

COMPOSICIONES MICROBIANAS Y MÉTODOS PARA REMOVER PARAFINA Y OTRAS SUSTANCIAS CONTAMINANTES DESDE LOS EQUIPOS DE PRODUCCIÓN Y PROCESAMIENTO DE PETRÓLEO Y GAS

REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. N° de serie 62/432.611, presentada el 11 de diciembre de, 2016, la solicitud provisional de EE.UU. N° de serie 62/461.985, presentada el 22 de febrero de, 2017, y la solicitud provisional de EE.UU. N° de serie 62/563,691, presentada el 27 de septiembre de 2017, todas las cuales se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El petróleo existe en pequeños poros y estrechas fisuras dentro del cuerpo de las rocas de yacimientos ubicados debajo de la superficie de la tierra. La presión natural del yacimiento hace que el petróleo fluya hacia la superficie, lo que proporciona una producción primaria; sin embargo, a medida que la producción de petróleo avanza, la presión del yacimiento se agota hasta un punto en el que se requiere un bombeo o elevación artificial para mantener una tasa rentable de producción de petróleo.

Cuando es necesario proporcionar energía externa para lograr una recuperación de petróleo adicional (recuperación secundaria) en el yacimiento, la energía extra se puede introducir inyectando gas (inyección de gas) y/o agua (inundación con agua). Después de algunos años de operación en un campo, los fluidos inyectados fluyen preferentemente a lo largo de capas altamente permeables lo que hace que estos fluidos sorteen las áreas saturadas de petróleo en el yacimiento. Por lo tanto, junto con el petróleo sube una cantidad creciente de agua (o gas). Al disminuir la relación entre el petróleo y el agua, eventualmente se vuelve poco rentable continuar el proceso y el campo debe ser abandonado. En esta situación, se puede considerar una tercera etapa de recuperación de petróleo, denominada producción terciaria o recuperación de petróleo mejorada (EOR, por sus siglas en inglés).

En esta etapa terciaria, se emplean métodos técnicamente avanzados para modificar las propiedades de los fluidos del yacimiento o las características de la roca del yacimiento. En general, los métodos se pueden clasificar en cuatro categorías principales como métodos térmicos, métodos químicos, inyección de solventes o fluidos miscibles y métodos microbianos.

La recuperación de petróleo mejorada vía microorganismos (MEOR, por sus siglas en inglés) es un campo multidisciplinario que incorpora, entre otros: geología, química, microbiología, mecánica de fluidos, ingeniería petrolera, ingeniería ambiental e ingeniería química. Los procesos microbianos que se desarrollan en la MEOR se pueden clasificar de acuerdo con el problema de producción de petróleo en el campo: limpieza del agujero del pozo, que elimina el lodo y otros residuos que bloquean los canales por donde fluye el petróleo; estimulación del pozo, que mejora el flujo del petróleo desde el área de drenaje hacia el agujero del pozo; y aumentos de la inundación de agua, que aumentan la actividad microbiana al inyectar microbios seleccionados y algunas veces nutrientes.

Por lo tanto, la MEOR utiliza microorganismos y/o sus metabolitos para mejorar la recuperación del petróleo residual. En este método, se inyectan nutrientes y bacterias adecuadas en el yacimiento, las que preferentemente crecen bajo las condiciones anaerobias del yacimiento. Los subproductos microbianos que pueden incluir biotensioactivos, biopolímeros, ácidos, solventes, gases y enzimas, modifican las propiedades del petróleo y las interacciones entre el petróleo, el agua y los medios porosos, lo que aumenta la movilidad y, por consiguiente, la recuperación de petróleo.

Los microorganismos también pueden ser útiles en el mantenimiento de equipos y estructuras utilizadas en la recuperación, transmisión y transporte de petróleo. Uno de los problemas más comunes que conducen a fallas estructurales e ineficiencia en la producción es la formación de depósitos en y alrededor del agujero del pozo, tuberías de producción, líneas de flujo, tanques de almacenamiento, separadores y otros componentes de la infraestructura de producción de petróleo y gas.

La producción segura y eficiente de las composiciones de hidrocarburos depende del buen funcionamiento de las instalaciones productoras de hidrocarburos. Uno de los

problemas más comunes que conducen a fallas estructurales e ineficiencia en la producción es la formación de depósitos en y alrededor del agujero del pozo, tuberías de producción, líneas de flujo, tanques de almacenamiento, separadores y otros componentes de la infraestructura de producción de petróleo y gas.

Estos depósitos problemáticos están formados, por ejemplo, por constituyentes de alto peso molecular de fluidos de petróleo, en particular, parafinas y asfaltenos. La pérdida de solubilidad en el petróleo crudo generalmente hace que las parafinas y los asfaltenos precipiten y formen depósitos. Estos pueden mezclarse con componentes minerales para formar incrustaciones. La formación de incrustaciones y otros depósitos puede surgir, por ejemplo, de cambios en la presión, composición y/o temperatura del petróleo crudo.

El tratamiento sistemático o la remoción de los depósitos son cruciales para mantener las instalaciones que producen hidrocarburos funcionando en forma adecuada. Una vez que se forma incluso una fina capa de depósitos de parafinas o asfaltenos en una superficie, aumenta drásticamente la tasa de acumulación adicional. Por otra parte, a medida que un pozo envejece, los problemas relacionados con las parafinas y asfaltenos se hacen cada vez más frecuentes. Además, la producción de petróleo disminuye a medida que la presión del yacimiento disminuye, lo que a su vez disminuye los caudales. Las películas y los productos químicos se acumulan con el paso del tiempo en los poros de las lutitas, reduciendo el movimiento de hidrocarburos dentro del agujero del pozo. Esto puede provocar cambios en los gradientes de temperatura y, por lo tanto, una mayor acumulación de hidrocarburos pesados.

Con el transcurso del tiempo el espesor de los depósitos aumenta en las estructuras de producción y distribución, lo que da como resultado una disminución gradual de la producción. En las estructuras de las tuberías de producción y las tuberías de revestimiento, los depósitos comienzan a reducir el diámetro interior de la tubería y restringen el flujo libre de petróleo y gas. A medida que esto ocurre, la rugosidad interior de las estructuras también aumenta, lo que aumenta la presión de bombeo requerida para mover el producto de petróleo. Si no se tratan, los depósitos pueden finalmente causar un bloqueo completo. Además, dependiendo de la ubicación de la precipitación, el mantenimiento y/o las reparaciones de emergencia pueden ser extremadamente costosos.

Los métodos actuales de remoción de depósitos se clasifican en cuatro categorías principales: remoción mecánica, química, microbiana y térmica. La extracción mecánica generalmente implica el uso de raspadores o cortadores para eliminar físicamente los depósitos. Por ejemplo, en los tanques donde se ha producido precipitación, los lados del tanque deben cortarse y utilizar la fuerza de, por ejemplo, un martillo, para eliminar los depósitos. En el caso de las líneas de conducción, cuando los depósitos se vuelven demasiado gruesos para la extracción manual o mecánica a menudo se requiere el reemplazo completo de las tuberías.

La remoción química implica el uso de solventes o tensioactivos que pueden solubilizar los depósitos o interferir con su cristalización y formación. Ejemplos de solventes ampliamente utilizados incluyen el tolueno y el xileno. Si bien estos solventes químicos ayudan a inhibir la precipitación de parafinas y asfaltenos, no pueden evitar que se produzcan las precipitaciones.

Además, para degradar los depósitos se pueden usar ciertas cepas de bacterias que degradan los depósitos por sí solas, o que pueden producir biotensioactivos naturales que lo hacen. Sin embargo, junto con estos métodos, la remoción completa de los depósitos a menudo requiere la adición de algún tipo de tratamiento térmico. La remoción térmica, por ejemplo con vapor o aceite caliente, es útil para fundir o disolver depósitos, y como se indicó, para complementar otros métodos de remoción.

La presencia de grandes cantidades de compuestos orgánicos de alto peso molecular en el mismo petróleo crudo también puede contribuir a dificultades en la producción y el transporte de petróleo. Esto se debe, por ejemplo, al efecto del contenido de asfaltenos en la viscosidad del petróleo. Cuanto mayor sea el contenido de asfaltenos, parafinas y resinas en el petróleo, mayor será la viscosidad y la densidad del petróleo. La viscosidad es una propiedad reológica crítica de los fluidos en un yacimiento de petróleo y puede afectar en gran medida la capacidad del fluido para moverse desde el yacimiento y a través de los sistemas de producción. El petróleo pesado y extra pesado, el alquitrán y/o el asfalto son muy viscosos y, por lo tanto, muy pesados de extraer y transportar.

El cuarenta por ciento de las reservas totales de petróleo del mundo es petróleo pesado y extra pesado, lo que representa 572 - 826 mil millones de Litros de petróleo. Por lo tanto, la recuperación de estos hidrocarburos altamente viscosos podría tener una gran importancia económica. No obstante, la mayoría de los petróleos pesados y extra pesados no se pueden recuperar por métodos convencionales. Por ejemplo, para bombear petróleo con mayor viscosidad a través de las líneas de conducción a las refinerías y plantas de procesamiento se requiere una cantidad significativa de energía. Además, la viscosidad afecta la velocidad a la que se puede bombear el petróleo crudo, dándose que los petróleos más viscosos contribuyen a una disminución en la productividad general de un campo petrolero.

También se pueden acumular biopelículas en varias estructuras y mecanismos de procesamiento, incluyendo, pozos, tuberías, tanques y superficies de las formaciones de lutita. La “biopelícula” comprende capas de biomasa formadas por una agrupación compacta de microorganismos rodeados por una matriz extracelular de sustancias poliméricas. Las biopelículas se adhieren a las superficies de muchos mecanismos hechos por el hombre, tal como tubos y tuberías, y pueden afectar significativamente su correcto funcionamiento. Además, muchas biopelículas presentes en o sobre las plataformas petrolíferas contienen bacterias reductoras de sulfato que generan potentes subproductos químicos, por ejemplo, sulfuro de hidrógeno. El gas de sulfuro de hidrógeno es perjudicial para los trabajadores de perforación que podrían respirarlo. Además, el sulfuro de hidrógeno puede causar la corrosión de diversos mecanismos dentro de una estructura productora de petróleo. Además, el sulfuro de hidrógeno puede causar que el petróleo se vuelva agrio durante el almacenamiento o transporte. El petróleo agrio contiene un alto contenido de azufre, lo que aumenta los costos para los productores y consumidores debido al aumento de tiempo y recursos necesarios para procesar el petróleo.

La acumulación de depósitos orgánicos en el petróleo y en el equipo de procesamiento de petróleo puede tener un efecto acumulativo. A menos que estos compuestos orgánicos se remuevan, los operadores se pueden ver enfrentados a rendimientos más bajos, una función incorrecta de las bombas, el bloqueo de las tuberías de producción y tubos, y a la existencia de una potencial pérdida total de la producción. Al desarrollar métodos para remover estos depósitos para garantizar la eficiencia a largo plazo de la producción de hidrocarburos deben

tenerse en cuenta el costo, la seguridad en el procesamiento, la sostenibilidad a gran escala y el daño a las formaciones.

Debido a la importancia de contar con una producción de gas y petróleo segura y eficiente y a las dificultades causadas por los compuestos orgánicos, depósitos y biopelículas en la producción y transporte de petróleo y gas, hay una necesidad continua de métodos mejorados para la prevención de la presencia y/o remoción de tales contaminantes desde las instalaciones productoras de hidrocarburos.

BREVE COMPENDIO DE LA INVENCION.

La presente invención proporciona microbios, así como subproductos de su crecimiento, tales como biotensioactivos y/o enzimas. La presente invención también proporciona métodos para usar estos microbios y sus subproductos. Ventajosamente, los productos y métodos a base de microbios de la presente invención son amigables con el medio ambiente, amigables con las operaciones y rentables.

En una forma de realización, la presente invención proporciona productos a base de microbios, así como su uso para mejorar el rendimiento de los pozos de petróleo al mismo tiempo que elimina las composiciones contaminantes como biopelículas, incrustaciones, parafinas y/o asfaltenos desde el equipo de producción de petróleo.

La presente invención proporciona además materiales y métodos para la biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos.

En ciertas formas de realización, la presente invención proporciona un método para mejorar la eficiencia de la producción de petróleo mediante la aplicación a un pozo de petróleo de una composición que tiene un microbio de levadura cultivado y/o un producto del crecimiento del mismo. Ventajosamente, el método en cuestión trabaja para estimular simultáneamente el pozo de petróleo mientras elimina las parafinas, asfaltenos, incrustaciones y otros contaminantes del pozo y del equipo de producción de petróleo.

En una forma de realización, se proporcionan métodos para el tratamiento de, por ejemplo, un orificio de perforación; un campo petrolero; equipo de transporte, transmisión

y/o refinería de petróleo; y/o un sitio de remediación. En ciertas formas de realización, los métodos se utilizan para mejorar la producción de petróleo, así como el mantenimiento de, por ejemplo, tubos, perforaciones, tanques y otras estructuras y equipos involucrados en la producción, transporte, almacenamiento y/o refinación del petróleo y/o gas.

En formas de realización específicas, la presente invención proporciona métodos eficaces para la remoción de parafinas y/o asfaltenos mediante la utilización de microbios productores de productos bioquímicos. Los productos bioquímicos producidos por los microbios pueden ser, por ejemplo, biotensioactivos. En formas de realización adicionales, las composiciones y métodos de la presente invención pueden licuar los asfaltenos y/o parafinas sólidas, así como también dispersar los asfaltenos y/o parafinas que han precipitado desde el petróleo. Aún más, las composiciones y métodos pueden mejorar simultáneamente la recuperación de petróleo, por ejemplo, mejorando el flujo de petróleo desde un pozo. Esto incluso puede lograrse en pozos casi agotados (marginales) de baja producción.

En formas de realización adicionales, los materiales y métodos se pueden usar para la biorremediación, incluida la biorremediación de aguas, suelos y otros sitios contaminados con hidrocarburos.

En algunas formas de realización, el método utiliza cepas de levadura y/o subproductos de su crecimiento. En una forma de realización, el microbio usado en los métodos de la presente invención es una levadura productora de biotensioactivo. La invención proporciona, por ejemplo, un producto a base de microbios que comprende *Starmerella bombicola* ATCC 22214 cultivada y/o productos del crecimiento de este microbio. Además, la invención proporciona un producto a base de microbios que comprende cepas de levadura killer cultivadas tales como, por ejemplo, levadura *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*) y/o sus subproductos de su crecimiento. En algunas formas de realización, la cepa microbiana se puede usar en combinación con otros tratamientos químicos y/o microbianos, incluso con otras especies y/o cepas de microbios.

En ciertas formas de realización, la composición a base de microbios de la presente invención comprende microorganismos y biotensioactivos. Los biotensioactivos pueden ser los producidos por los propios microorganismos, o los biotensioactivos se pueden agregar

sin purificar y/o en forma purificada. En algunas formas de realización, la composición comprende además un líquido iónico o semiiónico.

En algunas formas de realización, la composición comprende además una o más levaduras de panadería o cerveceras (*Saccharomyces cerevisiae*), extractos de levadura, sales y/o solventes.

En ciertas formas de realización, los biotensioactivos trabajan sinérgicamente con los solventes y otros metabolitos que también son producidos por los microbios.

En ciertas formas de realización, las composiciones de la presente invención tienen ventajas sobre, por ejemplo, los biotensioactivos solos, debido al uso del cultivo celular completo. Estas ventajas pueden incluir una o más de las siguientes: altas concentraciones de manoproteínas como una parte de la superficie externa de una pared celular de levadura; la presencia de beta-glucano en las paredes celulares de levadura; la presencia de biotensioactivos en el cultivo; y la presencia de metabolitos (por ejemplo, ácido láctico, etanol, beta-glucano, etc.). En ciertas formas de realización, los metabolitos sirven como solventes.

En una forma de realización, la presente invención proporciona métodos para producir un metabolito microbiano mediante el cultivo de una cepa microbiana en condiciones apropiadas para el crecimiento y la producción de tensioactivo; y la purificación del metabolito. Los ejemplos de metabolitos microbianos según la presente invención comprenden biotensioactivos, biopolímeros, solventes, enzimas, proteínas, ácidos, gases, toxinas, alcoholes, vitaminas, minerales, microelementos y aminoácidos. En una forma de realización preferida, el metabolito es un biotensioactivo.

Los productos en base a microbios de la presente invención se pueden usar en una variedad de entornos únicos debido a, por ejemplo, la capacidad de entregar de manera eficiente: caldo de fermentación fresco con metabolitos activos; una mezcla de células, esporas y/o micelios y caldo de fermentación; una composición con células vegetativas, esporas y/o micelios; composiciones con una alta densidad de células, incluidas células

vegetativas, esporas y/o micelios; productos a base de microbios en forma rápida; y productos basados en microbios en lugares remotos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS.

Las **figuras 1A-1B** muestran 100 g de precipitado de asfaltenos en Star 3+ con 4 g/L de SLP en solución iónica al 5% antes de agitar. **1A** muestra el vial de tratamiento desde abajo, en donde el precipitado se ve como sólidos oscuros asentados en el fondo. **1B** muestra el mismo vial de tratamiento desde el costado.

Las **figuras 2A-2B** muestran 100 g de precipitado de asfaltenos en Star 3+ con 4 g/L de SLP y solución iónica al 1% antes de agitar. **2A** muestra el vial tratamiento desde abajo, en donde el precipitado se ve como sólidos oscuros asentados en el fondo. **2B** muestra el mismo vial de tratamiento desde el costado.

Las **figuras 3A-3B** muestran 100 g de precipitado de asfaltenos en Star 3+ con 4 g/L de SLP antes de agitar. **3A** muestra el vial tratamiento desde abajo, en donde el precipitado se ve como sólidos oscuros asentados en el fondo. **3B** muestra el mismo vial de tratamiento desde el costado.

Las **figuras 4A-4B** muestran 100 g de precipitado de asfaltenos en el tratamiento con Star 3+ solo antes de agitar. **4A** muestra el vial tratamiento desde abajo, en donde el precipitado se ve como sólidos oscuros asentados en el fondo. **4B** muestra el mismo vial de tratamiento desde el costado.

Las **figuras 5 A-5B** muestran 100 g de precipitado de asfaltenos en el tratamiento con Star 3 solo antes de agitar. **5A** muestra el vial tratamiento desde abajo, en donde el precipitado se ve como sólidos oscuros asentados en el fondo. **5B** muestra el mismo vial de tratamiento desde el costado.

La **figura 6** muestra cada uno de los matraces en las figs. 1- 5, antes de agitar.

La **figura 7** muestra cada uno de los matraces en las figs. 1- 5, después de 5 horas de agitación.

Las **figuras 8A-8B** muestran la mejora o *upgrading* del coque de petróleo usando la invención la presente invención. **8A** muestra un contenedor de coque de petróleo duro como una roca, que requiere el uso de un martillo para soltarlo. **8B** muestra el coque de petróleo, licuado después de unas pocas horas de tratamiento con la presente invención.

La **figura 9** muestra un diagrama de flujo que ejemplifica la aplicación del presente producto en base a microbios dentro de un proceso de refinería de petróleo.

Las **figuras 10A-10B** muestran los resultados de un estudio de TGA en crudo pesado (**10A**) y aumento de BTU (**10B**) después del tratamiento con la presente invención.

La **figura 11** muestra el aumento de API y la reducción de la viscosidad después de la aplicación del presente tratamiento a tres tipos diferentes de petróleo a 80 °F (26,7 °C).

La **figura 12** muestra los resultados de la dispersión de parafinas y el tratamiento de estimulación de pozos en un pozo horizontal (Speechley Sand, PA).

La **figura 13** muestra los resultados de la dispersión de parafinas y el tratamiento de estimulación de pozos en un pozo vertical (Termpeauleau Dolomite, OH).

La **figura 14** muestra las ventajas de la presente invención en el control de las parafinas con respecto al uso de agua caliente, aceite caliente y métodos a base de solventes. En particular, los métodos tradicionales pueden remover temporalmente la cera de parafina, pero se deben repetir con frecuencia. Además, los tratamientos de circulación de aceite caliente y de agua caliente pueden dañar las formaciones al empujar la parafina más al fondo hacia la formación, y los solventes pueden ser extremadamente tóxicos.

La **figura 15** muestra asfalteno sólido (izquierda) y la dispersión del asfalteno sólido utilizando la presente invención (derecha).

La **figura 16** muestra el equipo contaminado con parafina antes y después del tratamiento con la presente invención.

La **figura 17** muestra el aumento de la producción en un pozo antes y después del tratamiento con la presente invención.

La **figura 18** muestra los efectos del presente tratamiento sobre el petróleo vendido (Litros), el medidor del tanque (Litros/D) y las ventas de gas ADJ (MCF/D x 3) antes y después del tratamiento de un pozo vertical (Speechley Sand, PA). Las dos líneas verticales continuas de color oscuro representan los puntos en los que se administraron los tratamientos al pozo. La tasa de producción de petróleo antes del tratamiento fue de 0,6 BPD y la tasa de producción de petróleo posterior al tratamiento fue de 2,3 BPD, con un aumento total de 280%.

La **figura 19** muestra los efectos del presente tratamiento sobre el petróleo vendido (Litros), tanques calibrados (Litros/D) y las ventas de gas (MCF/D) antes y después del tratamiento de un pozo vertical (Nineveh Sand, PA). Las dos líneas verticales continuas de color oscuro representan los puntos en los que se administraron los tratamientos al pozo.

La **figura 20** muestra de forma alterna ejemplos de un régimen de tratamiento de dispersión de parafinas y estimulación de pozos, con formaciones que tienen temperaturas de hasta 90 °C, pH de 2,0, 15 mD y 15% de porosidad y hasta 15% de salinidad.

La **figura 21** muestra el rango de geologías, profundidades, permeabilidades y temperaturas en las que la presente invención ha sido exitosa en el tratamiento de parafinas y asfaltenos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención proporciona productos ventajosos a base de microbios que contienen microbios y/o subproductos de su crecimiento. Los subproductos de su crecimiento pueden ser, por ejemplo, biotensioactivos, solventes y/o enzimas. La presente invención también proporciona métodos para usar estos productos a base de microbios. Ventajosamente, los productos y métodos a base de microbios de la presente invención crean un ecosistema microbiano, donde la mayoría, si no todos, los productos químicos son reemplazados por tratamientos microbianos. Por lo tanto, la presente invención es ambientalmente amigable, operacionalmente amigable y rentable en comparación con los tratamientos de control convencionales.

La presente invención proporciona composiciones y métodos para la remoción de parafinas y/o asfaltenos utilizando microbios productores de productos bioquímicos. Los productos bioquímicos producidos por los microbios puede ser, por ejemplo, biotensioactivos. En formas de realización adicionales, las composiciones y los métodos de la presente invención pueden licuar parafinas y asfaltenos sólidos, así como dispersar parafinas y asfaltenos que ha precipitado desde el petróleo.

En una forma de realización, la presente invención proporciona productos a base de microbios, así como su uso para mejorar el rendimiento de los pozos de petróleo y remover las composiciones contaminantes tales como biopelículas, incrustaciones, parafinas y/o asfaltenos desde los sitios de perforación de petróleo y los equipos de producción de petróleo.

En formas de realización adicionales, se pueden usar los materiales y métodos de la presente invención para la biorremediación, incluyendo la biorremediación de aguas, suelos y otros sitios contaminados con hidrocarburos.

En ciertas formas de realización, la presente invención proporciona un método para mejorar la eficiencia de la producción de petróleo mediante la aplicación a un pozo de petróleo de una composición que tiene un microbio de levadura y/o un producto del crecimiento del mismo. Opcionalmente, el método puede comprender además agregar nutrientes que son beneficiosos para el crecimiento microbiano, como, por ejemplo, nitrógeno, nitrato, fósforo, magnesio, carbono y/o sales aceptoras de electrones. Ventajosamente, el presente método trabaja para estimular simultáneamente el pozo de petróleo al mismo tiempo que remueve parafinas, asfaltenos, incrustaciones y/u otros contaminantes del pozo y de los equipos de producción de petróleo.

En ciertas formas de realización, los métodos se utilizan para la estimulación de los pozos de petróleo, y/o la mejora, reforzamiento y/o mantenimiento simultáneo de, por ejemplo, tuberías, perforaciones, tanques y otras estructuras y equipos involucrados en la producción, transporte, almacenamiento y/o refinación de petróleo y/o gas. El presente invento también se puede utilizar en el mantenimiento y/o la estimulación de pozos horizontales, verticales y/o de fracturación hidráulica o *fracking*, pozos casi agotados (o marginales), líneas de flujo y para limpiar los fondos de los tanques de almacenamiento.

En ciertas formas de realización, la composición a base de microbios de la presente invención comprende microorganismos y biotensioactivos. Los biotensioactivos pueden ser aquellos producidos por los propios microorganismos, o los biotensioactivos se pueden agregar en forma no purificada y/o purificada. En algunas formas de realización, la composición comprende además un líquido iónico o semiiónico.

En ciertas formas de realización, los biotensioactivos funcionan de forma sinérgica con otros metabolitos que también son producidos por los microbios.

En ciertas formas de realización, la presente invención proporciona un método para mejorar la eficiencia de la producción de petróleo mediante la aplicación a un pozo de petróleo de una composición que tiene un microbio de levadura y/o un producto del crecimiento del mismo. La composición puede comprender además levadura de panadería y/o levadura de cerveza, extractos de levadura, sales, solventes y biotensioactivos.

En formas de realización adicionales, se proporciona un método para la recuperación de petróleo mejorada bioquímicamente, en el que se aplica al pozo una composición que comprende uno o más de los siguientes: un biotensioactivo, hidróxido de amonio, una sal de amonio y un alcohol solvente. En este método, la composición no comprende un microorganismo, y por lo tanto, es particularmente útil para mejorar la producción de petróleo a partir de pozos casi agotados.

Opcionalmente, los métodos pueden comprender además agregar nutrientes que son beneficiosos para el crecimiento microbiano, como, por ejemplo, nitrógeno, nitrato, fósforo, magnesio, carbono y/o sales aceptoras de electrones.

Las composiciones y métodos de la presente invención se pueden usar para la remoción de parafinas y/o asfaltenos (por ejemplo, desde varillas, tuberías de producción, tubería de revestimiento, tanques, líneas de conducción, líneas de flujo, etc.) y emulsificación; prevención de la corrosión de los equipos de producción/transmisión/refinación de petróleo; reducción de la concentración de H_2S en los pozos y en el petróleo crudo extraído; limpieza de líneas de conducción de campos petroleros, tanques, líneas de flujo, tanques de almacenamiento y agujeros de pozos; remoción de

incrustaciones, lodos, y/o biopelículas; prevención de acumulación de incrustaciones, lodos, y/o biopelículas; dispersión de parafinas y/o asfaltenos precipitados; y reducción de la viscosidad del crudo pesado.

Ventajosamente, los presentes tratamientos de dispersión y licuefacción de parafinas y asfaltenos pueden liberar varillas atascadas o flotantes, permitiendo que los pozos inoperables reanuden la operación normal. Además, los presentes tratamientos pueden abrir canales obstruidos, lo que permite una mejor producción de petróleo. Aún más, los presentes tratamientos requieren frecuencias de aplicación más bajas en comparación con el aceite caliente, el agua o los solventes. La **figura 14** muestra una comparación de la presente invención con métodos convencionales.

En una forma de realización, una composición de la presente invención puede licuar eficientemente parafina sólida a, por ejemplo, 25 a 60°C. En algunas formas de realización, la presente invención también puede licuar eficientemente asfaltenos, asfaltos y resinas en componentes más valiosos y útiles, tales como destilados y/o fracciones de gasóleo, sin degradar el petróleo crudo en metano u otros gases. Esto se puede lograr, por ejemplo, durante la noche (o, en 12 horas o menos). Los asfaltenos y las resinas pueden, por ejemplo, mejorar su calidad (*upgrading*) transformándolos en una forma inflamable, soluble, que tiene ventajas sobre los estados sólidos menos inflamables de los mismos. Ventajosamente, las presentes composiciones y métodos operan sin causar un aumento en el TAN (número de ácido total) del petróleo.

La aplicación de los productos a base de microbios de la presente invención se puede realizar durante las operaciones de perforación (por ejemplo, durante la perforación, mientras la tubería viaja dentro o fuera del agujero, mientras se hace circular lodo, mientras se baja la tubería de revestimiento, mientras se coloca un revestimiento de producción, y/o mientras se realiza la cementación, etc.), y como un tratamiento de producción. Ventajosamente, los productos en base a microbios no forman biopelículas dentro de las formaciones y equipos que producen petróleo y gas.

En algunas formas de realización, el método utiliza cepas de levadura y/o subproductos de su crecimiento. En una forma de realización, el microbio usado en los

métodos de la presente invención es una levadura productora de biotensioactivo. La invención proporciona, por ejemplo, un producto a base de microbios que comprende *Starmerella bombicola* ATCC 22214 cultivada y/o productos del crecimiento de este microbio. Además, la invención proporciona un producto a base de microbios que comprende cepas de levadura killer cultivadas tal como, por ejemplo, levadura *Wickerhamomyces anomalus*. Levadura y/o sus subproductos de crecimiento.

En una forma de realización, esta invención proporciona un producto de fermentación de levadura designado como “Star 3” que se puede usar para licuar residuos de resina y asfaltenos precipitados y endurecidos. Star 3 se obtuvo a través del cultivo de la levadura productora de soforolípidos, *Starmerella bombicola* ATCC 22214. El caldo de fermentación después de 4 días de cultivo a 30 °C contenía la suspensión de células de levadura y 4 g/L de soforolípidos.

En una forma de realización, esta invención proporciona un producto de fermentación de levadura designado como “Star 3+” que se puede usar para licuar residuos de resina y asfaltenos precipitados y endurecidos. Star 3+ se obtuvo a través del cultivo de la levadura killer que produce soforolípidos, *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*) en un medio que contiene las fuentes necesarias de carbono, nitrógeno, minerales y, opcionalmente, sustancias antimicrobianas para prevenir el crecimiento de bacterias contaminantes. El cultivo se puede desarrollar con una fuente de carbono adicional, en particular, un aceite saturado. El caldo de fermentación se recogió después de 48-72 horas de cultivo a 25-30 °C y un pH de alrededor de 5,0 a alrededor de 5,5. Este es el producto Star 3+.

En una forma de realización, la presente invención proporciona un método para mejorar la eficiencia de la producción de petróleo mediante la aplicación a un pozo de petróleo de una composición que tiene un microbio de levadura *Starmerella* y/o un producto de crecimiento del mismo. En ciertas formas de realización, la composición comprende Star 3.

En una forma de realización, la presente invención proporciona un método para mejorar la eficiencia de la producción de petróleo mediante la aplicación a un pozo de petróleo de una composición que tiene un microbio de levadura killer (por ejemplo, *Pichia*

anomala) y/o un producto del crecimiento del mismo. En ciertas formas de realización preferidas, la composición comprende Star 3+.

En una forma de realización, las combinaciones a base de microbios de acuerdo con la presente invención se obtienen a través de procesos de cultivo que varían de pequeña a gran escala. El proceso de cultivo puede ser, por ejemplo, el cultivo sumergido, el cultivo en superficie, fermentación en estado sólido (SSF, por sus siglas en inglés), y/o una combinación de los mismos.

Definiciones seleccionadas

Como se usa en el presente documento, “contaminante” se refiere a cualquier sustancia que provoca que otra sustancia u objeto se ensucie o se vuelva impuro. Los contaminantes pueden ser vivos o no vivos y pueden ser sustancias o depósitos orgánicos o inorgánicos. Además, los contaminantes pueden incluir, pero no se limitan a, hidrocarburos, tales como petróleo, arenas bituminosas o asfaltenos; grasas, aceites y lubricantes (FOG, por sus sigla en inglés), como grasa para cocinar y manteca de cerdo; lípidos ceras, tales como parafina; resinas; biopelículas; o cualquier otra sustancia conocida tal como, por ejemplo, suciedad, polvo, incrustaciones (incluidas las incrustaciones de sulfuro de hierro), lodos, residuos, tapones, mugre, escoria, placas, acumulaciones o residuos.

Como se usa en el presente documento, el término “limpieza” tal como se emplea en el contexto de contaminantes o ensuciamiento significa la remoción o la reducción de contaminantes desde una superficie o una pieza de equipo. La limpieza puede incluir purificar, desincrustar, descontaminar, limpiar o desatascar, y se puede lograr por cualquier medio, incluyendo, pero no limitados a, fundición, dispersión, emulsión, disolución, raspado, degradación, limpieza a chorro, remojo o escisión del contaminante. La limpieza puede incluir además controlar, inhibir o prevenir que se produzca ensuciamiento o contaminación adicional.

Como se usa en el presente documento, la referencia a una “composición a base de microbios” significa una composición que comprende componentes que se produjeron como resultado del crecimiento de microorganismos u otros cultivos celulares. Por lo tanto, la

composición a base de microbios puede comprender los propios microbios y/o los subproductos del crecimiento microbiano. Los microbios pueden estar en estado vegetativo, en forma de esporas, en forma de micelio, en cualquier otra forma de propágulo, o en una mezcla de estas formas. Los microbios pueden estar en estado planctónico o en forma de biopelícula, o una mezcla de ambos. Los subproductos del crecimiento pueden ser, por ejemplo, metabolitos, componentes de la membrana celular, proteínas expresadas y/u otros componentes celulares. Los microbios pueden estar intactos o lisados. En formas de realización preferidas, en la composición a base de microbios están presentes los microbios junto con el caldo en el que se cultivaron. Los microbios pueden estar presentes, por ejemplo, en una concentración de 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , o 1×10^{11} o más propágulos por mililitro de la composición. Como se usa en el presente documento, un propágulo es cualquier porción de un microorganismo a partir del cual se puede desarrollar un organismo nuevo y/o maduro, incluyendo, pero no limitado a, células, esporas, micelios, brotes y semillas.

La presente invención proporciona además “productos a base de microbios”, que son productos que deben aplicarse en la práctica para lograr el resultado deseado. El producto a base de microbios puede ser simplemente la composición a base de microbios que se recolecta del proceso de cultivo de microbios. Alternativamente, el producto a base de microbios puede comprender ingredientes adicionales que se le han agregado. Estos ingredientes adicionales pueden incluir, por ejemplo, estabilizantes, tampones, portadores apropiados, tales como agua, soluciones salinas, o cualquier otro portador apropiado, nutrientes agregados para apoyar un mayor crecimiento microbiano, potenciadores del crecimiento no nutritivos, como hormonas vegetales, y/o agentes que facilitan el seguimiento de los microbios y/o la composición en el entorno al que se aplica. El producto a base de microbios también puede comprender mezclas de composiciones a base de microbios. El producto a base de microbios también puede comprender uno o más componentes de una composición a base de microbios que de alguna manera han sido procesados, tal como, pero no limitadas a, filtración, centrifugación, lisado, secado, purificación y similares.

Como se usa en el presente documento, una molécula de ácido nucleico, polinucleótido, polipéptido, proteína o compuesto orgánico “aislado” o “purificado”, tal

como una molécula pequeña, está sustancialmente libre de otros compuestos, como el material celular con el que está asociado en la naturaleza. Como se usa en el presente documento, la referencia a una cepa “aislada” significa que la cepa se elimina del entorno en el que existe en la naturaleza. Por lo tanto, 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 agrícola.

En ciertas formas de realización, los compuestos purificados son al menos el 60% en peso del compuesto de interés. Preferentemente, la preparación es al menos el 75%, más preferentemente al menos el 90%, y lo más preferentemente al menos el 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 mediante cualquier método estándar apropiado, por ejemplo, mediante cromatografía en columna, cromatografía en capa fina o análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Un polinucleótido purificado o aislado (ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN)) está libre de los genes o secuencias que lo flanquean en su estado natural. Un polipéptido purificado o aislado está libre de otras moléculas, o los aminoácidos que lo flanquean, en su estado natural.

Los rangos proporcionados en este documento se entienden como abreviados para todos los valores dentro del rango. Por ejemplo, se entiende que un rango de 1 a 20 incluye cualquier número, combinación de números o sub-rango del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20, así como todos los valores decimales intermedios entre los enteros mencionados anteriormente como, por ejemplo, 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,6; 1,7; 1,8; y 1,9. Con respecto a los sub-rangos, se contemplan específicamente los “sub-rangos anidados” que se extienden desde cualquier punto final del rango. Por ejemplo, un sub-rango anidado de un rango ilustrativo que va de 1 a 50 puede comprender de 1 a 10, de 1 a 20, de 1 a 30, y de 1 a 40 en una dirección, o de 50 a 40, de 50 a 30, de 50 a 20, y de 50 a 10 en la otra dirección.

Como se usa en el presente documento, “reduce” significa una alteración negativa de al menos 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75% o 100%.

Como se usa en el presente documento, “referencia” significa una condición estándar o de control.

Como se usa en el presente documento, “tolerante a la sal” en el contexto de un microbio significa que el microbio es capaz de crecer en una concentración de cloruro de sodio del 15% o más. En una forma de realización específica, “tolerante a la sal” se refiere a la capacidad de crecer en 150 g/L o más de NaCl.

Un “metabolito” se refiere a cualquier sustancia producida por el metabolismo (es decir, un subproducto del crecimiento) o una sustancia cuya participación es necesaria en un proceso metabólico particular. Un metabolito puede ser un compuesto orgánico que es un material de partida (por ejemplo, glucosa), un intermediario (por ejemplo, acetil-CoA), o un producto final (por ejemplo, n-butanol) del metabolismo. Los ejemplos de metabolitos incluyen, pero no se limitan a, enzimas, toxinas, ácidos, solventes, gases, alcoholes, proteínas, vitaminas, minerales, microelementos, aminoácidos, polímeros y tensioactivos.

Como se usa en el presente documento, “tensioactivo” significa un compuesto que baja la tensión superficial (o tensión interfacial) entre dos líquidos o entre un líquido y un sólido. Los tensioactivos actúan como detergentes, agentes humectantes, emulsionantes, agentes espumantes y/o dispersantes. Un “biotensioactivo” es una sustancia tensioactiva producida por una célula viva.

Tal como se usa en el presente documento, “petróleo pesado” o “hidrocarburos pesados” significa fluidos de hidrocarburos viscosos. Los hidrocarburos pesados pueden incluir fluidos de hidrocarburos altamente viscosos como el petróleo pesado, el petróleo extra pesado, el alquitrán y/o el asfalto. Los petróleos pesados y extra pesados son muy viscosos con una densidad cercana o incluso superior al agua. Los hidrocarburos pesados pueden comprender cantidades moderadas a altas de parafinas, resinas y asfaltenos, así como concentraciones más pequeñas de azufre, oxígeno y nitrógeno. Los hidrocarburos pesados también pueden incluir compuestos aromáticos u otros hidrocarburos con anillos complejos. En los hidrocarburos pesados también pueden estar presentes elementos adicionales en pequeñas cantidades. Los hidrocarburos pesados pueden clasificarse por gravedad API. Los hidrocarburos pesados generalmente tienen una gravedad API por debajo de unos 20°, por

ejemplo, el petróleo pesado generalmente tiene una gravedad API de alrededor de 10-20°, mientras que el petróleo extra pesado generalmente tiene una gravedad API por debajo de alrededor de 12°. La viscosidad de los hidrocarburos pesados generalmente es mayor que alrededor de 200 cp ($2\text{g}/(\text{cm}\cdot\text{s})$) en las condiciones del yacimiento, y la del petróleo extra pesado es generalmente de alrededor de 10.000 cp ($100\text{ g}/(\text{cm}\cdot\text{s})$) o más.

Crecimiento de los microbios según la invención

La presente invención proporciona métodos para el cultivo de microorganismos y la producción de metabolitos microbianos y/u otros subproductos del crecimiento microbiano. Los sistemas de cultivo microbiano típicamente usan fermentación de cultivo sumergido; sin embargo, también se pueden utilizar sistemas de cultivo en superficie y cultivos híbridos. Como se usa en el presente documento, “fermentación” se refiere al crecimiento de células en condiciones controladas. El crecimiento podría ser aeróbico o anaeróbico.

En una forma de realización, la presente invención proporciona 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).

En una forma de realización, la presente invención proporciona métodos para producir un metabolito microbiano mediante el cultivo de una cepa microbiana de la presente invención en condiciones apropiadas para el crecimiento y la producción del metabolito; y la purificación del metabolito. En una forma de realización específica, el metabolito es un biotensioactivo.

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

En una forma de realización adicional, el recipiente también puede controlar el crecimiento de los microorganismos dentro del recipiente (por ejemplo, midiendo el número de células y las fases de crecimiento). Alternativamente, se puede tomar una muestra diaria del recipiente y someterla a enumeración mediante técnicas conocidas en el arte, como la técnica de dilución en placas. La dilución en placas es una técnica simple que se utiliza para estimar el número de microbios en una muestra. La técnica también puede proporcionar un índice mediante el cual se pueden comparar diferentes medioambientes o tratamientos.

En una forma de realización, el método incluye suplementar el cultivo con una fuente de nitrógeno. La fuente de nitrógeno puede ser, por ejemplo, nitrato de potasio, nitrato de amonio, sulfato de amonio, fosfato de amonio, amoníaco, urea y/o cloruro de amonio. Estas fuentes de nitrógeno se pueden usar de forma independiente o usando una combinación de dos o más de ellas.

El método puede proporcionar oxigenación al cultivo en crecimiento. Una forma de realización utiliza el movimiento lento del aire para eliminar el aire que contiene poco oxígeno e introducir aire oxigenado. El aire oxigenado se puede suplementar diariamente con aire ambiente mediante mecanismos que incluyen impulsores para la agitación mecánica del líquido, y burbujeadores de aire para suministrar burbujas de gas al líquido y permitir que el oxígeno se disuelva en éste.

El método puede comprender además suplementar 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, isopropílico, propanol, butanol, pentanol, hexanol, isobutanol y/o glicerol; grasas y aceites tales como aceite de soja, aceite de salvado de arroz, aceite de canola, aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de sésamo y/o aceite de linaza; estas fuentes de carbono se pueden usar de forma independiente o en una combinación de dos o más.

En una forma de realización preferida, el método comprende el uso de dos fuentes de carbono, una de las cuales es un aceite saturado seleccionado de canola, vegetal, maíz, coco, oliva o cualquier otro aceite adecuado para usar en, por ejemplo, la cocción. En una forma de realización específica, el aceite saturado es 2% de aceite de canola.

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

En una forma de realización, también se pueden incluir sales inorgánicas. Las sales inorgánicas utilizables pueden ser dihidrógeno fosfato de potasio, fosfato de hidrógeno dipotásico, fosfato de hidrógeno disódico, sulfato de magnesio, cloruro de magnesio, sulfato de hierro, cloruro de hierro, sulfato de manganeso, cloruro de manganeso, sulfato de zinc, cloruro de plomo, sulfato de cobre, cloruro de calcio, carbonato de calcio, cloruro de sodio y/o carbonato de sodio. Estas sales inorgánicas se pueden usar de forma independiente o en una combinación de dos o más.

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

El pH de la mezcla debe ser adecuado para el microorganismo de interés. Se pueden usar tampones y reguladores de pH, como carbonatos y fosfatos, para estabilizar el pH cerca

de un valor preferido. Cuando los iones metálicos están presentes en altas concentraciones, puede ser necesario el uso de un agente quelante en el medio líquido.

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

En una forma de realización, el método para el cultivo de microorganismos se lleva a cabo a alrededor de 5 °C a alrededor de 100 °C, preferentemente, 15 a 60 °C, más preferentemente, 25 a 50 °C. En una forma de realización adicional, el cultivo se puede llevar a cabo de forma continua a una temperatura constante. En otra forma de realización, el cultivo puede estar sujeto a cambios en las temperaturas.

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

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

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

El subproducto del crecimiento microbiano producido por microorganismos de interés puede retenerse en los microorganismos o secretarse al medio líquido. En otra forma de realización, el método para producir un subproducto del crecimiento microbiano puede comprender además etapas de concentración y purificación del subproducto del crecimiento microbiano de interés. En una forma de realización adicional, el medio líquido puede contener compuestos que estabilizan la actividad del subproducto del crecimiento microbiano.

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

En otra forma de realización, solo una parte del producto de fermentación se elimina en un momento dado. En esta forma de realización, biomasa con células viables permanece en el recipiente como inoculante para un nuevo lote de cultivo. La composición que se elimina puede ser un caldo libre de microbios o contener células, esporas, micelios, conidios u otros propágulos reproductivos v. De esta manera, se crea un sistema casi continuo.

Ventajosamente, el método no requiere equipos complicados o un alto consumo de energía. Los microorganismos de interés se pueden cultivar en pequeña o gran escala en el sitio y utilizarse, incluso cuando aún están mezclados con sus medios. De manera similar, los metabolitos microbianos también se pueden producir en grandes cantidades en el sitio en que se los necesita.

Ventajosamente, los productos en base a microbios se pueden producir en lugares remotos. En una forma de realización, los productos en base a microbios se pueden usar para la nutrición humana y/o prevención y/o tratamiento de enfermedades. Las instalaciones para el crecimiento de microbios pueden operar fuera de la red de servicios utilizando, por ejemplo, energía solar, eólica y/o hidroeléctrica.

Cepas microbianas cultivadas de acuerdo con la presente invención

Los microorganismos cultivados según los sistemas y métodos de la presente invención pueden ser, por ejemplo, bacterias, levaduras y/u hongos. Estos microorganismos pueden ser naturales, o microorganismos genéticamente modificados. Por ejemplo, los microorganismos se pueden transformar con genes específicos para que exhiban características específicas. Los microorganismos también pueden ser mutantes de una cepa deseada. Los procedimientos para generar mutantes son bien conocidos en la técnica microbiológica. Por ejemplo, para este fin se utilizan ampliamente la luz ultravioleta y la nitrosoguanidina.

En una forma de realización, el microorganismo es una levadura u hongo. Las especies de hongos y levaduras adecuadas para su uso de acuerdo con la presente invención incluyen *Candida*, *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, *S. boulardii* *sequela*, *S. torula*), *Issalchenkia*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Wickerhamomyces* (por ejemplo, *W. anomalus*), *Starmerella* (por ejemplo, *S. bombicola*), *Mycorrhiza*, *Mortierella*, *Phycomyces*, *Blakeslea*, *Thraustochytrium*, *Phythium*, *Entomophthora*, *Aureobasidium pullulans*, *Pseudozyma aphidis*, *Fusarium venenatum*, *Aspergillus*, *Trichoderma* (por ejemplo, *T. reesei*, *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. viride*), y/o *Rhizopus spp.*

En una forma de realización, la levadura es una levadura killer. Como se usa en el presente documento, “levadura killer” significa una cepa de levadura caracterizada por su secreción de proteínas tóxicas o glicoproteínas, a las cuales la cepa es inmune. Las exotoxinas secretadas por las levaduras killer son capaces de matar otras cepas de levaduras, hongos o bacterias. Por ejemplo, los microorganismos que pueden ser controlados por la levadura killer incluyen *Fusarium* y otros hongos filamentosos. Ejemplos de levaduras killers de acuerdo con la presente invención son las que se pueden usar de manera segura en las industrias de alimentos y fermentación, por ejemplo, en las industrias de elaboración de cervezas, vinos y panificación; aquellas que se pueden usar para controlar otros microorganismos que podrían contaminar tales procesos de producción; aquellas que se pueden usar en el biocontrol para la conservación de alimentos; aquellas que se pueden usar para el tratamiento de infecciones fúngicas en humanos y plantas; y aquellas que se pueden usar en tecnologías de ADN recombinante. Tales levaduras pueden incluir, pero no se limitan a, *Wickerhamomyces*, *Pichia* (por ejemplo, *P. anomala*, *P. guilliermondii*, *P. kudriavzevii*), *Hansenula*,

Saccharomyces, *Hanseniaspora*, (por ejemplo, *H. uvarum*), *Ustilago maydis*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Torulopsis*, *Ustilago*, *Williopsis*, *Zygosaccharomyces* (por ejemplo, *Z. bailii*), y otras.

En formas de realización preferidas, los microbios se pueden elegir entre cepas de levaduras killer. En formas de realización aún más preferidas, los microbios son cepas de *Wickerhamomyces anomalus*.

Wickerhamomyces anomalus, también conocida como *Pichia anomala* y *Hansenula anomala*, se asocia frecuentemente con la producción de alimentos y granos. *W. anomalus* produce una toxina killer que comprende exo- β -1,3-glucanasa. Además, *W. anomalus* produce biotensioactivos que son capaces de reducir la tensión superficial/interfacial del agua, así como de varios otros solventes, enzimas y metabolitos útiles, tales como fitasa, acetato de etilo, ácido acético, ácido láctico, alcohol isopropílico, etanol y otros.

En una forma de realización, la cepa microbiana se elige del clado de *Starmerella*. Un cultivo de un microbio *Starmerella* útil de acuerdo con la presente invención, *Starmerella bombicola*, se puede obtener de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209 USA. El depósito tiene asignado el número de acceso ATCC No. 22214 por parte del depositario.

En una forma de realización, la presente invención proporciona el uso de la cepa de levadura ATCC 22214 y sus mutantes. Esta cepa es un productor efectivo de biotensioactivos soforolípidos (SLP).

En una forma de realización, el microbio es una cepa de *Pseudozyma aphidis*. Este microbio es un productor efectivo de biotensioactivos lipídicos de manosileritritol (MEL).

En algunas formas de realización, los microorganismos son bacterias, incluyendo bacterias grampositivas y gramnegativas. Las bacterias pueden ser, por ejemplo, (por ejemplo, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. firmus*, *B. laterosporus*, *B. megaterium*, *B. amyloliquifaciens*), *Clostridium* (*C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*, *C. acetobutyricum*, *Clostridium* NIPER 7, and *C. beijerinckii*), *Azobacter* (*A. vinelandii*, *A. chroococcum*),

Pseudomonas (*P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* (Kluyver), *P. aeruginosa*), *Agrobacterium radiobacter*, *Azospirillum brasiliensis*, *Rhizobium*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Ralstonia eulropha*, and/or *Rhodospirillum rubrum*.

En una forma de realización, el microbio es una cepa no patógena de *Pseudomonas*. Preferentemente, la cepa es una cepa productora de biotensioactivos ramnolípidos (RLP).

En una forma de realización, el microbio es una cepa de *Bacillus subtilis*, que es una cepa productora efectiva de biotensioactivos surfactina.

De acuerdo con la presente invención, se pueden usar otras cepas microbianas que incluyen, por ejemplo, otras cepas fúngicas capaces de acumular cantidades significativas de, por ejemplo, biotensioactivos glicolípidos. Los biotensioactivos útiles de acuerdo con la presente invención incluyen manoproteínas, beta-glucano y otros metabolitos que tienen propiedades bioemulsionantes y reductoras de la tensión superficial/interfacial.

Preparación de productos a base de microbios

Un producto a base de microbios de la presente invención es simplemente el caldo de fermentación que contiene el microorganismo y/o los metabolitos microbianos producidos por el microorganismo y/o cualquier nutriente residual. El producto de la fermentación se puede utilizar directamente sin extracción ni purificación. Si se desea, la extracción y la purificación se pueden lograr fácilmente utilizando métodos o técnicas de extracción y/o purificación estándar descritos en la literatura.

Los microorganismos en el producto a base de microbios pueden estar en forma activa o inactiva. Los productos basados en microbios se pueden usar sin estabilización, conservación y almacenamiento adicional. Ventajosamente, el uso directo de estos productos en base a microbios preserva una alta viabilidad de los microorganismos, reduce la posibilidad de contaminación por agentes extraños y microorganismos indeseables, y mantiene la actividad de los subproductos del crecimiento microbiano.

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

En otras formas de realización, la composición (microbios, caldos o microbios y caldos) se puede colocar en contenedores de tamaño apropiado teniendo en cuenta, por ejemplo, el uso previsto, el método de aplicación contemplado, el tamaño del tanque de fermentación, y cualquier modo de transporte que se use para transportarla desde la instalación de cultivo de microbios hasta lugar en que va a ser usado. Por lo tanto, los contenedores en los que se coloca la composición a base de microbios pueden tener, por ejemplo, de 1 galón a 1.000 galones ($0,004 \text{ m}^3$ a $3,785 \text{ m}^3$) o más. En otras formas de realización, los contenedores son de 2 galones ($0,008 \text{ m}^3$), 5 galones ($0,019 \text{ m}^3$), 25 ($0,095 \text{ m}^3$) galones o más.

En ciertas formas de realización, las composiciones de la presente invención tienen ventajas sobre, por ejemplo, biotensioactivos solos, incluyendo una o más de las siguientes: alta concentraciones de manoproteínas como una parte de la superficie externa de la pared celular de levadura (la manoproteína es un bioemulsionante altamente efectivo capaz de alcanzar hasta un 80% de índice de emulsificación); la presencia de biopolímero beta-glucano (un emulsionante) en las paredes celulares de levadura; La presencia de biotensioactivos en el cultivo, que son capaces de reducir tanto la tensión superficial como la interfacial; y la presencia de metabolitos (por ejemplo, ácido láctico, etanol, etc.).

Tras la recolección de la composición a base de microbios desde los recipientes de crecimiento, se pueden agregar componentes adicionales a medida que el producto recolectado se coloca en contenedores y/o se transporta a través de tuberías (o se transporta para su uso de alguna otra manera). Los aditivos pueden ser, por ejemplo, tampones, portadores, otras composiciones a base de microbios producidas en la misma instalación o en una instalación diferente, modificadores de viscosidad, conservantes, nutrientes para el crecimiento de microbios, agentes de seguimiento, solventes, biocidas, otros microbios y otros ingredientes específicos para un uso previsto.

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

En una forma de realización, la composición puede comprender además agentes de tamponamiento que incluyen compuestos orgánicos y aminoácidos o sus sales. Los tampones adecuados incluyen citrato, gluconato, tartarato, malato, acetato, lactato, oxalato, aspartato, malonato, glucoheptonato, piruvato, galactarato, glucarato, tartronato, glutamato, glicina, lisina, glutamina, metionina, cisteína, arginina y una mezcla de los mismos. También se pueden usar ácido fosfórico y fosforoso o sus sales. Los tampones sintéticos son adecuados para su uso, pero es preferible usar tampones naturales tales como los orgánicos y los aminoácidos o sus sales enumeradas anteriormente.

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

En una forma de realización, se pueden incluir en la formulación componentes adicionales, tales como una preparación acuosa de una sal como ácido poliprótico, tal como bicarbonato o carbonato de sodio, sulfato de sodio, fosfato de sodio, bifosfato de sodio.

En algunas formas de realización, se pueden agregar componentes adicionales para aumentar la efectividad de la composición a base de microbios y su uso en el tratamiento de hidrocarburos, por ejemplo, al permitir una mayor extracción de las fracciones de hidrocarburos ligeros, como el petróleo ligero y/o las fracciones de alquitrán de asfalto.

Por ejemplo, en una forma de realización, la composición puede comprender biotensioactivos o solventes purificados añadidos, además de los ya presentes en la composición debido al metabolismo microbiano. En una forma de realización, se pueden añadir líquidos iónicos o semiiónicos a la composición para aumentar su efectividad. Por ejemplo, se puede añadir un 1%, 2%, 3%, 4%, 5% o más de líquido iónico a la composición.

Los líquidos iónicos pueden actuar como cosolventes y pueden prevenir la formación de enlaces en forma de anillo en las composiciones de hidrocarburos, que es una de las causas de la precipitación de hidrocarburos.

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

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

En una forma de realización, esta invención proporciona un producto de fermentación de levadura designado como “Star 3” que se puede usar para licuar, por ejemplo, residuos de resina, parafinas, asfaltenos precipitados y endurecidos. Star 3 se obtuvo a través del cultivo de la levadura productora de soforolípidos, *Starmerella bombicola* ATCC 22214. El caldo de fermentación después de 4 días de cultivo a 30 °C contiene la suspensión de células de levadura y 4 g/L de soforolípidos.

En una forma de realización, la presente invención proporciona un método para mejorar la eficiencia de producción de petróleo mediante la aplicación a un pozo de petróleo de una composición que tiene un microbio de la levadura *Starmerella* y/o un producto del crecimiento del mismo. En ciertas formas de realización, la composición comprende Star 3.

En una forma de realización, esta invención proporciona un producto de fermentación de levadura designado como “Star 3+” que se puede usar para licuar residuos de resina y asfaltenos precipitados y endurecidos y al mismo tiempo mejorar la recuperación de petróleo

de un pozo de petróleo. Star 3+ se obtuvo a través del cultivo de la levadura killer, *Wickerhamomyces anomalus* en un medio que contiene las fuentes necesarias de carbono, nitrógeno, minerales y, opcionalmente, sustancias antimicrobianas para prevenir el crecimiento bacteriano contaminante. El cultivo se puede desarrollar con una fuente de carbono adicional, en particular, un aceite saturado. El caldo de fermentación se recogió después de 48-72 horas de cultivo a 25-30 °C y un pH de alrededor de 5,0 a alrededor de 5,5.

Ventajosamente, Star 3 y Star 3+ no forman biopelículas dentro de las formaciones y/o equipos para producir petróleo y gas.

Ventajosamente, las presentes composiciones se pueden usar para mejorar simultáneamente la recuperación de petróleo (por ejemplo, estimulando un pozo de petróleo), al mismo tiempo que eliminan parafinas, asfaltenos, incrustaciones, biopelículas y otros contaminantes desde el equipo de producción de petróleo.

En una forma de realización, la presente invención proporciona un método para mejorar la eficiencia de producción de petróleo aplicando a un pozo de petróleo una composición que tiene un microbio de levadura killer y/o un producto de crecimiento del mismo. En ciertas formas de realización, la composición comprende Star 3+.

En ciertas formas de realización preferidas, la composición comprende Star 3+, levadura de panadería y/o levadura de cerveza (es decir, una o más cepas de *Saccharomyces cerevisiae*), extracto de levadura, sales, solventes y biotensioactivos.

Los biotensioactivos de acuerdo con la presente invención incluyen, por ejemplo, glicolípidos (GL) de bajo peso molecular, lipopéptidos (LP), flavolípidos (FL), fosfolípidos y polímeros de alto peso molecular como lipoproteínas, complejos de lipopolisacáridos y proteínas. Complejos de polisacárido-proteína-ácido graso. En una forma de realización, el biotensioactivo microbiano es un glicolípido tal como ramnolípidos (RLP), soforolípidos (SLP), lípidos de trehalosa o lípidos de manosileritritol (MEL).

Los biotensioactivos pueden agregarse en forma purificada o pueden estar presentes en la composición a base de microbios como resultado del crecimiento microbiano.

Preferentemente, el biotensioactivo es un soforolípido a una concentración de alrededor de 1 g/L a 10 g/L, preferentemente de alrededor de 2 a 5 g/L.

En algunas formas de realización, el biotensioactivo también puede ser un lipopéptido, tal como surfactina y/o un ramnolípido. La surfactina se puede agregar a una concentración no mayor a 0,05 g/L. El ramnolípido se puede agregar en una concentración no mayor a 0,05 g/L.

En algunas formas de realización, está presente una mezcla de biotensioactivos. Preferentemente, la mezcla comprende soforolípidos, y opcionalmente uno o ambos de un lípido de manosileritritol, una surfactina o un ramnolípido.

En algunas formas de realización, uno de los solventes utilizados en la composición se selecciona entre alcoholes minerales u orgánicos, que incluyen, por ejemplo, etanol, butanol, propanol y alcohol isopropílico. En una forma de realización preferida, se añade alcohol isopropílico en una cantidad de 1 a 100 ml/L, más preferentemente de 2 a 50 ml/L, a la composición.

En algunas formas de realización, la composición comprende además un líquido iónico o semiiónico como solvente. Los líquidos iónicos pueden actuar como cosolventes y pueden prevenir la formación de enlaces en forma de anillo en las composiciones de hidrocarburos, que es una de las causas de la precipitación de hidrocarburos. Los líquidos iónicos ilustrativos adecuados para la presente composición incluyen, pero no se limitan a, nitrato de etilamonio o glicerina/sulfato de magnesio heptahidratado. Preferentemente, la concentración de líquido iónico en la composición varía de alrededor de 0,1% a alrededor de 5%.

Los líquidos iónicos están compuestos completamente de iones o una combinación de cationes y aniones. Muchos líquidos iónicos se encuentran en forma de sales orgánicas con puntos de fusión por debajo de 100 °C, o a menudo incluso por debajo de la temperatura ambiente. Los líquidos iónicos más comunes son aquellos preparados a partir de cationes de base orgánica y aniones inorgánicos u orgánicos. Al menos un ion tiene una carga deslocalizada y un componente es orgánico, lo que evita la formación de una red cristalina

estable. Los líquidos iónicos pueden ser adecuados, por ejemplo, para su uso como catalizadores y solventes en reacciones de alquilación y polimerización, así como en reacciones de dimerización, acetilación de oligomerización, metátesis y copolimerización. Las propiedades de los líquidos iónicos, como el punto de fusión, la viscosidad y la solubilidad, están determinadas por los sustituyentes en el componente orgánico y por el contraión.

En algunas formas de realización, la composición comprende además hidróxido de amonio como solvente. Preferentemente, el hidróxido de amonio (solución al 70%) está presente en la composición a una concentración de alrededor de 1 a 50 ml/L, más preferentemente de 3 a 10 ml/L.

En algunas formas de realización, la composición comprende además sales y/o sales minerales seleccionadas de fósforo, magnesio, potasio, glucosa y amonio. Preferentemente, se agregan de 1 a 20 g/L, y más preferentemente de 2 a 10 g/L de sal de amonio, por ejemplo, fosfato de amonio, fosfato de diamonio, cloruro de amonio u otra sal dibásica o monobásica.

En algunas formas de realización, la composición comprende además extracto de levadura a una concentración de 1 a 50 g/L, preferentemente de 1 a 20 g/L.

En algunas formas de realización en las que hay, por ejemplo, una alta presencia de cera e incrustaciones, la composición puede comprender levadura de panadería y/o levadura de cerveza (es decir, una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*). Preferentemente, la concentración de levadura *Saccharomyces* presente en la composición es de 0% a 1%.

En una forma de realización, esta invención proporciona un producto bioquímico para mejorar la recuperación de petróleo. El producto para la recuperación de petróleo mejorada bioquímicamente puede comprender uno o más de cada uno de los siguientes: uno o más biotensioactivos, hidróxido de amonio, una sal de amonio, y un solvente de alcohol, pero no comprende microorganismos. Esto es particularmente útil para mejorar la recuperación de petróleo de los pozos casi agotados.

La mezcla de biotensioactivos utilizados en el producto para la recuperación de petróleo mejorada bioquímicamente puede formularse utilizando cualquier número de

combinaciones y proporciones. En ciertas formas de realización, la composición comprende SLP, MEL, RLP y/o surfactina.

En ciertas formas de realización, la mezcla de biotensioactivos comprende solo SLP a una concentración de alrededor de 2 ml (de 400-500 g/L de solución) por litro de composición.

En algunas formas de realización, la composición para la recuperación de petróleo mejorada bioquímicamente comprende un solvente. El solvente puede ser un alcohol, por ejemplo, etanol o alcohol isopropílico. En formas de realización específicas, el solvente es alcohol isopropílico en una concentración de 1 ml/L a 5 ml/L, preferentemente una concentración de alrededor de 3 ml/L. En ciertas formas de realización, el solvente se agrega en una concentración de 25 a 100 g/L, preferentemente de 30 a 35 g/L.

En algunas formas de realización, la sal de amonio puede ser cloruro de amonio, fosfato de amonio o fosfato de diamonio. En formas de realización específicas, la sal de amonio es fosfato de amonio o fosfato de diamonio a una concentración de 1 a 5 ml/L, preferentemente alrededor de 2 ml/L. En ciertas formas de realización, la sal de amonio se agrega en una concentración de 2 a 10 g/L.

En algunas formas de realización, la composición para la recuperación de petróleo mejorada bioquímicamente comprende hidróxido de amonio. En formas de realización específicas, la concentración de hidróxido de amonio es de 1 ml/L a 10 ml/L, preferentemente alrededor de 3 ml/L. En algunas formas de realización, el hidróxido de amonio es una solución al 70%.

En una forma de realización ilustrativa, el producto a base de microbios se formula agregando 100 galones ($0,38 \text{ m}^3$) del medio de cultivo que comprende el microorganismo y sus subproductos de crecimiento, con 100 galones ($0,38 \text{ m}^3$) de una solución de agua y biotensioactivos. Los biotensioactivos, preferentemente soforolípidos, están presentes en la composición final en una concentración de 0,005 a 0,1 g/L. También se pueden agregar al producto alcohol isopropílico (2-50 ml/L) y fosfato de diamonio o fosfato de amonio (2-5 g/L).

Remoción de contaminantes al mismo tiempo que se mejora la recuperación de petróleo

La presente invención proporciona materiales y métodos para mejorar la producción de petróleo en un sitio de perforación petrolera. Ventajosamente, la presente invención utiliza un tratamiento para realizar dos mecanismos simultáneos para mejorar la recuperación de petróleo. En particular, la presente invención se puede usar para mejorar la recuperación de petróleo, por ejemplo, estimulando el flujo de petróleo de un pozo, al mismo tiempo que se eliminan parafinas, asfaltenos, incrustaciones y otros contaminantes de los pozos de petróleo y equipos de producción de petróleo que podrían, por ejemplo, obstruir o ralentizar el flujo de petróleo. Esta invención es particularmente útil en pozos verticales y también se puede usar para mejorar la recuperación de petróleo de pozos casi agotados (o de baja producción).

En un aspecto, la presente invención proporciona métodos, sistemas y dispositivos para aplicar los productos en base a microbios para eliminar parafinas, asfaltenos y otras sustancias contaminantes desde, por ejemplo, tubos, tuberías, pozos, perforaciones, tanques, bombas y otros equipos y materiales. En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos y materiales para tratar el petróleo que contiene tales contaminantes. Ventajosamente, el uso de la presente invención puede mejorar y/o aumentar la producción de los pozos de petróleo, ayudar en la estimulación de los pozos de petróleo, así como restaurar la producción en pozos que presentan una producción insuficiente o incluso en pozos muertos.

La presente invención es respetuosa con el medio ambiente, ya que puede reducir sustancialmente las emisiones de gases de efecto invernadero relacionadas con la producción de crudo pesado, por ejemplo, en un 50%, en comparación con las operaciones existentes. Esto se debe principalmente a una reducción en la necesidad de transporte y acarreo a través de camiones que queman combustible, sino también debido a una reducción en el metano que se libera por el tratamiento del petróleo, y de los escapes de motores, turbinas y calentadores a fuego durante la extracción y necesaria refinación de los petróleos pesados.

En formas de realización específicas, se proporcionan métodos para mejorar simultáneamente la recuperación de petróleo de un pozo de petróleo al mismo tiempo que se eliminan contaminantes del equipo de producción o procesamiento de petróleo y/o gas, en

donde los métodos comprenden la aplicación de una composición de la presente invención al pozo y/o equipo. El método puede comprender además la aplicación de nutrientes para el crecimiento microbiano.

En una forma de realización, el método puede comprender además la aplicación al pozo de soforolípidos (0,005 - 0,1 g/L), fosfato de amonio o fosfato de diamonio (2-5 g/L), y alcohol isopropílico (2-50 ml/L).

Tal como se usa en el presente documento, “aplicar” una composición o producto se refiere a ponerlo en contacto con un objetivo o sitio de manera que la composición o producto pueda tener un efecto en ese objetivo o sitio. El efecto puede deberse, por ejemplo, al crecimiento microbiano y/o la acción de un biotensioactivo, solvente y/u otro subproducto del crecimiento. Las composiciones según la presente invención se pueden usar para limpiar tuberías, tanques, tubos, varillas, bombas, equipos, suelos y/o superficies o materiales. Por ejemplo, los productos en base a microbios también pueden inyectarse en pozos de petróleo y/o en tuberías, bombas, tanques, etc. asociados con pozos de petróleo.

Hay muchos tipos de contaminantes asociados con los equipos de procesamiento de petróleo, como petróleos, parafinas, asfaltos/asfaltenos, resinas, azufre, subproductos de alquitrán, biopelículas y otros materiales viscosos. La composición de la presente invención se puede usar para eliminar uno o más de los contaminantes asociados con la recuperación, transmisión y procesamiento del petróleo.

En una forma de realización, una composición de la presente invención puede licuar parafina sólida a, por ejemplo, 25 a 60°C. En algunas formas de realización, la presente invención también puede licuar asfaltenos, asfaltos y resinas para formar componentes más valiosos y útiles, tales como destilados más ligeros y/o fracciones de gasóleo, sin degradar el petróleo crudo a metano u otros gases indeseables. Esto se puede lograr, por ejemplo, durante la noche, es decir, en doce horas o menos. Por ejemplo, los asfaltenos y las resinas pueden mejorarse para transformarse en una forma inflamable, soluble, que tiene ventajas sobre los estados sólidos menos inflamables de los mismos.

En ciertas formas de realización, la presente invención puede usarse para la dispersión de parafinas, asfaltenos y/u otras sustancias contaminantes precipitadas, permitiendo así una remoción más fácil y menos costosa de estos contaminantes del petróleo crudo y del equipo.

En una forma de realización ilustrativa, la dispersión de parafinas y/o asfaltenos se puede lograr aplicando entre alrededor de 200-600 galones ($0,76 \text{ m}^3$ a $2,27 \text{ m}^3$) de tratamiento en el espacio anular que se forma entre la tubería de producción y la tubería de revestimiento, donde puede fluir a través de la bomba y hacia la tubería de producción. El tratamiento puede producir efectos en menos de 24 horas de tiempo de cierre. Preferentemente, no se requiere tiempo de cierre.

En otra forma de realización ilustrativa, se puede lograr una estimulación adicional del pozo, es decir, aumentos de producción, además de la dispersión de las parafinas y/o asfaltenos. Por ejemplo, después de la aplicación del tratamiento de dispersión de parafinas y/o asfaltenos, se puede aplicar un volumen de 2384 a 158987 Litros del presente tratamiento en el espacio anular entre la tubería de producción y la tubería de revestimiento, donde luego puede ser desplazado hacia la formación. La porosidad, la permeabilidad y el espesor de la formación pueden determinar los volúmenes de tratamiento utilizados. Después de un tiempo de cierre de alrededor de 3 días, la viscosidad y la tensión interfacial se reducen, lo que lleva a un aumento drástico de la producción.

Ventajosamente, la presente invención se puede aplicar durante todas las etapas de la cadena de operaciones, incluidos los operadores de exploración y producción (E&P, por sus siglas en inglés) (por ejemplo, agujeros de pozos en tierra y en alta mar, líneas de flujo y tanques), en los equipos y etapas intermedias del proceso (por ejemplo, líneas de conducción, camiones cisterna, transporte, almacenamiento, tanques), y en las refinerías (por ejemplo, intercambiadores de calor, hornos, torres de destilación, unidades de coquización, equipos de hidrocrackeo).

En una forma de realización, la presente invención se puede usar para prevenir la precipitación y/o deposición de parafina y asfaltenos. La dispersión o disolución de los precipitados disminuye la concentración de contaminantes disponibles en el petróleo que pueden depositarse sobre o dentro del equipo de petróleo y gas. Por lo tanto, la presente

invención permite retrasar o eliminar completamente la necesidad del mantenimiento preventivo relacionado con la remoción de precipitados y depósitos, así como la necesidad de reemplazar o reparar partes del equipo.

En una forma de realización específica, la presente invención se puede usar para dispersar el precipitado de asfaltenos en operaciones de refinación. Las altas temperaturas y las condiciones de vacío conducen a la coquización, el ensuciamiento y la desactivación del catalizador durante el procesamiento o la mejora del petróleo crudo. Para reducir el gran gasto que representa, por ejemplo, cortar los haces de tuberías y/o intercambiadores donde se producen precipitaciones. Otras áreas preferenciales de precipitación de asfaltenos incluyen los intercambiadores de calor, hornos, torres de destilación, unidades de coquización, equipos de hidrocrackeo, etc.

En una forma de realización, la presente invención se puede usar para tratar petróleo pesado para mejorar una o más las características del petróleo. Por ejemplo, se puede aplicar la composición a las formaciones que contienen petróleo crudo pesado, reduciendo así la viscosidad del petróleo pesado. Ventajosamente, la presente invención puede reducir y/o eliminar la necesidad y los costos asociados con la inyección de vapor y otros métodos térmicos, químicos y mecánicos de extracción de petróleo pesado. Además también se reducen o eliminan la necesidad de diluyentes (por ejemplo, petróleo crudo ligero o refinado) y camisas de agua para ayudar a mover el crudo pesado a través de las líneas de conducción. Aún más, con la reducción de la viscosidad del petróleo pesado, el transporte de petróleo es menos complicado y/o menos costoso, ya que la necesidad de camiones cisterna y tanques de almacenamiento se reduce y se hace más factible el transporte mediante el uso de líneas de conducción.

Además, la composición se puede aplicar a una formación de petróleo que contiene concentraciones indeseables de sulfuro de hidrógeno. En una forma de realización, los métodos se pueden utilizar para suprimir o eliminar las bacterias reductoras de sulfato, lo que reduce la producción de sulfuro de hidrógeno y corrosión inducida por microbios (MIC, por sus siglas en inglés), y la conversión de petróleo agrio a petróleo dulce (o incluso conservar el petróleo dulce).

La composición se puede aplicar además en la dispersión de lodos parafínicos y acumulación de incrustaciones, sin necesidad de usar, por ejemplo, soluciones para la limpieza mecánica o solventes tóxicos en tanques de almacenamiento y transporte, buques tanques, barcos, camiones cisterna, líneas de conducción y líneas de flujo. Se proporcionan métodos de limpieza de tanques, que pueden ser efectivos para dispersar la acumulación de lodo y parafina en cuestión de días, por ejemplo, menos de una semana.

En una forma de realización, se proporcionan métodos de limpieza de un tanque de almacenamiento o transporte, en donde se inyecta en un tanque aire o metano a presión, seguido de una inyección de la presente composición a base de microbios. Además, el método puede comprender el bombeo de cualquier agua residual a una planta de tratamiento después del tratamiento con la presente composición. Preferentemente, el aire o el metano se inyectan en el tanque para permitir que se generen alrededor de 10 minutos de turbulencia.

Los métodos para remover las parafinas, asfaltenos y otros contaminantes, la dispersión de precipitados de asfaltenos y parafinas en el petróleo, y la reducción de la viscosidad y el sulfuro de hidrógeno en el petróleo y el gas, se pueden realizar juntos como un proceso combinado con la aplicación de las presentes composiciones en las superficies de los equipos de procesamiento de petróleo y/o en el petróleo los atraviesa. En otras palabras, el equipo se puede limpiar simultáneamente con el tratamiento de petróleo crudo.

El equipo de procesamiento de gas y petróleo que se puede limpiar y descontaminar de acuerdo con la presente invención incluye todos los tipos y variedades de equipos asociados con la recuperación, transmisión, transporte y procesamiento de gas y petróleo. Esto incluye, por ejemplo, las tuberías de revestimiento de pozos de gas y petróleo, bombas, varillas, tuberías, líneas, tanques y similares. Se contempla que la presente composición se puede usar con todos estos equipos.

En ciertas formas de realización, las composiciones utilizadas en los métodos de la presente invención contienen ingredientes en cantidades eficaces para limpiar el equipo y/o para proporcionar un tratamiento efectivo para inhibir la acumulación de sólidos. Existen múltiples formas en que el método para remover o prevenir la acumulación de contaminantes

en los pozos y equipos de gas y petróleo se puede implementar utilizando una composición de acuerdo con la presente invención.

Además de limpiar los pozos y los equipos asociados, a menudo es deseable introducir la composición, a través de perforaciones en la tubería de revestimiento, hacia la formación circundante. La composición puede forzarse hacia dentro de formación circundante mediante la aplicación de presión aplicada o, si la composición se deja asentar en el fondo de la tubería de revestimiento, la composición se puede filtrar dentro de la formación sin requerir de presión adicional. La composición permea la formación, disolviendo los bloqueos en ella para proporcionar una recuperación más eficiente de petróleo y gas.

En una forma de realización, un método para limpiar y mantener un pozo de trabajo, incluida la formación circundante, incluye los pasos de verter o inyectar la composición hacia abajo por el lado de la tubería de revestimiento (líneas traseras) de un pozo y permitir que se mezcle con el fluido que ya está en el pozo. Cuando está presente suficiente líquido, la composición puede luego opcionalmente hacerse circular mediante, por ejemplo, una bomba durante 24-72 horas, preferentemente 48-72 horas. Antes de la circulación, la composición puede dejarse reposar durante, por ejemplo, 8 a 24 horas. El tiempo de reposo, el tiempo de circulación y la dosis dependen de la cantidad de parafinas, asfaltenos, biopelículas, incrustaciones y/u otros contaminantes que se prevé que estén presentes, así como la profundidad y el tamaño del pozo. Una dosis inicial básica puede ser, pero no se limita a, 20 galones ($0,08 \text{ m}^3$) de composición y para mantener una estructura clara, al menos alrededor de 5 galones ($0,02 \text{ m}^3$) de composición por pozo en forma periódica, por ejemplo, quincenalmente, mensualmente, bimestralmente.

En formas de realización adicionales, la composición de la presente invención se puede aplicar directamente al equipo. Por ejemplo, antes de colocar varillas y tuberías de revestimiento en los pozos de gas y/o petróleo, estas piezas se pueden rociar o empapar con la composición. Las partes se pueden sumergir en tanques llenos con la composición para evitar la corrosión y la acumulación de contaminantes.

La composición se puede introducir por medio de bombas de inyección en pozos de gas o petróleo en alta mar para reducir los contaminantes, particularmente parafinas, en la

tubería de revestimiento y líneas de transmisión de los pozos. Además de los problemas asociados con los pozos de petróleo en tierra, los pozos en alta mar tienen el problema adicional de que el océano o agua de mar se comporta como un refrigerante de las líneas y contenidos ubicados entre el fondo del océano y la plataforma. Por lo tanto, los pozos en alta mar tienen un problema particular con la acumulación de parafinas. Para tratar las líneas, se puede aplicar, por ejemplo, desde 1-500 galones ($0,0004 \text{ m}^3$ - $1,893 \text{ m}^3$) hasta 1.000 barriles, 10.000 barriles o más, de la composición a la composición a una velocidad de inyección de, por ejemplo, 1 a 20 galones ($0,0004 \text{ m}^3$ - $0,0757 \text{ m}^3$) por minuto, o 1 a 20 barriles por minuto.

El presente tratamiento puede ser efectivo dentro de una gama de diferentes formaciones geológicas, como se muestra en la **FIG. 21**. Por ejemplo, el objeto de la invención puede ser útil en formaciones tan profundas como de 7.000 pies (2133.6 metros) o más profundas, y tan poco profundas como de 1.500 pies (457,2 metros) o menos profundas. Adicionalmente, la invención puede ser útil en las formaciones que tienen una rango de porosidad y/o permeabilidad, por ejemplo de alrededor de 0,1% a alrededor de 20% o más. La invención también puede ser útil en las formaciones que tienen una amplia gama de temperaturas, pH y salinidad.

Los productos en base a microbios utilizados en los métodos de la invención reivindicada pueden contener ingredientes en cantidades efectivas para limpiar los pozos, formaciones y equipos, para proporcionar un revestimiento efectivo en sus superficies para evitar la acumulación futura de contaminantes, incrustaciones y corrosión, y o para reducir la viscosidad del petróleo crudo a un nivel deseado.

El producto a base de microbios se puede aplicar con una composición que promueva la adherencia del producto a base de microbios a una superficie a tratar. La sustancia promotora de la adherencia puede ser un componente del producto a base de microbios o puede aplicarse simultáneamente o secuencialmente con el producto a base de microbios. Los promotores de adherencia pueden incluir partículas orgánicas o inorgánicas, iones como calcio, magnesio, fosfato y sodio, hierro, fuentes de carbono que se metabolizan a acetil coenzima A, acetil fosfato y acetato.

Se pueden añadir hasta, por ejemplo, 50 % en peso o más de aditivos, según sea necesario, para aplicaciones particulares, como variar los niveles de COV, aumentar la penetración de la mezcla, disminuir la viscosidad de la mezcla, como acopladores para solventes insolubles en la mezcla, y proporcionar solventes para suelos oleofílicos e hidrofílicos.

Los aditivos adecuados incluyen terpenos, alcoholes terpénicos, mezclas de ésteres de alcoholes C8-C14, glicoles, éteres glicólicos, ésteres ácidos, ésteres diácidos, hidrocarburos de petróleo, aminoácidos, alcanolaminas y aminas, preferentemente ésteres metílicos o isobutílicos de ésteres alifáticos dibásicos C4-C6 y n-metil-2 pirrolidona.

Los ejemplos de terpenos incluyen d-limoneno y alcoholes alfa y beta pineno y terpeno, incluido un terpineol. Las mezclas de ésteres de alcohol C8-C14 incluyen EXXATE 900, 1000, 1200 de Exxon Chemical; los glicoles incluyen propilenglicol, dipropilenglicol y tripropilenglicol; y los éteres glicólicos incluyen éter monometílico de dipropilenglicol, éter monometílico de propilenglicol, éter n-butílico de propilenglicol, éter monobutílico del etilenglicol y éter monobutílico del dietilenglicol. Los ésteres ácidos incluyen oleato de metilo y linoleato de metilo, y los ésteres diácidos incluyen diésteres de metilo o butilo de ácidos glutárico, adípico y succínico. Los hidrocarburos de petróleo incluyen AROMATIC 100, AROMATIC 150 ISOPAR M e ISOPAR K.

Las aminas, tales como la morfolina; 1,3-dimetil-2-imidazolidinona; 1,3-propanodiamina; 2-amino-1,3-propanodiol; y 3-amino propanol; así como las alcanolaminas tales como trietanolamina, dietanolamina, 2-aminometilpropanol y monoetanolamina actúan como dispersantes para contaminantes y solubilizan ácidos grasos y petróleos. Los aminoácidos proporcionan alternativas no tóxicas a la monoetanolamina y actúan como quelantes de metales. También son útiles los ésteres metílicos o isobutílicos de los ésteres dibásicos alifáticos C4-C6 y la n-metil-2 pirrolidona.

Se pueden usar otros aditivos que se usan típicamente en composiciones de limpieza, incluidos agentes suavizantes de agua, secuestrantes, inhibidores de la corrosión y antioxidantes, los que se añaden en cantidades efectivas para realizar su función prevista. Estos aditivos y cantidades de los mismos están dentro de la experiencia de la técnica. Los

agentes suavizantes de agua adecuados incluyen fosfatos lineales, copolímeros de estireno-ácido maleico y poliacrilatos. Los secuestrantes adecuados incluyen 1,3-dimetil-2-imidazolidinona; 1-fenil-3-isoheptil-1,3-propanodiona; y 2-hidroxi-5-nonilacetofenonoxima. Los ejemplos de inhibidores de la corrosión incluyen 2-aminometilpropanol, benzotriazol de dietiletanolamina y benzotriazol de metilo. Los antioxidantes adecuados para la presente invención incluyen (BHT) 2,6-di-terc-butil-para-cresol, (BHA) 2,6-di-terc-butil-para-anisol, inhibidor de Eastman OA BM-oxalil bis (bencilidenohidracida)), y Eastman DTBMA 2,5-di-terc-butilhidroquinona.

Todos los aditivos deben tener un punto de inflamación mayor que 100 °F (37,8 °C), preferentemente mayor que 150 °F (65,6 °C) y más preferentemente de 195 °F (90,6 °C) TCC para lograr un punto de inflamación final del producto mayor que 200 °F (93,3 °C).

Uso de productos a base de microbios en biorremediación

En una forma de realización, las composiciones y los métodos de la presente invención se pueden usar para la biorremediación de suelos, superficies, aguas u otros sitios contaminados con hidrocarburos.

Las formas de realización de la presente invención comprenden métodos de biorremediación *in situ* y *ex situ* de sólidos, suelos y aguas contaminados (suelo y superficie) en los que las técnicas *in situ* se definen como aquellas que se aplican, por ejemplo, al suelo y el agua subterránea en el sitio causando una perturbación mínima. Las técnicas *ex situ* son aquellas que se aplican, por ejemplo, al suelo y el agua subterránea que se han removido del sitio mediante, por ejemplo, excavación (suelo) o bombeo (agua).

Las técnicas *in situ* son generalmente las opciones más deseables debido a que representan un menor costo y menos alteraciones al medio ambiente. El tratamiento *in situ* puede estar limitado, por ejemplo, por la profundidad del suelo que puede ser efectivamente tratado. En muchos suelos, la difusión efectiva de oxígeno para obtener tasas deseables de biorremediación se extiende a un rango que va desde unos pocos centímetros a alrededor de 30 cm dentro del suelo.

En algunas formas de realización de la presente invención, una técnica *in situ* involucra extender mecánicamente una composición de remediación de la presente invención sobre la superficie contaminada. Esto se puede realizar utilizando un esparcidor estándar o un dispositivo rociador. En algunas formas de realización, una única etapa de extensión puede completar el proceso de aplicación, en el que todos los componentes están incluidos en una única formulación. En otras formas de realización, que usan formulaciones de dos o múltiples partes, se pueden usar múltiples etapas de extensión. En una forma de realización, la composición de biorremediación puede ser frotada, cepillada o trabajada sobre la superficie o el suelo que se desea limpiar usando una acción mecánica para trabajar la composición de biorremediación dentro de los poros o granos de la superficie y/o para extender la composición de biorremediación alrededor de la zona contaminada. En otras formas de realización adicionales, la aplicación de una composición de remediación cuando se aplica a superficies sólidas puede ser seguida por la aplicación de un líquido, como el agua. El agua se puede aplicar como un rocío, utilizando métodos estándar conocidos por los expertos en la materia. También se pueden usar otros agentes humectantes líquidos y formulaciones humectantes.

Otros ejemplos de técnicas *in situ* que se pueden utilizar en algunas formas de realización de la presente invención incluyen la bioventilación, la biodegradación, el bioburbujeo y la bioaumentación. La bioventilación implica suministrar aire y nutrientes a través de pozos a un sitio de contaminación. En algunas formas de realización de la presente invención, se puede usar aire a presión como gas portador neumático para transportar una composición de remediación a base de microbios de la presente invención a zonas de contaminación subsuperficiales, tales como suministros de agua y acuíferos.

La biodegradación *in situ* puede implicar además el suministro de oxígeno y nutrientes mediante la circulación de soluciones acuosas a través de los suelos contaminados para estimular a las bacterias naturalmente presentes a degradar los contaminantes. Algunas formas de realización de la presente invención incluyen la infiltración de nutrientes que contienen agua y oxígeno u otros aceptores de electrones para el tratamiento de aguas subterráneas, después de la aplicación de la composición de biorremediación sólida o líquida de la presente invención.

El bioburbujeo *in situ* normalmente involucra la inyección de aire a presión debajo del nivel freático para aumentar las concentraciones de oxígeno en el agua subterránea y aumentar la tasa de degradación biológica de los contaminantes por la acción de los microbios de la presente invención o las bacterias naturales. La bioestimulación aumenta la mezcla en la zona saturada y por lo tanto aumenta el contacto entre el suelo y las aguas subterráneas. La facilidad y el bajo costo de instalar puntos de inyección de aire de pequeño diámetro permiten una considerable flexibilidad en el diseño y la construcción del sistema. En algunas formas de realización de la presente invención, el aire a presión de un proceso de bioestimulación puede actuar como un gas portador para transportar neumáticamente una composición de remediación en polvo y/o líquida de la presente invención a una fuente de agua subsuperficial, por ejemplo un acuífero.

Las técnicas *ex situ* normalmente involucran la excavación o remoción del suelo contaminado desde la tierra. Los ejemplos de técnicas de biorremediación *ex situ* que se pueden usar en algunas formas de realización de la presente invención incluyen la biolabranza, compostaje, biopilas y biorreactores.

La biolabranza *ex situ* es una técnica en la que el suelo contaminado se excava y se extiende sobre un lecho preparado y se labra periódicamente hasta que los contaminantes se degradan. Además de aplicar una composición de la presente invención, este método se puede usar para estimular microorganismos biodegradantes nativos y facilitar su degradación aeróbica de contaminantes. En general, la práctica se limita al tratamiento de 10-35 cm superficiales de suelo. En algunas formas de realización de la presente invención, las composiciones de remediación de la presente invención se pueden aplicar a los lechos preparados, en al menos una aplicación, seguido de labranza periódica. La composición puede suplementar los microorganismos nativos, lo que podría resultar en una remediación más rápida y completa de los contaminantes.

El compostaje *ex situ* es una técnica que consiste en combinar el suelo contaminado con enmiendas orgánicas no peligrosas, como estiércol o desechos agrícolas. La presencia de estos materiales orgánicos sirve de apoyo al crecimiento de una rica población microbiana y una elevada temperatura características del compostaje. De manera similar al ejemplo de biolabranza descrito anteriormente, en algunas formas de realización de la presente

invención, las composiciones de la presente invención se pueden combinar con métodos de compostaje para crear una biorremediación más efectiva y más rápida de los sitios contaminados.

Las biopilas *ex situ* son un híbrido de la biolabranza y el compostaje. Esencialmente, las celdas diseñadas se construyen como pilas compostadas aireadas. Que se usan normalmente para el tratamiento de la contaminación de superficie producida por hidrocarburos de petróleo, las biopilas son una versión refinada de la biolabranza que puede controlar la pérdida física de contaminantes mediante lixiviación y volatilización. Las biopilas proporcionan un ambiente favorable para los microorganismos nativos aerobios y anaerobios. La presente invención es adecuada para suplementar y mejorar la biorremediación de contaminantes utilizando biopilas.

Los biorreactores, incluyendo los reactores con suspensión de sólidos o los reactores acuosos, se utilizan para el tratamiento *ex situ* del suelo contaminado y el agua bombeada desde una pluma contaminada. La biorremediación en reactores implica el procesamiento de material sólido (suelo, sedimento, lodo) o agua contaminados, a través de un sistema de contención diseñado para tal fin. Un biorreactor con suspensión de sólidos se puede definir como un recipiente de contención y un aparato utilizado para crear una condición de mezcla de tres fases (sólido, líquido y gas) para aumentar la tasa de biorremediación de los contaminantes unidos al suelo y solubles en agua en forma de una suspensión acuosa del suelo contaminado y la biomasa (generalmente microorganismos nativos) capaz de degradar los contaminantes objetivo. En general, la tasa y el alcance de la biodegradación son mayores en un sistema de biorreactor que en sistemas *in situ* o en fase sólida porque el ambiente contenido es más manejable y, por lo tanto, más controlable y predecible. En algunas formas de realización de la presente invención, las composiciones actualmente descritas se usan para aumentar la eficacia y las velocidades de reacción de las reacciones de descomposición de contaminantes en biorreactores.

En una forma de realización, la composición microbiana de la presente invención se dispersa en un suelo contaminado con petróleo mientras se soporta sobre un portador. El portador puede estar hecho de materiales capaces de retener levemente los microorganismos sobre ellos y, por lo tanto, sean capaces de liberar fácilmente los microorganismos que han

proliferado de esta manera. El portador es preferentemente barato y puede actuar como una fuente de nutrientes para los microorganismos así aplicados, particularmente una fuente de nutrientes que puede liberarse de forma gradual. Los materiales de soporte biodegradables preferidos incluyen cáscara de maíz, desechos de la industria azucarera o cualquier desecho agrícola. El contenido de agua del portador varía normalmente de 1% a 99% en peso, preferentemente de 5% a 90% en peso, más preferentemente de 10% a 85% en peso. Cuando el contenido de agua del portador es demasiado bajo, la supervivencia de los microorganismos es difícil. Por otra parte, cuando el contenido de agua del portador es demasiado alto, el portador resultante exhibe una resistencia física deteriorada que lo hace difícil de manejar.

También se pueden agregar sustancias que mejoran el crecimiento de los microorganismos y la producción de biotensioactivos al producto a base de microbios y/o al sitio de tratamiento. Estas sustancias incluyen, pero no se limitan a, aceite, glicerol, azúcar u otros nutrientes. Por ejemplo, se puede agregar un sustrato de carbono que soporta el crecimiento de los microorganismos productores de biotensioactivos a la composición o las áreas objetivo. Los organismos productores de biotensioactivos pueden crecer sobre el sustrato para producir biotensioactivos *in situ* y controlar los nematodos.

Los sustratos de carbono pueden incluir, pero no se limitan a, fuentes de carbono orgánico, como aceite natural o sintético, incluidos los que se utilizan como aceites para freír; grasas; lípidos; ceras (natural o parafina); ácidos grasos tales como láuricos; mirístico, etc; alcohol de ácido graso tal como alcohol laurílico; ésteres anfifílicos de ácidos grasos con glicerol tal como gliceril monolaurato; ésteres de glicol de ácidos grasos tales como monoestearato de polietileno; aminas de ácidos grasos tales como lauril amina; amidas de ácidos grasos; hexanos; glicerol; glucosa; etc. Para fomentar la producción de los biotensioactivos, es preferible utilizar un sustrato de carbono insoluble en agua.

Aunque no es necesario, puede ser preferible añadir o enmendar el sustrato de carbono con una cantidad suficiente de biotensioactivo específico para iniciar el proceso de emulsificación e inhibir o reducir el crecimiento de otros organismos competidores del organismo productor de biotensioactivo.

En una forma de realización, la composición comprende un biotensioactivo. La composición contiene preferentemente los componentes activos, tales como el biotensioactivo, a una concentración de 0,01 a 90% en peso (% en peso), preferentemente 0,1 a 50% en peso, y más preferentemente 0,1 a 20% en peso.

En otra forma de realización, la composición comprende una mezcla de biotensioactivos que comprenden SLP y MEL. La composición contiene preferentemente los componentes activos, la mezcla de SLP y MEL, a una concentración de 0,01 a 90% en peso, preferentemente 0,1 a 50% en peso, y más preferentemente 0,1 a 20% en peso. La mezcla de biotensioactivos también puede comprender otros biotensioactivos glicolípidos, como el RLP, así como lipopéptidos, como la surfactina.

Ventajosamente, los biotensioactivos naturales pueden inhibir el crecimiento de organismos competidores y mejorar el crecimiento de los organismos específicos productores de biotensioactivos.

Producción local de productos a base de microbios

En ciertas formas de realización de la presente invención, una instalación para el crecimiento de microbios produce microorganismos frescos de alta densidad y/o subproductos de crecimiento microbiano de interés a una escala deseada. La instalación para el crecimiento de microbios puede estar ubicada en o cerca del sitio de aplicación. La instalación produce composiciones a base de microbios de alta densidad en cultivo por lotes, casi continuo o continuo.

Las instalaciones para el crecimiento de microbios de la presente invención pueden ubicarse en el lugar donde se utilizará el producto a base de microbios (por ejemplo, una instalación de recuperación de petróleo, perforación, minería, tratamiento de desechos, parque, remediación o instalación de acuicultura). Por ejemplo, la instalación para el crecimiento de microbios puede estar a menos de 300, 250, 200, 150, 100, 75, 50, 25, 15, 10, 5, 3 o 1 milla (482,803; 402,336; 321,869; 241,402; 160,934; 120,701; 80,467; 40,233; 24,140; 16,093; 8,047; 4,8280; 1,609 kilómetros) de la ubicación de uso.

Debido a que el producto a base de microbios se puede generar de forma local, sin recurrir a los procesos de estabilización, conservación, almacenamiento y transporte de microorganismos de la producción microbiana convencional, se puede generar una densidad mucho mayor de microbios vivos, esporas, micelios, conidios u otros propágulos microbianos, lo que requiere un volumen menor del producto a base de microbios para su uso en la aplicación en el sitio o que permita aplicaciones microbianas de densidad mucho más alta donde sea necesario para lograr la eficacia deseada. Esto permite tener un biorreactor de menor escala (por ejemplo, un tanque de fermentación más pequeño, menores suministros de material de partida, nutrientes, agentes de control de pH y agentes antiespumantes) que hacen que el sistema sea eficiente. La generación local del producto a base de microbios también facilita la inclusión del caldo de crecimiento en el producto. El caldo puede contener agentes producidos durante la fermentación que son particularmente adecuados para el uso local.

Los cultivos robustos de microbios de alta densidad producidos localmente son más efectivos en el campo que los que han experimentado la estabilización de sus células vegetativas, han esporulado o han permanecido en la cadena de suministro durante algún tiempo. Los productos a base de microbios de la presente invención son particularmente ventajosos en comparación con los productos tradicionales en los que células, esporas, micelios, conidios y/u otros propágulos microbianos se han separado de los metabolitos y nutrientes presentes en los medios de crecimiento de fermentación. Los tiempos de transporte reducidos permiten la producción y entrega de lotes frescos de microbios y/o sus metabolitos en el momento y el volumen que requiera la demanda local.

Las instalaciones de crecimiento microbiano de la presente invención producen composiciones frescas a base de microbios, que comprenden los propios microbios, los metabolitos microbianos y/u otros componentes del caldo en el que se cultivan los microbios. Si se desea, las composiciones pueden tener una alta densidad de células vegetativas o una mezcla de células vegetativas, esporas reproductivas, conidios, micelios y/u otros propágulos microbianos. Ventajosamente, las composiciones se pueden adaptar para su uso en una ubicación específica. En una forma de realización, la instalación de crecimiento de microbios está ubicada en o cerca de un sitio en donde se utilizarán los productos a base de microbios.

Ventajosamente, estas instalaciones de crecimiento de microbios brindan una solución al problema actual de depender de productores con vastas instalaciones de tamaño industrial cuya calidad del producto sufre debido a retrasos en el procesamiento aguas arriba, cuellos de botella en la cadena de suministro, almacenamiento inadecuado y otras contingencias que impiden la entrega y aplicación oportunas de, por ejemplo, un producto viable, con alto contenido de células y/o propágulos, y el caldo y los metabolitos asociados en los que se cultivan originalmente los microbios.

Ventajosamente, en formas de realización preferidas, los sistemas de la presente invención aprovechan el poder de los microorganismos locales naturales y sus subproductos metabólicos para mejorar la producción, transmisión y/o refinación del petróleo.

El tiempo de cultivo para los recipientes individuales puede ser, por ejemplo, de 1 a 7 días o más. El producto de cultivo puede ser recolectado de varias maneras diferentes.

Ya que el producto a base de microbios se genera en el sitio o cerca del sitio de aplicación, sin la necesidad de estabilizarlo, conservarlo, someterlo a un almacenamiento prolongado y a los procesos de transporte extensivos de la producción convencional, se puede generar una densidad mucho mayor de microorganismos vivos, lo que hace que se requiera un volumen mucho más pequeño del producto a base de microbios para su uso en una aplicación en el sitio. Esto permite tener un biorreactor de menor escala (por ejemplo, un tanque de fermentación más pequeño; menores suministros de materiales de partida, nutrientes, agentes de control de pH y agentes antiespumantes, etc.); no hay razón para estabilizar las células o separarlas de su caldo de cultivo; y se facilita la portabilidad del producto.

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

La producción local y la entrega dentro de, por ejemplo, 24 horas de fermentación dan como resultado composiciones puras de alta densidad celular y costos de envío sustancialmente más bajos. Dadas las perspectivas de un rápido avance en el crecimiento de

inoculantes microbianos más efectivos y potentes, los consumidores se beneficiarán enormemente de esta capacidad de entregar rápidamente los productos a base de en microbios.

Los microbios locales pueden identificarse según, por ejemplo, su tolerancia a la sal, la capacidad de crecer a altas temperaturas y el uso de la identificación genética de las secuencias descritas en el presente documento.

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

Otras definiciones

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

A menos que se indique específicamente o sea obvio en el contexto, el término “o”, como se usa en el presente documento, se entiende que es inclusivo. A menos que se indique específicamente o sea obvio en el contexto, los términos “a”, “y” y “el”, “la”, como se usan en el presente documento, se entienden como singular o plural.

A menos que se indique específicamente o sea obvio en el contexto, el término “alrededor de”, como se usa en el presente documento, se entiende dentro de un rango de tolerancia normal en la técnica, por ejemplo, dentro de 2 desviaciones estándar de la media. Alrededor de se puede entender dentro del 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05% o 0,01% del valor establecido. Todos los valores numéricos

proporcionados en este documento están modificados por el término alrededor de, a menos que el contexto indique lo contrario.

La mención en las reivindicaciones de una lista de grupos químicos en cualquier definición de una variable en este documento incluye las definiciones de esa variable como un solo grupo cualquiera o como una combinación de los grupos listados. La mención en las reivindicaciones de una forma de realización para una variable o aspecto en este documento incluye esa forma realización como una sola forma de realización cualquiera o en combinación con cualquier otra forma de realización o parte de la misma.

Todas las referencias aquí citadas se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1 - LICUEFACCIÓN DE ASFALTENOS PRECIPITADO USANDO STAR 3+

El asfalteno completamente precipitado y endurecido de una refinería de petróleo se licuó utilizando el tratamiento con Star 3+ de la presente invención. Como se muestra en las **Figs. 1-6**, se compararon las concentraciones de Star 3+ (500 ml), 4g/L de SLP purificado y líquido iónico con respecto a la capacidad de licuar 100 g de precipitado de asfaltenos en matraces sobre agitadores oscilantes. Como se muestra en la **FIG. 7**, la efectividad del tratamiento con Star 3 también se comparó con la de Star 3+.

Como se muestra en la **FIG. 8**, los matraces se sometieron a 5 horas de agitación, después de lo cual se determinaron las cantidades de precipitado de asfaltenos.

EJEMPLO 2: EJEMPLO DE PROTOCOLO PARA LA FERMENTACIÓN DE LEVADURAS BIOEMULSIONANTES

Se usó un medio nutriente que comprende dos fuentes de carbono para cultivar levaduras, por ejemplo, de los clados *Wickerhamomyces*, *Pichia* y/o *Starmerella*. La primera fuente de carbono fue un azúcar, como la dextrosa o la glucosa, en una concentración de 20 a 50 g/L. La segunda fuente de carbono era una fuente de carbono hidrófoba, como canola purificada o el aceite vegetal, a una concentración de 50 a 100 g/L.

También se agregó una fuente de nitrógeno como urea o sales de amonio, así como fuentes de magnesio, fosfato y potasio.

La fermentación se desarrolló durante 1 a 5 días. La concentración final de levaduras que se puede lograr es de alrededor de 0,5 mil millones a 2,5 mil millones de UFC/mL.

EJEMPLO 3 - FERMENTACIÓN DE *STARMERELLA BOMBICOLA* PARA LA PRODUCCIÓN DE SOFOROLÍPIDOS (SLP) EN UN REACTOR DE 110 L

Se utiliza un reactor portátil, tipo *airlift*, totalmente cerrado, operado por PLC con filtración de agua, unidad de control de temperatura y un soplador de aire incorporado. El reactor tiene un volumen de trabajo de 90 L durante el cultivo de *S. bombicola* para producir SLP.

En formas de realización preferidas, los nutrientes para la producción de SLP son glucosa, urea, extracto de levadura, aceite de canola, sulfato de magnesio y fosfato de potasio.

El reactor se inocula con 8 litros de cultivo líquido desarrollado en matraces. La duración del ciclo de cultivo para la producción de SLP es de 7-8 días, a 25 °C y pH 3,5, realizando muestreos dos veces al día.

La concentración final de SLP es alrededor del 10% del volumen de trabajo, en este caso alrededor de 9 L de producto, que contienen 300-400 gramos de SLP por litro.

EJEMPLO 4 - FERMENTACIÓN DE *WICKERHAMOMYCES ANOMALUS* PARA LA PRODUCCIÓN DE SLP EN UN REACTOR DE 450 L

Se utiliza un reactor *airlift* móvil operado por PLC con filtración de agua, unidad de control de temperatura y soplador de aire para obtener una aireación suficiente. El proceso puede llevarse a cabo como proceso de cultivo por lotes. El reactor tiene un volumen de trabajo de 400 L cuando se cultivan *Wickerhamomyces* o *Pichia* para la producción de SLP.

En formas de realización preferidas, los nutrientes para la producción de SLP son glucosa, urea, extracto de levadura, aceite de canola, sulfato de magnesio y fosfato de potasio.

La inoculación de este reactor requiere hasta un 5% de cultivo semilla líquido de volumen de trabajo. La duración del ciclo de cultivo es de 7 días, a una temperatura de 25 °C y pH 3,5, con muestreo realizado dos veces al día.

La concentración final de SLP es alrededor del 20-25% del volumen de trabajo, en este caso más de 90 L de formas de producto.

EJEMPLO 5 - FERMENTACIÓN DE *WICKERHAMOMYCES ANOMALUS* PARA LA PRODUCCIÓN DE CÉLULAS Y PROTEÍNAS UNICELULARES EN UN REACTOR DE 900 L

Se utiliza un reactor portátil dividido en dos tanques operado con un *airlift* central para ayudar a mezclar los dos tanques simultáneamente. El reactor tiene un volumen de trabajo de 600L cuando se cultivan *Wickerhamomyces* y/o *Pichia* para la producción celular.

En una forma de realización preferida, los nutrientes para la producción celular son glucosa o azúcar de cocción, urea, extracto de levadura, sulfato de magnesio y fosfato de potasio.

El reactor se inocula con 2% de cultivo siembra. La fermentación continúa durante 48-72 horas sin estabilización del pH y una temperatura de 26 a 32 °C.

La concentración final de células será de 100 g de peso húmedo por litro. La concentración de biomasa húmeda puede alcanzar los 90 kilos por ciclo con una concentración de proteínas de hasta 45 kilos.

EJEMPLO 6 - FERMENTACIÓN DE *WICKERHAMOMYCES ANOMALUS* PARA LA PRODUCCIÓN DE CÉLULAS Y PROTEÍNAS UNICELULARES EN UN REACTOR DE 2000 L

Se utiliza un reactor portátil dividido en dos tanques cuadrados acompañados de 2 bucles para el intercambio de masa entre ellos. El reactor tiene un volumen de trabajo de 750L cuando se cultiva *W. anomalus* para la producción celular.

En una forma de realización preferida, los nutrientes para la producción celular son glucosa o azúcar de cocción, urea, extracto de levadura, sulfato de magnesio y fosfato de potasio.

El reactor se inocula con 2% de cultivo siembra. La fermentación continúa durante 48-72 horas sin estabilización del pH y una temperatura de 26 a 32 °C.

La concentración final de células será de 100 g de peso húmedo por litro. La concentración de biomasa húmeda puede alcanzar los 200 kilos por ciclo con una concentración de proteínas de hasta 100 kilos.

EJEMPLO 7 - FERMENTACIÓN DE *STARMERELLA BOMBICOLA* PARA LA PRODUCCIÓN DE SLP EN UN REACTOR PORTÁTIL DE 14 L

Este reactor es un recipiente de vidrio con camisa autoclavable con purgador de aire e impulsor. Está equipado con sensor de oxígeno disuelto, pH, temperatura y espuma; tiene una estación de control integrada con una interfaz de pantalla táctil a color, bombas incorporadas, controladores de flujo de gas y controladores de nivel de espuma pH/OD. El volumen de trabajo del reactor es de 10 litros.

El medio nutriente contiene glucosa, extracto de levadura, urea y aceite vegetal. El inóculo puede ser una cultivo de 1 a 2 días de *S. bombicola* en alrededor del 5-10% del volumen total del cultivo. La duración del cultivo y la recolección de productos de preparación continua continúan durante 5 a 14 días. La producción final de SLP puede alcanzar 1-2 kilogramos por ciclo.

EJEMPLO 8 - FERMENTACIÓN DE *PSEUDOSZYMA APHIDIS* PARA LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS DE MANOSILERITRITOL (MEL) EN UN REACTOR PORTÁTIL DE 14 L

Este reactor es un recipiente de vidrio con camisa autoclavable a vapor con purgador de aire y un impulsor Rushton. Está equipado con sensor de OD, pH, temperatura y espuma. Cuenta con una estación de control integrada con una interfaz de pantalla táctil a color,

bombas incorporadas, controladores de flujo de gas y controladores de nivel de espuma pH/OD. El volumen de trabajo del reactor es de 10 litros.

Composición del medio nutriente: nitrato de sodio, fosfato de potasio, sulfato de magnesio, extracto de levadura y aceite vegetal. El inóculo puede ser un cultivo de 1 a 2 días de *Pseudozyma aphidis*, en alrededor del 5-10% del volumen total del cultivo. La duración del cultivo y la recolección de la muestra ocurren a los 9-15 días. La producción final de MEL puede alcanzar los 800-1.000 gramos.