroso en el cual se origina el petróleo y gas, aumentando de esta forma la movilidad, y consecuentemente la recuperación de petróleo. Así, las
20 composiciones y métodos de la presente invención pueden aumentar la recuperación de crudo y gas natural a partir de formaciones que contienen petróleo y gas al reducir dramáticamente la tensión superficial y la interfacial entre las sustancias dentro de las formaciones y al alterar la humectabilidad de las formaciones.

25 En modalidades específicas, los métodos y composiciones descritos acá utilizan microorganismos para mejorar la recuperación de petróleo. Los microorganismos pueden mejorar la cantidad y calidad de petróleo recuperado a partir de reservorios de petróleo, incluyendo aquellos que son considerados

“maduros”. Además, los microorganismos pueden remover sustancias tóxicas de los sitios de producción de petróleo.

En algunas modalidades, la presente invención suministra materiales y métodos para mejorar la producción de petróleo al tratar un sitio productor de petróleo con microorganismos y/o sus subproductos de crecimiento. En una
5 modalidad, la presente invención puede ser útil para mejorar la recuperación de petróleo a partir de una formación de petróleo o un pozo petrolero, por ejemplo, al estimular el flujo de petróleo desde el pozo o formación.

En una modalidad, la presente invención suministra un método para
10 mejorar la recuperación de petróleo al aplicar uno o más microorganismos capaces de producir subproductos bioquímicos útiles a un sitio productor de petróleo, por ejemplo, una formación de petróleo y/o un pozo petrolero. El método opcionalmente incluye adicionar nutrientes y/u otros agentes al sitio. En ciertas modalidades, los microorganismos son seleccionados de cepas de
15 *Bacillus*, incluyendo, pero no limitados a, cepas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, y *Bacillus amyloliquefaciens*. En modalidades preferidas, las bacterias están en forma de espora.

En ciertas modalidades, las bacterias son cepas de *Bacillus* que prosperan en ambientes de alta sal, tal como los que a menudo se encuentran en un sitio
20 de extracción de petróleo. En ciertas modalidades, las bacterias son cepas sobreproductoras de tensoactivos de *Bacillus*, lo que significa que dichas cepas se caracterizan por una producción mejorada de biotensoactivo en comparación con cepas de *Bacillus* de tipo salvaje. En ciertas modalidades, las cepas de *Bacillus* tienen producción mejorada de enzimas.

25 El método también puede comprender adicionar productos de fermentación de levadura, tal como el caldo de fermentación que resulta del cultivo de levaduras productoras de bioquímicos, por ejemplo, *Starmerella bombicola* o *Wickerhamomyces anomalus*. En una modalidad, el producto de

fermentación de levadura comprende biotensoactivos purificados producidos por estas levaduras.

El método también puede comprender aplicar los microbios con uno o más compuestos alcalinos, polímeros, tensoactivos y/o agentes quelantes.

5

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.

10 Así, la composición a base de microbio puede comprender los microbios como tal y/o subproductos del crecimiento microbiano. Los microbios pueden estar en un estado vegetativo, en forma de espora, en forma de micelio, en cualquier otra forma de propágulo, o una mezcla de estos. Los microbios pueden ser plantónicos o en una forma de biopelícula, o una mezcla de ambos. Los

15 subproductos de crecimiento pueden ser, por ejemplo, metabolitos (por ejemplo, biotensoactivos), componentes de membrana celular, proteínas expresadas, y/u otros componentes celulares. Los microbios pueden estar intactos o lisados. Las células pueden ser ausentes, o 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 , $1 \times$

20 10^9 , 1×10^{10} , o 1×10^{11} o más células o 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 microorganismo nuevo y/o maduro, incluyendo pero no limitado a, células, conidio, quistes, esporas (por ejemplo, esporas reproductivas, endosporas y exosporas), micelios, papi.as

25 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 cultivo de microbio.

Alternativamente, el producto a base de microbio puede comprender ingredientes adicionales que han sido adicionados. Estos ingredientes adicionales pueden incluir, por ejemplo, estabilizantes, amortiguadores, portadores adecuados, tal como agua, soluciones de sal, o cualquier otro portador adecuado, nutrientes adicionados para soportar el crecimiento adicional microbiano, mejoradores de crecimiento no nutriente, tal 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 han sido procesados en alguna forma tal como, pero no limitado a, filtrado, centrifugación, lisado, secado, purificación y similares.

Como se usa acá, "cosechado" se refiere a remover algo o toda la composición a base de microbio de un recipiente de crecimiento.

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

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 descritas más adelante), es sustancialmente libre de otros compuestos, tal como material celular, con el cual está asociado en la naturaleza. Referencia a "aislado" en el contexto de una cepa de microorganismo 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. Un polinucleótido purificado o aislado (ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN)) es libre de los genes o secuencias que colindan con éste en su estado que ocurre naturalmente. Un polipéptido purificado o aislado es libre de los aminoácidos o secuencias que colindan con éste en su estado que ocurre naturalmente.

En ciertas modalidades, los compuestos purificados son por lo menos 60% en peso (peso seco) el compuesto de interés. Preferiblemente, la preparación es por lo menos 75%, más preferiblemente al menos 90%, y más preferiblemente al menos 99%, en peso del 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 medio de cualquier método estándar adecuado, por ejemplo, por cromatografía de columna, cromatografía de capa delgada, o análisis de cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC).

Un "metabolito" se refiere a cualquier sustancia producida por 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, acetil-CoA), o un producto final (por ejemplo, n-butanol) de metabolismo. Ejemplos de metabolitos pueden incluir, pero no se limitan a, enzimas, toxinas, ácidos, solventes, alcoholes, proteínas, carbohidratos, vitaminas, minerales, microelementos, aminoácidos, polímeros, y tensoactivos.

Por "modulado" significa alterar (aumentar o disminuir). Dichas alteraciones son detectadas por métodos estándar conocidos en el arte, tal como aquellos descritos acá.

Se entiende que los rangos provistos acá son taquigrafía para todos los valores dentro del rango. Por ejemplo, un rango de 1 a 50 se entiende que incluye cualquier número, combinación de números, o subrango del grupo que

consiste 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50 así como todos los valores decimales que intervienen 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 subrangos, los "subrangos anidados" que se extienden desde cualquier punto de extremo 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.

Por "reducidos" se entiende una alteración negativa de por lo menos 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, o 100%.

Por "referencia" se entiende una condición estándar o de control.

Por "tolerante a la sal" se entiende una cepa microbiana capaz de crecer en una concentración de cloruro de sodio de quince (15) por ciento o mayor. En una modalidad específica, "tolerante a la sal" se refiere a la capacidad de crecer en 150 g/L o más de NaCl.

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

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".

Como se usa acá, "producción de petróleo" se refiere a cualquiera y todas las operaciones involucradas en la extracción de hidrocarburos tal como crudo o

gas natural, a partir de una formación a través de su procesamiento eventual y el uso por consumidores. La producción de petróleo puede incluir, pero no se limita a, perforación, bombeo, recuperación, transmisión, procesamiento, refinación, transporte, y almacenamiento de hidrocarburos.

5 Un "sitio de producción de petróleo" se refiere a cualquier ambiente o estructura, bien sea que ocurre naturalmente o hecha por el hombre, en donde ocurre uno o más aspectos de recuperación de hidrocarburo, petróleo y/o gas natural, incluyendo pero no limitado a, formaciones subterráneas, formaciones que contienen petróleo y gas, pozos.

10 Como se usa acá, "incrustaciones" se refiere a acumulaciones formadas por, por ejemplo, depósitos de sales minerales precipitadas, las cuales pueden surgir como resultado de, por ejemplo, cambios en la presión, composición y/o temperatura de petróleo crudo. Las incrustaciones pueden resultar de precipitados de, por ejemplo, sulfato de bario, carbonato de calcio, sulfato de
15 estroncio, sulfato de calcio, cloruro de sodio, dióxido de silicio, sulfuro de hierro, óxidos de hierro, carbonato de hierro, silicatos, fosfatos y óxidos, o cualquiera de un número de compuestos que son insolubles o ligeramente solubles en agua.

 Como se usa acá, "recuperación mejorada de petróleo" incluye mejorar la recuperación de petróleo e hidrocarburos, y significa aumentar la cantidad de
20 hidrocarburos producidos y/o aumentar la tasa a la cual ellos son producidos, por ejemplo, al estimular el flujo de petróleo desde el pozo.

 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
25 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
5 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
10 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.

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
15 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
20 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.

25 **Subproductos de Crecimiento Microbiano de Acuerdo con la Presente Invención**

En modalidades preferidas, se suministra una composición para mejorar la recuperación de petróleo de un sitio de producción de petróleo, en donde la composición comprende uno o más microorganismos y/o subproductos de

crecimiento de los mismos. En modalidades específicas, los microorganismos son capaces de, y son usados para, producir uno o más biotensoactivos.

Los biotensoactivos son un grupo estructuralmente diverso de sustancias activas en superficie producidas por microorganismos. Los biotensoactivos son biodegradables y pueden ser producidos de forma fácil y económica usando organismos seleccionados en sustratos renovables. La mayoría de los organismos productores de biotensoactivos producen biotensoactivos en respuesta a la presencia de una fuente de hidrocarburo (por ejemplo, aceites, azúcar, glicerol, etc.) en el medio de crecimiento. Otros componentes de medio tal como concentración de hierro pueden también afectar significativamente la producción de biotensoactivo.

Todos los biotensoactivos son anfifílicos. Ellos consisten de dos partes: una porción polar (hidrófila) y un grupo no polar (hidrófoba). Debido a su estructura anfifílica, los biotensoactivos aumentan el área superficial de sustancias hidrófobas insolubles en agua, aumentan la biodisponibilidad de agua de dichas sustancias, y cambian las propiedades de las superficies celulares bacterianas.

Los biotensoactivos se acumulan en las interfaces, reduciendo así la tensión interfacial y llevando a la formación de estructuras micelares agregadas en solución. La disponibilidad de los biotensoactivos para formar poros y desestabilizar las membranas biológicas permite su uso como agentes antibacteriales, antifúngicos, y hemolíticos. Combinado con las características de baja toxicidad y biodegradabilidad, los biotensoactivos son ventajosos para uso en la industria del petróleo y gas para una variedad de aplicaciones. Estas aplicaciones incluyen, pero no se limitan a, mejora de la recuperación de petróleo crudo; reducción de viscosidad del petróleo; remoción de parafina de varillas, tubería, revestimientos, y bombas; prevención de corrosión en el equipo de petróleo; fracturación de fluidos; reducción de concentración de H_2S en el petróleo crudo extraído; así como limpieza de tanques, línea de flujo y tuberías.

Los biotensoactivos microbianos seguros y efectivos reducen las tensiones superficial e interfacial entre las moléculas de líquidos, sólidos, y gases. Como se discute acá, esta actividad puede ser altamente ventajosa en el contexto de la recuperación de petróleo.

5 Los biotensoactivos producidos de acuerdo con la presente invención pueden ser utilizados para otros propósitos diferentes a recuperación de petróleo incluyendo, por ejemplo, limpieza de tuberías, reactores, y otras maquinarias o superficies.

Los biotensoactivos incluyen glicolípidos de bajo peso molecular (GL),
10 lipopéptidos (LP), flavolípidos (FL), fosfolípidos, y polímeros de alto peso molecular tales como lipoproteínas, complejos lipopolisacárido-proteína, y complejos de polisacárido-proteína-ácido graso. La cadena de hidrocarburo de un ácido graso actúa como la porción lipofílica común de una molécula de biotensoactivo, mientras que la parte hidrófila se forma por grupos éster o
15 alcohol de lípidos neutros, por el grupo carboxilato de ácidos grasos o aminoácidos (o péptidos), ácido orgánico en el caso de flavolípidos, o, en el caso de glicolípidos, por el carbohidrato.

En una modalidad, los biotensoactivos microbianos de acuerdo con la presente invención incluyen glicolípidos tales como ramolípidos (RLP),
20 soforolípidos (SLP), lípidos de trehalosa o lípidos de manosileritritol (MEL).

En una modalidad, el biotensoactivo microbiano es un lipopéptido, tal como, por ejemplo, surfactina o iturina A.

Los biotensoactivos microbianos son producidos por una variedad de microorganismos tales como bacterias, hongos, y levaduras. Microorganismos
25 ejemplares productores de biotensoactivo incluyen especies *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. syringae*); *Pseudozyma* (*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 así sucesivamente. Los biotensoactivos pueden ser obtenidos por procesos de fermentación conocidos en el arte.

Crecimiento de Microbios de Acuerdo con la Presente Invención

La presente invención utiliza métodos para cultivo de microorganismos y producción de metabolitos microbianos y/u otros subprocesos del 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. Los sistemas de cultivación microbianos típicamente utilizan fermentación de cultivo sumergido; sin embargo, también se pueden usar 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 técnicas conocidas en el arte, tal como técnica de dilución en placas. La dilución en placas es una técnica simple usada para calcular el número de bacterias en una muestra. La técnica también puede suministrar un índice por el cual se pueden comparar 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, nitrato de amonio, sulfato 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 de 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 salvado de arroz, aceite de oliva, aceite de canola, aceite de coco, aceite de maíz, aceite de ajonjolí, y/o

aceite de linaza. 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 los nutrientes de traza para microorganismos están incluidos en el medio. Esto es particularmente preferido cuando se crecen microbios que son incapaces de producir todas las vitaminas que ellos requieren. Los nutrientes inorgánicos, incluyendo elementos de traza tales como hierro, zinc, cobre, manganeso, molibdeno y/o cobalto pueden también estar incluidos en el medio. Además, fuentes de vitaminas, aminoácidos esenciales, y microelementos pueden ser incluidos, por ejemplo, en la forma de harinas, 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 formas purificadas. 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. Los agentes antimicrobianos o antibióticos pueden ser usados para proteger el cultivo contra contaminación. Adicionalmente, también se pueden adicionar 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, tales como carbonatos y fosfatos, pueden ser usados para estabilizar el pH cercano a un valor preferido. Cuando hay presentes iones de metal 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 llevados a cabo en un proceso por lotes, casi continuo, o continuo.

Los microbios se pueden crecer en una forma plantónica o como una biopelícula. En el caso de biopelícula, el recipiente puede tener dentro del mismo un sustrato con el cual se pueden crecer los microbios en un estado de biopelícula. El sistema también puede tener, por ejemplo, la capacidad de aplicar estímulo (tal como esfuerzo cortante) que fomenta 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 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 sujeta 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 estar separado de, pero conectado a, una unidad esterilizadora, por ejemplo, un autoclave. El equipo de cultivación también puede tener una unidad esterilizadora 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 la actividad

con poca agua y pH bajo se pueden explotar 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
5 caldo es de 10 g/l a 150 g/l.

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

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

En una modalidad, toda la composición de cultivación microbiana es
20 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
25 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 célula o contener células. De esta forma, se crea un sistema casi continuo.

Ventajosamente, el método no requiere equipos complicados o alto consumo de energía. Los microorganismos de interés pueden ser cultivados a pequeña o gran escala en el sitio y ser utilizados, incluso estando aún mezclados con otro medio. De forma similar, los metabolitos microbianos pueden también
5 ser producidos en grandes cantidades en el sitio de necesidad.

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

10 Los microorganismos útiles de acuerdo con los sistemas y método 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 transformarse con genes
15 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 variaciones genéticas (por
ejemplo, una mutación de punto, mutación sin sentido, eliminación, duplicación, mutación de desplazamiento de marco o expansión repetida) en comparación
20 con el microorganismo de referencia. Los procedimientos para hacer mutantes son bien conocidos en la técnica microbiológica. Por ejemplo, mutagénesis UV y nitrosoguanidina son usados extensivamente hacia este propósito.

En una modalidad, los microorganismos son bacterias, incluyendo bacterias grampositivas y gramnegativas. Las bacterias pueden ser bacterias
25 formadoras de endosporas o exosporas. Las bacterias pueden ser, por ejemplo, *Agrobacterium radiobacter*, *Alcanivora borkumensis*, *Azobacter* (*A. vinelandii*, *A. chroococcum*), *Azospirillum brasiliensis*, *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*), *Lactobacillus fermentum*, *Nocardia sp.*, *Pseudomonas* (*P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* (Kluyver), *P. aeruginosa*), *Rhizobium*, *Rhodospirillum rubrum*. *Sphingomonas paucimobilis*, *Ralstonia eulropha*, *Serratia marcescens* y/o *Tsukamurella sp.*

5 En modalidades preferidas, el microorganismo es una cepa de *Bacillus* seleccionada de las especies *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* y *B. licheniformis*. Aún más preferiblemente, la cepa de *Bacillus* está en forma de espora.

 En ciertas modalidades, la presente invención utiliza cepas de *Bacillus subtilis* con producción mejorada de biotensoactivo en comparación con *Bacillus*
10 *subtilis* de tipo salvaje, así como en comparación con otros microbios usados en la recuperación de petróleo. En ciertas modalidades, las cepas de *Bacillus subtilis* tienen producción aumentada de biopolímero, solvente y/o enzimas. Dichos *Bacillus subtilis* ha sido denominados miembros de la serie B, incluyendo, pero no limitado a, B1, B2 y B3.

15 En una modalidad, el microorganismo es *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.

20 Un cultivo del microbio *B. subtilis* B1 ha sido depositado con la Recolección 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. PTA-123459 por el depositario y fue depositado el 30 de agosto de 2016.

 Las células vegetativas de *Bacillus subtilis* cepa B1 son barras que son 0.7
25 a 0.9 μm de ancho por 1.6 a 3.3 μm de largo y ocurren individualmente. Es móvil, grampositivo y produce biopolímeros en nutriente agar y agar de dextrosa de papa. También produce esporas elipsoides centralmente o paracentralmente en esporangios no hinchados. El tamaño de las esporas maduras es 0.8 a 1.0 μm de ancho por 1.6 a 1.9 μm de largo. Las colonias de agar son color

crema/beige, elevadas, mucosas, circulares, completas, suaves, brillantes y tienen 3.0 a 7.0 en diámetro después de 16 horas a 40°C en placa de nutriente agar. Es un aerobio facultativo con un rango de temperatura de crecimiento de 25-55°C, con temperatura de crecimiento opcional a 35°C. Hidroliza almidón, es positivo en prueba de Voges-Proskauer, puede utilizar citrato y puede crecer con 15% de NaCl.

En ciertas modalidades, las cepas de *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. Dados sitios geográficos a ser tratados, zinc, bromo, hierro, o litio están presentes en la composición o sitio. En modalidades preferidas, las bacterias descritas acá son tolerantes a NaCl así como otras de las sales anteriormente mencionadas y son, por lo tanto, ampliamente útiles para la recuperación de petróleo.

En algunas modalidades, las cepas de *Bacillus subtilis* son capaces de prosperar bajo condiciones de bajo oxígeno. En algunas modalidades, la cepa de *Bacillus subtilis* se crece bajo condiciones microaerófilas o anaeróbicas. Bajo condiciones microaerófilas y/o anaeróbicas, se pueden adicionar sales de nitrato para reemplazar el oxígeno como el aceptador de electrones para soportar la respiración anaeróbica.

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

En una modalidad, los presentes métodos pueden utilizar productos de la fermentación de levaduras u hongos. Las especies de levadura y hongo adecuadas para uso de acuerdo con la presente invención, incluyen, por ejemplo, *Candida*, *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, *S. boulardii* *sequela*, *S. torula*),
5 *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Wickerhamomyces* (por ejemplo, *W. anomalous*), *Starmerella* (por ejemplo, *S. bombicola*), *Rhodotorula* (por ejemplo, *R. glutinous* y *R. graminus*), *Mycorrhiza*, *Mortierella*, *Phycomyces*, *Blakeslea*, *Thraustochytrium*, *Phythium*, *Entomophthora*, *Aureobasidium pullulans*, *Pseudozyma aphidis*, *Aspergillus*, y/o *Rhizopus spp.*

10 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 tóxicas o glicoproteínas, a las cuales la cepa como tal es inmune. Las exotoxinas secretadas por las levaduras asesinas son capaces de matar otras cepas de levadura, hongo, o bacteria. Por ejemplo, microorganismos que pueden
15 ser controlados por levadura asesina incluyen *Fusarium* y otros hongos filamentosos. Dichas levaduras pueden incluir, pero no se limitan a, *Wickerhamomyces* (por ejemplo, *W. anomalous*), *Pichia* (por ejemplo, *P. anomala*, *P. guilliermondii*, *P. occidentalis*, *P. kudriavzevii*), *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, (por ejemplo, *H. uvarum*), *Ustilago* (por
20 ejemplo, *U. maydis*), *Debaryomyces hansenii*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Torulopsis*, *Williopsis*, *Zygosaccharomyces* (por ejemplo, *Z. bailii*), y otros.

En una modalidad, el producto de fermentación de levadura puede ser obtenido por medio de cultivación de una levadura productora de bioquímico, tal
25 como, por ejemplo, *Pichia anomala* (*Wickerhamomyces anomalous*). *Wickerhamomyces anomalous* está frecuentemente asociada con la producción de alimentos y grano y es un productor efectivo de varios solventes, enzimas, toxinas, así como biotensioactivos glicolípidos, tal como SLP. 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 biotensoactivos glicolípidos.

En una modalidad, el producto de fermentación de levadura puede también ser obtenido por medio de cultivación de la levadura productora de biotensoactivo, *Starmerella bombicola*. Esta especie es un productor efectivo de biotensoactivos glicolípidos, tal como SLP. El caldo de fermentación después de 5 días de cultivación a 25°C puede contener la suspensión celular de levadura y, por ejemplo, 150 g/L o más de biotensoactivos glicolípidos.

En una modalidad, el producto de fermentación de levadura puede comprender el caldo de fermentación, separado de las células de levadura. En una modalidad, los biotensoactivos y otros subproductos de crecimiento en el caldo son además separados del caldo y son purificados.

Otras cepas microbianas incluyendo, por ejemplo, otras cepas de hongos capaces de acumular cantidades significativas de, por ejemplo, biotensoactivos glicolípidos o lipopéptidos u otros metabolitos pueden ser usadas de acuerdo con la presente invención. Otros metabolitos de acuerdo con la presente invención incluyen manoproteína, beta-glucano y otros que tienen propiedades bioemulsionantes y reductoras de tensión superficial/interfacial.

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. Si se desea, la extracción y purificación se pueden lograr fácilmente usando métodos estándar de extracción o técnicas conocidas para los expertos en la materia.

Los microorganismos en el producto a base de microbio pueden estar en una forma activa o inactiva. Los productos a base de microbio pueden ser usados

sin estabilización, conservación, y almacenamiento adicional. 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 indeseados, y mantiene la actividad de los subproductos de crecimiento microbiano.

Los microbios y/o caldo resultante del crecimiento microbiano pueden ser removidos del recipiente de crecimiento y ser transferidos por medio de, por ejemplo, tubería para uso inmediato.

Ventajosamente, de acuerdo con la presente invención, el producto a base de microbio puede comprender el caldo en el cual los microbios fueron cultivados. 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, cualquiera de 0% a 100% inclusive de todos los porcentajes entre ellos.

En otras modalidades, la composición (microbios, caldo, o microbios y caldo) puede ubicarse 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 transporte desde la instalación de crecimiento de microbio a la ubicación de uso. Así, los contenedores en los cuales se ubica la composición a base de microbio pueden ser, por ejemplo, de 3.8 L (1 galón) a 3785 L (1000 galones) o más. En ciertas modalidades, los contenedores son de 7.6 L (2 galones), 18.9 L (5 galones), 94.6 L (25 galones), o más grandes.

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 los contenedores y/o enviado por tubería (o de otra forma transportado para su 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 microbio, agentes de rastreo, pesticidas, y otros ingredientes específicos para un uso destinado.

Se puede adicionar hasta, por ejemplo, 50% en peso o más de aditivos, como se necesario, para aplicaciones particulares, tal como, por ejemplo, para
5 variar los niveles de VOC, aumentar la penetración de la mezcla, disminuir la viscosidad de la mezcla, como acopladores para solventes insolubles en la mezcla, y para suministrar solventes. Todos los aditivos deben tener un punto de inflamación mayor a 37.8°C (100°F), preferiblemente mayor a 65.6°C (150°F) y más preferiblemente 90.6°C (195°F) TCC para lograr un punto de
10 inflamación del producto final mayor a 93.3°C (200°F).

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

20 **Producción Local de Productos a Base de Microbio**

En modalidades preferidas de la presente invención, una instalación de crecimiento de microbio produce microorganismos frescos y 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 al sitio de
25 aplicación. La instalación produce composiciones a base de microbio de alta densidad en cultivación por lotes, casi continua, o continua.

La presente invención utiliza procesos de cultivación que varían de pequeñas (por ejemplo, de laboratorio) a grandes (por ejemplo, industriales) escalas. Estos procesos de cultivación incluyen, pero no se limitan a,

cultivación/fermentación sumergida, fermentación de estado sólido (SSF), y combinaciones de éstas.

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

Ventajosamente, los presentes productos a base de microbio pueden ser
10 adaptados para uso en una ubicación específica. En una modalidad, la instalación de crecimiento de microbio se ubica en, o cerca, un sitio donde serán usados los productos a base de microbio. Por ejemplo, la instalación de crecimiento de microbio puede estar a menos de 483 km (300 millas), 402 km (250 millas), 322 km (200 millas), 241 km (150 millas), 161 km (100 millas), 122 km (75
15 millas), 80.5 km (50 millas), 40.2 km (25 millas), 24.1 km (15 millas), 16.1 km (10 millas), 8.0 km (5 millas), 4.8 km (3 millas), o 1.6 km (1 milla) de la ubicación de uso.

Debido a que el producto a base de microbio es generado localmente, en el sitio o cerca del sitio de aplicación, sin recurso a procesos de estabilización,
20 conservación, almacenamiento y transporte del microorganismo de producción convencional microbiana, se puede generar una densidad mucho mayor de microorganismos vivos. Así, un volumen menor del producto a base de microbio es requerido para uso en la aplicación en el sitio. Además, esto permite aplicaciones microbianas de mayor densidad donde sea necesario lograr la
25 eficacia deseada.

Ventajosamente, esto permite un biorreactor reducido (por ejemplo, tanque de fermentación más pequeño, y menores suministros de material de inicio, nutrientes, agentes de control de pH, y agentes antiespumantes, etc.), lo cual hace al sistema eficiente y facilita la portabilidad del producto. La

generación local del producto a base de microbio también facilita la inclusión del caldo de crecimiento en el producto, eliminando así el requerimiento para estabilizar células o separarlas de su caldo de cultivo. El caldo puede contener agentes producidos durante la fermentación que son particularmente bien
5 adecuados para uso local.

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

Ventajosamente, estas instalaciones de crecimiento de microbio suministran una solución al problema actual de confiar en productores de tamaño industrial alejados cuya calidad de producto sufre debido a demoras en procesamiento arriba de la cadena, cuellos de botella en la cadena de suministro,
20 almacenamiento inadecuado, y otras contingencias que inhiben la entrega a tiempo y la aplicación de, por ejemplo, un producto viable con conteo celular alto y el caldo y metabolitos asociados en los cuales las células fueron cosechadas originalmente.

Las instalaciones de crecimiento de microbio suministran versatilidad de
25 fabricación por medio de la capacidad de adaptar los productos a base de microbio para mejorar las sinergias con las geografías de destino. 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. Los microbios locales pueden ser identificados con base en, por ejemplo, tolerancia a la sal, o 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
5 en cualquiera de un número de formas diferentes.

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

Métodos de Recuperación Mejorada de Petróleo

En algunas modalidades, la presente invención suministra materiales y
15 métodos para mejorar la producción de petróleo al tratar un sitio de producción de petróleo, por ejemplo, una formación de petróleo o un pozo petrolero, con microorganismos y/o sus subproductos de crecimiento. En una modalidad, la presente invención puede ser útil para mejorar la recuperación de petróleo a partir de un pozo petrolero, por ejemplo, al estimular el flujo de petróleo desde
20 el pozo mientras se disuelven incrustaciones dentro de la formación.

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 pueda tener un efecto sobre el objetivo o sitio. El efecto se puede deber, por ejemplo, a crecimiento microbiano y/o la acción de un biotensoactivo
25 u otro subproducto de crecimiento. Por ejemplo, las composiciones o productos a base de microbio pueden inyectarse en pozos petroleros y/o la tubería, revestimiento, anillo, bombas, tanques, etc. asociados con sitios productores de petróleo y formaciones de petróleo.

En una modalidad, la presente invención suministra un método para mejorar la recuperación de petróleo al aplicar uno o más microorganismos capaces de producir subproductos bioquímicos útiles a un sitio de producción de petróleo, por ejemplo, una formación de petróleo y/o un pozo petrolero. El
5 método opcionalmente incluye adicionar nutrientes y/u otros agentes al sitio. En modalidades preferidas, el microorganismo es una especie de bacteria productora de biotensoactivo.

En ciertas modalidades, los microorganismos son seleccionados de cepas de *Bacillus*, incluyendo, pero no limitado a, cepas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus*
10 *licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens*. En modalidades preferidas, las bacterias están en forma de espora.

En una modalidad, el método además comprende adicionar nutrientes y/o mejoradores de germinación para promover la germinación y el crecimiento microbiano. Por ejemplo, nutrientes tales como fuentes de carbono, nitrógeno,
15 magnesio, fósforo y proteína pueden ser adicionados. También se pueden adicionar mejoradores de germinación, tales como L-alanina y manganeso.

El método también puede comprender adicionar un producto de fermentación de levadura, tal como el caldo de fermentación que resulta de la cultivación de, por ejemplo, *Starmerella bombicola* o *Wickerhamomyces*
20 *anomalus*. En una modalidad, la levadura es una levadura productora de biotensoactivo. En una modalidad, el caldo de fermentación comprende los subproductos de crecimiento de levadura, tales como, por ejemplo, biotensoactivos glicolípidos y otros metabolitos.

En una modalidad, las células de levadura pueden ser removidas del
25 producto de fermentación de levadura y únicamente el caldo que contiene biotensoactivos y otros metabolitos es aplicado. En una modalidad, el producto de fermentación de levadura comprende biotensoactivos que han sido separados del caldo de fermentación y han sido purificados.

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

El método también puede comprender aplicar los microbios y/o subproductos de crecimiento microbiano con uno o más compuestos alcalinos.

10 El compuesto alcalino puede ser, por ejemplo, hidróxido de amonio.

En algunas modalidades, el método también puede comprender aplicar los microbios y/o subproductos de crecimiento microbiano con uno o más compuestos de polímero. Los compuestos de polímero pueden seleccionarse de biopolímeros, tales como, por ejemplo, hidrogeles, polisacáridos, goma de
15 xantano, goma de guar, y polímeros de celulosa.

En algunas modalidades, el método también puede comprender aplicar los microbios y/o subproductos de crecimiento microbiano con uno o más tensoactivos no biológicos. Los tensoactivos pueden ser, por ejemplo, aniónicos, catiónicos, no iónicos o zwitteriónicos.

20 En una modalidad, los microbios y/o subproductos de crecimiento microbiano pueden ser aplicados con uno o más agentes quelantes para reducir, por ejemplo, disolver, las incrustaciones que se han acumulado dentro de la formación de petróleo. Los agentes quelantes pueden ser, por ejemplo, ácido cítrico, EDTA, y/o citrato de sodio.

25 En algunas modalidades, los presentes productos y métodos a base de microbio pueden además ser usados para remoción de parafina, licuefacción de asfalto sólido, y biorremediación de aguas contaminadas con hidrocarburos, suelos y otros sitios.

En una modalidad, los productos a base de microbio son aplicados a un pozo en trabajo, incluyendo la formación circundante. En esta modalidad, el producto puede ser vertido o inyectado hacia abajo del lado de revestimiento (líneas posteriores) de un pozo y dejándolo mezclarse con el fluido que ya se encuentra en el pozo. Cuando hay suficiente fluido presente, la composición luego puede opcionalmente circularse mediante, por ejemplo, una bomba por 24-72 horas, preferiblemente 48-72 horas. Antes de circular, la composición puede dejarse asentar por 8 a 24 horas, por ejemplo. El tiempo de asentamiento, el tiempo de circulación y la dosificación dependen de la profundidad y el tamaño del pozo. Una dosificación inicial básica puede ser, pero no se limita a, 75.7 L (20 galones) de composición, y por lo menos aproximadamente 18.9 L (5 galones) de composición por pozo en base periódica, por ejemplo, bisemanal, mensual, bimensual.

En una modalidad, los microorganismos pueden germinar y crecer *in situ* y producir biotensoactivos en el sitio de producción de petróleo. En consecuencia, se puede lograr fácil y continuamente una alta concentración de biotensoactivos y microorganismos productores de biotensoactivos en un sitio de tratamiento (por ejemplo, un pozo petrolero).

En una modalidad, es deseable introducir la composición, a través de perforaciones en el revestimiento, en la formación circundante de petróleo. La composición puede ser forzada dentro de la formación circundante por presión aplicada o, si la composición se deja asentar al fondo del revestimiento, la composición puede filtrarse en la formación sin presión adicional. La composición permea la formación, disolviendo los bloqueos en la formación para suministrar una recuperación más eficiente de petróleo y gas.

En modalidades adicionales, la composición de la presente invención puede ser aplicada directamente al equipo. Por ejemplo, antes de ubicar las varillas y las cubiertas dentro de los pozos de gas y/o petróleo, estas partes

pueden ser rociadas con, o empapadas en, la composición. Las partes también pueden ser sumergidas en tanques llenos con la composición.

La composición puede ser introducida por medio de bombas de inyección en pozos petrolero o de gas fuera de costa para mejorar la recuperación de petróleo. Para tratar las líneas, de 3.8 L a 1893 L (1 a 500 galones) hasta 1000 barriles, 10000 barriles, o más, por ejemplo, de la composición pueden ser aplicados a la composición a la tasa de inyección de, por ejemplo, 3.8 L a 75.7 L (1 a 20 galones) por minuto, o 1 a 20 barriles por minuto.

El presente tratamiento puede ser efectivo en un rango de diferentes formaciones geológicas. Por ejemplo, la presente invención puede ser útil en formaciones tan profundas como aproximadamente 2134 m (7000 pies) o más, y tan superficiales como aproximadamente 457 m (1500 pies) o menos. Adicionalmente, la invención puede ser útil en formaciones que tienen un rango de porosidad y/o permeabilidad, por ejemplo, de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 20% o más. La invención también puede ser útil en formaciones que tienen un amplio rango de temperaturas, pH, y salinidad.

En una modalidad, la recuperación mejorada de petróleo se logra a través de taponamiento selectivo, en donde el flujo de fluido a través del reservorio se cambia de las zonas de alta permeabilidad del reservorio a zonas con permeabilidad moderada o baja. La eficiencia de barrido se puede aumentar, por ejemplo, al forzar el agua inyectada para que pase a través de zonas de petróleo saltadas del reservorio. Los cambios en el patrón de flujo pueden lograrse por medio de un aumento en masa celular microbiana dentro del reservorio, por ejemplo, al inyectar microorganismos junto con nutrientes. Los nutrientes y microbios inyectados preferiblemente fluyen dentro de las zonas de alta permeabilidad del reservorio y como resultado del crecimiento celular, la biomasa tapon selectivamente estas zonas en una mayor medida que las zonas con permeabilidad moderada o baja. En una modalidad, los microbios son inyectados en forma de espora y germinan mientras están dentro del reservorio.

Recuperación Mejorada de Petróleo por medio del Método de Alcalino-Tensoactivo-Polímero (ASP)

En una modalidad, se suministran métodos para mejorar la recuperación
5 de petróleo, en donde un producto a base de microbio de la presente invención
es aplicado a un sitio de producción de petróleo en combinación con uno o más
compuestos alcalinos, polímeros, tensoactivos, o combinaciones de éstos.

En inundación con tensoactivo, al reducir la tensión interfacial entre el
petróleo y el agua de desplazamiento y también la tensión interfacial entre el
10 petróleo y las rocas de interfaz, el petróleo residual puede ser desplazado y
recuperado.

En inundación cáustica, la reacción de los compuestos alcalinos con los
ácidos orgánicos en el petróleo forma tensoactivos naturales in situ que reducen
la tensión interfacial petróleo-agua.

15 Adicional a la inundación con tensoactivo y alcalina, se usan polímeros
para aumentar la viscosidad del agua de desplazamiento para mejorar la
eficiencia de barrido de petróleo.

La inundación ASP es un proceso de combinación en el cual se inyectan
álcali, tensoactivo y polímero. ASP involucra la inyección de una solución que
20 contiene polímero, álcali y tensoactivo en un campo petrolero agotado o
madurado con el objetivo de lograr la química óptima a volúmenes grandes de
inyección para costo mínimo. La mezcla álcali-tensoactivo forma una emulsión
con el petróleo, la cual luego es barrida y desplazada del reservorio usando un
activador de polímero. La inundación ASP mejora la eficiencia de desplazamiento
25 microscópico al reducir la tensión interfacial (IFT) entre el agua y el aceite a
través de la adición de un tensoactivo al agua, mientras se hace coincidir la
movilidad del aceite y el agua a través de la adición del polímero. También se
adiciona álcali al agua para reducir la adsorción del tensoactivo en las paredes

de poro y para controlar la salinidad local para asegurar un IFT mínimo y alterar la humectabilidad de la roca.

Uso de Microbios con Tensoactivos en la Recuperación de Petróleo

5 En ciertas modalidades, los métodos de recuperación de petróleo descritos acá utilizan uno o más microbios y/o subproductos de crecimiento microbiano (por ejemplo, biotensoactivos), combinados con otras composiciones. En una modalidad, las otras composiciones son tensoactivos no biológicos.

10 Una molécula de tensoactivo (Agente Activo de Superficie) tiene dos grupos funcionales, específicamente un grupo hidrófilo (soluble en agua) o polar y un grupo hidrófobo (soluble en aceite) o no polar. El grupo hidrófobo es usualmente una cadena larga de hidrocarburo (C8-C18), la cual puede o no ser ramificada, mientras que el grupo hidrófilo se forma por porciones tales como carboxilatos, sulfatos, sulfonatos (aniónicos), alcoholes, cadenas
15 polioxietilenadas (no iónicas) y sales de amonio cuaternario (catiónicas).

 Los tensoactivos trabajan en la inundación ASP para reducir la tensión interfacial (IFT) entre aceite atrapado y salmuera, para ayudar a la movilización y contribuir en la formación de bancos de aceite. La reducción de IFT reduce las fuerzas capilares y permite que los bancos de aceite fluyan más libremente sin
20 que se atrapen nuevamente. La selección de un tensoactivo adecuado para propósitos de EOR se basa en la capacidad de reducir la IFT entre crudo y salmuera, la estabilidad térmica, tolerancia a salinidad y dureza de salmuera, solubilidad en salmuera, parámetros de comportamiento de fase, prueba de adsorción bajo condición estática y dinámica y estudios de desplazamiento bajo
25 condiciones de reservorio.

 Los tensoactivos de acuerdo con los presentes métodos incluyen, pero no se limitan a: tensoactivos aniónicos, sulfato de arilo de amonio, sulfato de laurilo de sodio (también denominado SDS, sulfato de dodecilo de sodio), sulfatos de alquil-éter, sulfato de laureato de sodio (también conocido como sulfato de éter

de laurilo de sodio (SLES)), sulfato de mireto de sodio; docusatos, sulfosuccinato de sodio dioctilo, perfluorooctanosulfonato (PFOS), perfluorobutanosulfonato, sulfonatos de alquilbenceno lineal (LAB), fosfatos de éter alquilo-arilo, fosfato de éter alquilo; carboxilatos, carboxilatos de alquilo (jabones), estearato de sodio, sarcosinato de lauroil de sodio, fluorotensoactivos a base de carboxilato, perfluorononanoato, perfluorooctanoato; tensoactivos catiónicos, aminas primaria, secundaria, o terciaria dependientes de pH, octenidina, dihidrocloruro, cationes de amonio cuaternario cargado permanentemente, sales de alquiltrimetilamonio, bromuro de trimetilamonio de acetilo (CTAB) (también conocido como, bromuro de amonio de trimetilo hexadecilo), cloruro de trimetilamonio cetilo (CTAC), cloruro de cetilpiridinio (CPC), cloruro de benalconio (BAC), cloruro de bencetonio (BZT), 1-bromo-5-nitro-1,3-dioxano, cloruro de dimetildioctadecilamonio, bromuro de cetrimonio, bromuro de dioctadecildi-metilamonio (DODAB); tensoactivos zwitteriónicos (anfóteros), sultaínas CHAPS (3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato), hidroxisultaína de cocamidopropilo, betaínas, betaína de cocamidopropilo, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, esfingomielinas, etoxilato, alcoholes de cadena larga, alcoholes grasos, alcohol cetilo, alcohol estearilo, alcohol cetoestearilo, alcohol oleico, éteres de alquilo de polioxietilenglicol (Brij): CH₃-(CH₂)₁₀₋₁₆-(O-C₂H₄)₁₋₂₅-OH (éter de monododecilo de octaetilenglicol, éter de monododecilo de pentaetilenglicol), éteres de alquilo de polioxipropilenglicol: CH₃-(CH₂)₁₀₋₁₆-(O-C₃H₆)₁₋₂₅-OH, éteres de alquilo glicósido: CH₃-(CH₂)₁₀₋₁₆-(O-Glucósido)₁₋₃-OH (glucósido de decilo, glucósido de laurilo, glucósido de octilo), éteres de octilfenol de polioxietilenglicol: C₈H₁₇-(C₆H₄)-(O-C₂H₄)₁₋₂₅-OH (Triton X-100), éteres de alquilfenol de polioxietilenglicol: C₉H₁₉-(C₆H₄)-(O-C₂H₄)₁₋₂₅-OH (nonoxinol-9), éteres de alquilo de glicerol (laurato de gliceril), ésteres de alquilo de sorbitán de polioxietilenglicol (polisorbato), ésteres de alquilo de sorbitán (lapsos), MEA de cocamida, DEA de cocamida, óxido de dodecildimetilamina, copolímeros de

polietilenglicol y propilenglicol (poloxámeros), y amina de sebo polietoxilada (POEA).

Los tensoactivos aniónicos contienen grupos funcionales aniónicos en su cabeza, tal como sulfato, sulfonato, fosfato, y carboxilatos. Los sulfatos de alquilo prominentes incluyen sulfato de laurilo de amonio, sulfato de laurilo de sodio (también denominado SDS; sulfato dodecilo de sodio) y los sulfatos de alquil-éter sulfato de laureato de sodio relacionados, también conocidos como sulfato de éter de laurilo de sodio (SLES), y sulfato de mireto de sodio. Los carboxilatos son los tensoactivos más comunes y comprenden los carboxilatos de alquilo (jabones), tales como estearato de sodio.

Los tensoactivos con grupos de cabeza catiónicos incluyen: aminas primarias, secundarias, o terciarias dependientes de pH; dihidrocloruro de octenidina; cationes de amonio cuaternario cargados permanentemente tales como sales de alquiltrimetilamonio: bromuro de trimetilamonio de cetilo (CTAB), también conocido como bromuro de amonio de trimetilo hexadecilo, cloruro de trimetilamonio de cetilo (CTAC); cloruro de cetilpiridinio (CPC); cloruro de benzalconio (BAC); cloruro de bencetonio (BZT); 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano; cloruro de dimetildioctadecilamonio; bromuro de cetrimonio; y bromuro de dioctadecildi-metilamonio (DODAB).

Los tensoactivos zwitteriónicos (anfóteros) tienen centros catiónicos y aniónicos unidos a la misma molécula. La parte catiónica se basa en aminas primarias, secundarias, o terciarias o cationes de amonio cuaternario. La parte aniónica puede ser más variable e incluye sulfonatos. Los tensoactivos zwitteriónicos biológicos más comunes tienen un anión de fosfato con una amina o amonio, tal como los fosfolípidos fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, y esfingomielinas.

Un tensoactivo con una parte hidrófila no cargada, por ejemplo, etoxilado, es no iónico. Varios alcoholes de cadena larga exhiben algunas propiedades tensoactivas.

Uso de Microbios con Polímeros en la Recuperación de Petróleo

La presente invención suministra métodos para la recuperación mejorada de petróleo usando uno o más microbios y/o subproductos de crecimiento microbiano, combinados con uno o más compuestos de polímero. Los compuestos de polímero usados para recuperar petróleo en combinación con los microbios de la presente invención incluyen, pero no se limitan a: hidrogeles, ácido acrílico, acrilamida, poliacrilamida (PAM), poliacrilamida hidrolizada (HPAM), polisacárido, goma de xantano, goma de guar, y polímero de celulosa. En modalidades preferidas, el polímero es un biopolímero seleccionado de, por ejemplo, hidrogeles, goma de xantano, goma de guar, polímeros de celulosa, polisacáridos, y otros.

El polímero soluble en agua asociativo es una clase relativamente nueva de polímeros que ha sido recientemente introducida para aplicaciones en el campo de petróleo. Estos polímeros consisten de un núcleo hidrófilo de cadena larga, con un número pequeño de grupos hidrófobos localizados bien sea aleatoriamente a lo largo de la cadena o en los extremos de la cadena. Cuando estos polímeros son disueltos en agua, los grupos hidrófobos se agregan para minimizar su exposición al agua. Los grupos incorporados se asocian debido a las interacciones hidrófobas intramoleculares y las interacciones hidrófobas intermoleculares. Los grupos funcionales en estos polímeros son menos sensibles a la salinidad de salmuera en comparación a poliacrilamida, cuya viscosidad disminuye dramáticamente con aumento en salinidad.

La inundación con polímero puede involucrar la adición de polímero al agua de una inundación con agua para disminuir su movilidad. Los polímeros aumentan la viscosidad de la fase acuosa, así como reducen la permeabilidad del agua debido al atrapamiento mecánico, lo que consecuentemente resulta en una relación de movilidad más favorable. Con una fase más viscosa, el banco de

aceite recolectado puede ser moverse fácilmente a través del reservorio y eventualmente en el pozo en producción.

Los polímeros de acuerdo con estas modalidades también pueden ser removidos y/o degradados usando la composición a base de microbio de la presente invención, una vez su función en el pozo ya no es necesaria.

En una modalidad, la presente invención suministra un método para mejorar la recuperación de hidrocarburos a partir de un pozo de fracturación al aplicar a un sitio de perforación la composición a base de microbio que comprende una o más cepas de microorganismos. En ciertas modalidades, los polímeros se acumulan dentro del pozo después que ellos han realizado su función deseada dentro del pozo.

Los microbios de la composición a base de microbio y/o sus subproductos de crecimiento pueden digerir rápidamente polímeros tales como ácido poliláctico (PLA); así, el método mejora la capacidad de recuperar recursos de hidrocarburo al reducir la acumulación de PLA y otras resinas dentro de las fracturas y pozos de fracturación una vez su utilidad se ha agotado. El método opcionalmente incluye adicionar nutrientes y/u otros agentes al sitio con el fin de promover el crecimiento microbiano. El método además puede incluir adicionar enzimas degradadoras de polímero al sitio con el fin de mejorar la degradación de polímero.

En una modalidad, la presente invención suministra métodos para recuperar sustancias poliméricas que permanecen en pozos, incluyendo pozos de fracturación, después que su utilidad ha sido agotada. Por ejemplo, los biotensoactivos producidos por los métodos y microorganismos de la presente invención pueden reducir la tensión interfacial de fluidos usados para elevar sustancias poliméricas, tal como reductores de fricción de gel PAM. En otra modalidad, los biotensoactivos pueden ser usados para escindir gel de PAM antes de la elevación.

Uso de Microbios con Compuestos Alcalinos en la Recuperación de Petróleo

La presente invención suministra métodos para la recuperación mejorada de petróleo usando uno o más microbios y/o subproductos de crecimiento microbiano, combinados con uno o más compuestos alcalinos. Los compuestos
5 alcalinos usados para recuperar petróleo en combinación con los microbios de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, hidróxido de amonio.

Álcali es una sal iónica básica de un metal alcalino o elemento de metal alcalinotérreo. El uso de álcali en inundación química ofrece varios beneficios incluyendo la promoción de emulsificación de petróleo crudo, aumento de la
10 resistencia iónica de fase acuosa que lleva a la regulación del comportamiento de fase del tensoactivo inyectado, y la reducción de IFT a valores ultra bajos en presencia del tensoactivo.

Álcali también puede reducir los costos al limitar la cantidad de tensoactivo necesario en dos formas. Primero, álcali reduce la adsorción del tensoactivo al
15 aumentar la densidad de carga negativa de la superficie de la roca, haciéndola preferiblemente húmeda con agua. Segundo, álcali reacciona con los ácidos en el petróleo crudo para producir jabones in situ, lo cual a su vez amplía el rango de salinidad óptimo. El jabón generado crea una fase de microemulsión que puede coexistir con aceite y agua, extendiendo así la región de tres fases (o
20 región de IFT ultra bajo).

La selección de álcali es guiada por el tipo de formación, tipo de arcilla y cationes divalentes. Los agentes alcalinos comunes incluyen hidróxido de sodio (NaOH o soda cáustica), carbonato de sodio (Na_2CO_3 , o ceniza de soda), bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y metaborato de sodio (NaBO_2). Las soluciones
25 de hidróxido de sodio han sido reportadas por interactuar fuertemente con arenisca a temperatura elevada (185°F), resultando en pérdida de peso de arenisca y porosidad aumentada. El consumo cáustico que resulta de la disolución de NaOH de minerales de silicato puede ser un factor significativo y perjudicial durante la aplicación en campo. Los tensoactivos aniónicos mostraron

adsorción mucho menor en la presencia de Na_2CO_3 en comparación con NaOH . El hidróxido no es un ion determinante potencial para superficies de carbonato. Calcio y otros cationes divalentes pueden causar la precipitación de álcalis tales como Na_2CO_3 a menos que se use salmuera suave. Esta es la limitación del Na_2CO_3 . Se ha reportado el uso de NaBO_2 como reemplazo de Na_2CO_3 . Este álcali dio valores de pH de aproximadamente 11 a 1% en peso de concentración de álcali y generó jabón para petróleos crudos ácidos. Otra principal ventaja de especies de NaBO_2 (metaborato de sodio) son su tolerancia a cationes divalentes. En reservorios de carbonato se usa metaborato de sodio en lugar de otros álcalis. Si el reservorio contiene arcillas, se prefiere NaHCO_3 . Na_2CO_3 es el álcali más comúnmente usado porque es económico y se transporta mejor en medio poroso.

Las formaciones de petróleo preferidas para inundación alcalina son reservorios de arenisca en lugar de formaciones de carbonato que contienen anhidrita (sulfato de calcio (CaSO_4) o yeso (dihidrato de sulfato de calcio ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), el cual puede consumir grandes cantidades de químicos alcalinos. También, en reservorios de carbonato ocurre precipitación del carbonato de calcio (CaCO_3) o hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) cuando se adiciona Na_2CO_3 o NaOH . Los reservorios de carbonato también contienen salmuera con una mayor concentración de divalentes y podría causar precipitación. Para superar este problema, se sugiere el uso de NaHCO_3 y sulfato de sodio (Na_2SO_4). NaHCO_3 tiene una concentración mucho menor de iones de carbonato, y iones de sulfato adicionales pueden disminuir la concentración de iones de calcio en la solución. Estos químicos también son consumidos por arcillas, minerales, o sílice, y entre mayor sea la temperatura del reservorio, mayor será el consumo de álcali. Otro problema común durante la inundación cáustica es la formación de incrustaciones en los pozos en producción. Durante la inundación alcalina, la secuencia de inyección usualmente incluye: (1) un prelavado para acondicionar el reservorio antes de la inyección de bloque primario, (2) bloque primario

(químicos alcalinos), (3) polímero como amortiguador de movilidad para desplazar el bloque primario. La inundación alcalina puede ser modificada como los procesos AP (álcali-polímero), AS (álcali-tensoactivo), y Álcali-Tensoactivo-Polímero (ASP). El jabón producido a partir de la reacción entre los componentes
5 acídicos de un petróleo crudo y el álcali inyectado es el mecanismo principal de recuperación de petróleo en inundación alcalina.

Uso de Microbios con Agentes Quelantes

En algunas modalidades, los microorganismos y/o subproductos de
10 crecimiento de los mismos pueden ser aplicados con un quelante o agente quelante. Ventajosamente, el uso de agentes quelantes ayuda en mejorar la recuperación de petróleo al disolver las incrustaciones dentro de una formación. Las incrustaciones pueden bloquear los poros y otras trayectorias de flujo de una formación de petróleo, reduciendo así y/o bloqueando el flujo de petróleo desde
15 la formación.

Como se usa acá, "quelante" o "agente quelante" significa un agente activo capaz de remover un ion de metal desde un sistema al formar un complejo de modo que el ion de metal, por ejemplo, no puede participar fácilmente o catalizar la formación radical de oxígeno.

20 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), disulfuro de tetrahidrofurfurilo de tiamina (TTFD), penicilamina, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), acetato de sodio, citrato de sodio y ácido
25 cítrico.

En modalidades preferidas, el agente quelante es citrato de sodio, ácido cítrico, EDTA o una combinación de los mismos.

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 deben ser considerados como limitantes de la invención. Numerosos cambios y modificaciones se pueden realizar con respecto a la invención.

EJEMPLO 1 – PRODUCCION DE *BACILLUS SUBTILIS*

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

Glucosa	18
Melaza en polvo	2
Sacarosa	1
KH ₂ PO ₄	0.5
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	2.1
KCl	0.1
MgSO ₄	0.5
CaCl ₂	0.05
Urea	2.5
NH ₄ Cl	1.24
Extracto de levadura	2
Peptone de maíz	0.5
Element de rastreo TekNova (mL)	1

La temperatura de cultivación es 40°C, la estabilización de pH es de 6.8-7.0, y la estabilización DO está a 20-30% (la concentración de oxígeno en el aire se toma como 100%). La duración de cultivación es 24-36 horas, o hasta que por lo menos 95% de la bacteria alcance esporulación. La concentración final del cultivo bacteriano es no menor a 1x10⁹ CFU/ml. La cantidad de cultivo fabricado

por un ciclo de fermentación simple permite la producción de más de 2000 barriles de formulación de tratamiento final que contiene 10^6 CFU de esta cepa de *Bacillus*.

5 EJEMPLO 2 – FERMENTACION DE *STARMERELLA BOMBICOLA* PARA PRODUCCION DE BIOTENSOACTIVO

El fermentador es un recipiente de acero inoxidable autoclavable diseñado específicamente para cultivación de levadura y producción de biotensoactivos. El fermentador se ajusta con un micro burbujeador y un propulsor, así como con
10 sondas de oxígeno disuelto, pH, temperatura y espuma. Tiene una estación de control integrada con una interfaz de pantalla táctil a color, bombas incorporadas para mezcla mejorada de caldo, controladores de flujo de gas, y controladores de pH/espuma DO/nivel. El volumen de trabajo del reactor de 2082 L (550 galones) es 1893 L (500 galones).

15 El medio nutriente contiene fuentes de carbono, proteína, nitrógeno, y aceite insaturado o ácidos grasos. Se usa un cultivo de un día de *Starmerella bombicola* (60-70L) para inocular el reactor. El pH inicial del cultivo es 5.0-6.0 hasta que ocurre el crecimiento de microbios y el pH comienza a reducir. La duración de cultivación y la recolección de producto listo continúan por 5 días a
20 25°C y el pH es estabilizado a 3.5. El contenido final de soforolípido puede alcanzar por lo menos 40% del volumen de trabajo por ciclo, o 150 g/L o mayor.

RESUMEN

Esta invención se relaciona con composiciones y métodos para la recuperación microbiana mejorada de petróleo usando microbios productores de bioquímicos.

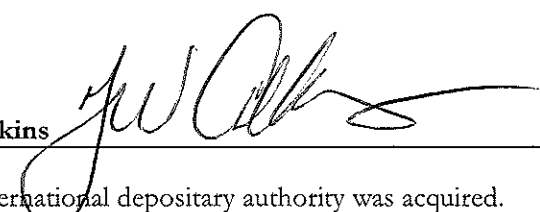
- 5 En modalidades específicas, los métodos de la presente invención comprenden aplicar una bacteria productora de biotensoactivo y/o un subproducto de crecimiento de la misma a un sitio productor de petróleo. En modalidades preferidas, la bacteria es una cepa de *Bacillus* en forma de espora. En algunas modalidades, los métodos además comprenden aplicar la bacteria con un
- 10 producto de fermentación de levadura, un compuesto alcalino, un polímero, un tensoactivo no biológico, y/o uno o más agentes quelantes. Ventajosamente, la presente invención puede ser útil para estimular el flujo de petróleo desde un pozo, así como para disolver las incrustaciones presentes en una formación de petróleo.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURES

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

Locus Solutions, LLC
C/O Maja Milovanovic
30600 Aurora Road
Suite 180
Solon, OH 44139
United States

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (LS-BA-001)	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: NRRL B-67928
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: ☐ ¹ a scientific description ☒ ¹ a proposed taxonomic designation	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on <u>26 February 2020</u> (date of the original deposit) ²	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I. above, was received by this International Depositary Authority on _____ (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) International Depositary Authority Address: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 U.S.A.	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Travis W. Adkins

¹ Mark with a cross the applicable box.

² Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURES

INTERNATIONAL FORM

VIABILITY STATEMENT

Locus Solutions, LLC
C/O Maja Milovanovic
30600 Aurora Road
Suite 180
Solon, OH 44139
United States

issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Locus Solutions, LLC C/O Maja Milovanovic 30600 Aurora Road Suite 180 Solon, OH 44139 United States	Depositor's taxonomic designation and accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (LS-BA-001) NRRL B-67928 Date of: 26 February 2020 ☒ Original Deposit ☐ New Deposit ☐ Repropagation of Original Deposit

III. (a) VIABILITY STATEMENT

Deposit was found:

☒ ² Viable ☐ ² Nonviable on _____ (Date)

International Depositary Authority's preparation was found viable on **03 March 2020** (Date)³

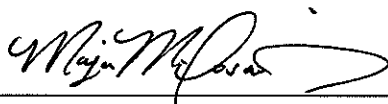
III. (b) DEPOSITOR'S EQUIVALENCY DECLARATION

Depositor determined the International Depositary Authority's preparation was

☒ ² Equivalent

☐ ² Not equivalent to deposit on _____ (Date)

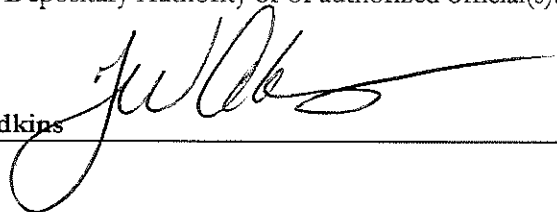
Signature of Depositor



IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST WAS PERFORMED (Depositors/Depositary)⁴

The slant was streaked on tryptic soy agar, incubated for 24 hours. There was appropriate growth. The slant was also genetically sequenced in-house and confirmed to be the strain submitted for deposit.

V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: Agricultural Research Culture Collection (NRRL) International Depositary Authority Address: 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604 U.S.A.	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Travis W. Adkins
---	--

¹ Indicate the date of the original deposit or when a new deposit has been made.

² Mark with a cross the applicable box.

³ In the cases referred to in Rule 10.2(a)(ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

⁴ Fill in if the information has been requested.



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT: 800.176.089-2

COMPROBANTE DE RECAUDO SISTEMA SIPI

Radicado: NC2019/0010273

Recibo: 21-103004

Fecha: 05/10/2021

CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO

CC: 66.783.790

Pago PSE No: 589489

CUS: 1155841588

Patente PCT

PRODUCTOS MICROBIANOS Y USOS DE LOS MISMOS PARA MEJORAR LA RECUPERACIÓN DE PETRÓLEO

Detalle del pago

Id.	Rentístico	Concepto y Servicio	Cant.	Val. Unit.	Subtotal
1	50005-01-03	Modificaciones / Correcciones al registro Patente PCT (DESCUENTO INTERNET)	1	\$ 169,680	\$ 169,680
TOTAL					\$ 169,680