

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201991850** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2019.12.30

(51) Int. Cl. *C10G 32/00* (2006.01)  
*C12N 1/14* (2006.01)  
*C12N 1/16* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.02.07

---

(54) **МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ВЯЗКОСТИ НЕФТИ**

---

(31) 62/455,903; 62/464,046; 62/551,352;  
62/565,295; 62/579,471

(32) 2017.02.07; 2017.02.27; 2017.08.29;  
2017.09.29; 2017.10.31

(33) US

(86) PCT/US2018/017205

(87) WO 2018/148265 2018.08.16

(88) 2019.04.04

(71) Заявитель:  
ЛОКУС ОЙЛ АЙПИ КОМПАНИ,  
ЛЛК (US)

(72) Изобретатель:  
Фармер Шон, Алибек Кен, Мазумдер  
Шармиста, Адамс Кент, Диксон  
Тайлер, Чен Яцзе, Каратур Картик Н.,  
Кэллоу Николас, Отт Блейк, Неррис  
Энтони (US)

(74) Представитель:  
Тагбергенова М.М., Тагбергенова А.Т.  
(KZ)

(57) В настоящем изобретении предложены экологически чистые композиции и способы снижения вязкости сырой нефти с использованием микроорганизмов и/или био-ПАВ, продуцируемых микроорганизмами.

**A1**

**201991850**

**201991850**

**A1**

## МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ВЯЗКОСТИ НЕФТИ

### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

5        Данная заявка испрашивает приоритет следующих предварительных заявок США: № 62455903, поданной 7 февраля 2017 г.; № 62464046, поданной 27 февраля 2017 г.; № 62551352, поданной 29 августа 2017 г.; № 62565295, поданной 29 сентября 2017 г.; и № 62579471, поданной 31 октября 2017 г., каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

10        Высокий спрос на ископаемое топливо требует эффективной добычи нефти. Ряд проблем при добыче нефти связан с вязкостью, поверхностным натяжением, гидрофобностью и плотностью сырой нефти.

15        Некоторые виды сырой нефти имеют более высокую вязкость, чем другие. Тяжелая и сверхтяжелая сырая нефть являются высоковязкими с плотностью, близкой или даже превышающей плотность воды. Тяжелая нефть - это сырая нефть с плотностью по API менее 20° или вязкостью выше 200 сП. Сверхтяжелая нефть относится к нефти с плотностью по API менее 12° и вязкостью выше 10000 сП («Тяжелая нефть», 2016 г.). Сверхтяжелая сырая нефть может быть тяжелее воды и, следовательно, может опускаться на дно водоносного пласта, вызывая подземное загрязнение.

20        С другой стороны, «легкая» сырая нефть или та, которая имеет низкую плотность, и которая свободно течет при комнатной температуре, имеет низкую вязкость и высокую плотность по API благодаря более высокой доле легких углеводородных фракций. Сырая нефть с низкой вязкостью со временем может превращаться в более вязкие жидкости.

25        Тяжелая и сверхтяжелая сырая нефть являются основным потенциальным энергетическим ресурсом. Сорок процентов мировых запасов нефти составляют тяжелая и сверхтяжелая нефть, на которую приходится 3,6-5,2 триллиона баррелей нефти. Таким образом, добыча этих высоковязких углеводородов может иметь большое экономическое значение. Однако большая часть тяжелой и сверхтяжелой нефти, асфальта, гудрона и/или битумов имеют высокую вязкость и, следовательно, обременительны при транспортировке с использованием 30 традиционных способов, таких как переносные резервуары для хранения и автоцистерны. Для прокачки нефти с более высокой вязкостью по трубопроводам до нефтеперерабатывающих заводов и перерабатывающих установок требуется значительное количество энергии.

35        Тяжелую нефть также трудно добывать из-за ее вязкости, гидрофобности и несмешиваемости с водой. Вязкость, в частности, влияет на скорость, с которой можно перекачивать сырую нефть из пласта, а более вязкая нефть способствует снижению общей производительности нефтяного месторождения.

Свойства сырой нефти также способствуют трудностям с ремедиацией окружающей среды после, например, разлива нефти на поверхность воды. Высокое межфазное натяжение заставляет нефть плавать на воде и прилипать к растениям, животным и почве. Когда ароматические составляющие нефти испаряются, более тяжелые остатки могут тонуть, вызывая тем самым загрязнение подземных вод. Современная обработка пролитой нефти на поверхностях воды основывается на длительных и дорогостоящих способах разложения нефти.

Одним из способов поддержания текучести тяжелых углеводородов является поддержание их при повышенных температурах. Другим известным методом является смешивание тяжелой нефти с более легким углеводородным разбавителем. Это помогает создать возможность, например, для транспортировки нефти по трубопроводу. Тем не менее, разбавители могут быть дорогими в получении и транспортировке на нефтяные месторождения.

ПАВ также широко используются в нефтяной промышленности для улучшения ряда отрицательных физических свойств сырой нефти. Молекулы ПАВ состоят из гидрофобной и гидрофильной частей. Их амфифильная природа позволяет им адсорбироваться на границе раздела масло/вода, образуя мицеллы, которые снижают межфазное натяжение между маслом и водой. Однако использование химических веществ при добыче нефти может привести к расходам на безопасность и окружающую среду, а также на производство и/или получение указанных химических веществ.

Эффективная добыча нефти и газа имеет решающее значение для удовлетворения высокого спроса на такие продукты. Из-за важности безопасной и эффективной добычи нефти и газа, трудности добычи и транспортировки тяжелой нефти и неиспользованный потенциал превращения тяжелой нефти в полезные продукты, существует постоянная потребность в способах улучшения физических свойств тяжелой нефти, в частности путем снижения ее вязкости.

#### КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение обеспечивает экологически чистые, экономически эффективные материалы и способы для повышения добычи и улучшения транспортировки нефти. В конкретных вариантах осуществления в заявленном изобретении предложены композиции на основе микроорганизмов и способы снижения вязкости тяжелой сырой нефти.

В одном варианте осуществления в заявленном изобретении предложены микроорганизмы, а также побочные продукты их жизнедеятельности, такие как био-ПАВ, растворители и/или ферменты. В заявленном изобретении также предложены способы использования этих микроорганизмов и побочных продуктов их жизнедеятельности.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены материалы и способы для улучшения добычи нефти путем обработки нефтесодержащих

участков композицией на основе микроорганизмов, способной снижать вязкость нефти. Преимущественно заявленные композиции и способы могут быть использованы для улучшения вязкости и/или улучшения добычи тяжелой сырой нефти в «зрелых» или даже «заглохших» нефтяных пластах. Кроме того, в предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения может использоваться без увеличения общего кислотного числа (ТАН) сырой нефти.

5 В предпочтительных вариантах осуществления композиция на основе микроорганизмов по настоящему изобретению содержит культурные микроорганизмы и/или их побочные продукты. В одном варианте осуществления микроорганизм, используемый в композициях по настоящему изобретению, представляет собой продуцирующую био-ПАВ бактерию или дрожжи, или их комбинацию.

В одном варианте осуществления микроорганизм представляет собой «дрожжи-киллеры», продуцирующие био-ПАВ и/или фермент, такие как, например, *Pichia guilliermondii* и/или *Pichia anomala* (*Wickerhamomyces anomalus*).

15 В другом варианте осуществления микроорганизм представляет собой дрожжи, выбранные из одного или нескольких штаммов дрожжей клады *Starmerella*, которые могут быть эффективными продуцентами софоролипидов, и/или одного или нескольких штаммов дрожжей *Pseudozyma*, которые могут быть эффективными продуцентами липидов маннозилеритрита.

20 В еще одном варианте осуществления микроорганизм представляет собой один или несколько штаммов *Bacillus subtilis*, таких как, например, штаммов *B. subtilis* var. *locuses* В1 и В2, которые являются эффективными продуцентами сурфактина.

В одном варианте осуществления композиция на основе микроорганизмов может дополнительно содержать источники питательных веществ, включая азот, нитрат, фосфор, магний и/или углерод.

В одном варианте осуществления композиция на основе микроорганизмов содержит культуру, которая была выдержана в течение 24 часов или дольше. Выдержанная культура - это культура, которой давали возможность отдохнуть в течение некоторого времени после первоначального роста и продуцирования метаболита.

30 В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению имеют преимущества перед, например, одними био-ПАВ, включая одно или несколько из следующих: высокие концентрации маннопротеина как части внешней поверхности клеточной стенки дрожжей; присутствие бета-глюкана в клеточных стенках дрожжей; наличие био-ПАВ в культуре и присутствие растворителей и других метаболитов (например, молочной кислоты, этанола, этилацетата и т. д.).

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу улучшения добычи нефти путем применения к тяжелой нефти или к участку добычи нефти,

содержащему тяжелую нефть, композиции на основе микроорганизмов, содержащей один или несколько штаммов микроорганизмов, продуцирующих био-ПАВ и/или продуцирующих ферменты. Композиция на основе микроорганизмов может снижать вязкость нефти; таким образом, способ улучшает способность извлекать и/или транспортировать нефть. Способ 5 необязательно включает добавление питательных веществ и/или других агентов на участок для того, чтобы, например, способствовать росту микроорганизмов.

Способ также может включать применение композиции на основе микроорганизмов, например, с одним или несколькими щелочными соединениями, одним или несколькими полимерными соединениями и/или одним или несколькими ПАВ.

10 В одном варианте осуществления способ дополнительно включает стадию кавитации тяжелой нефти либо непосредственно перед, одновременно и/или через некоторое время после применения композиции на основе микроорганизмов к участку добычи тяжелой нефти или нефти. Кавитация может быть проведена с использованием оборудования, известного в данной области техники, и может включать, например, гидродинамические или ультразвуковые 15 способы.

Стадию кавитации можно применять к тяжелой сырой нефти в любой момент во время цепочки операций по добыче и транспортировке нефти, например, после добычи из скважины и до помещения в сборный резервуар для хранения; во время хранения; после хранения и перед транспортировкой в танкере или трубопроводе; во время транспортировки и до процесса 20 переработки.

Заявленные способы, включая необязательную стадию кавитации, также могут быть использованы для добычи нефти из нефтеносных песков. Композицию на основе микроорганизмов можно применять к нефтеносным пескам, повышая смачиваемость песков и позволяя отделить нефть от песков.

25 В одном варианте осуществления, если нефть, извлеченная из нефтеносных песков, представляет собой тяжелую нефть, способ, включающий необязательную стадию кавитации, может быть снова применен к тяжелой нефти для уменьшения вязкости нефти.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложены способы производства био-ПАВ путем культивирования штамма микроорганизма согласно настоящему 30 изобретению в условиях, подходящих для роста и продуцирования ПАВ, и очистки ПАВ.

Микроорганизмы могут расти *in situ* и продуцировать активные соединения на месте. Следовательно, высокая концентрация, например, био-ПАВ и микроорганизмов, продуцирующих био-ПАВ, в месте обработки (например, в нефтяной скважине) может быть достигнута легко и непрерывно.

35 В одном варианте осуществления настоящее изобретение позволяет легче транспортировать нефть. Как только вязкость тяжелой нефти снижается, нефть можно легко

транспортировать по трубопроводу, не требуя резервуаров для хранения и транспортировки грузовиками.

5 Продукты на основе микроорганизмов по настоящему изобретению могут использоваться в различных уникальных условиях благодаря, например, способности эффективно доставлять: 1) свежий ферментационный бульон с активными метаболитами; 2) смесь клеток, спор и/или мицелия и ферментационного бульона; 3) композицию с вегетативными клетками, спорами и/или мицелием; 4) композиции с высокой плотностью клеток, включая вегетативные клетки, споры и/или мицелий; 5) продукты на основе микроорганизмов, не требующие времени на их получение, и 6) продукты на основе  
10 микроорганизмов в удаленные места.

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На **Фиг. 1А-1Б** показаны результаты исследования тяжелой неочищенной термогравиметрическим анализом (**1А**) и увеличения БТЕ (**1Б**) после обработки заявленным  
15 изобретением.

На **Фиг. 2** показано повышение показателя API и снижение вязкости после применения заявленной обработки.

На **Фиг. 3** показан процент снижения вязкости колумбийской сырой нефти с использованием обработки MEL. Обработка была успешной в снижении вязкости образца на  
20 64 %.

### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение обеспечивает экологически чистые, экономически эффективные материалы и способы для повышения добычи и улучшения транспортировки  
25 нефти. В конкретных вариантах осуществления в заявленном изобретении предложены композиции на основе микроорганизмов и способы снижения вязкости тяжелой сырой нефти.

В одном варианте осуществления в заявленном изобретении предложены микроорганизмы, а также побочные продукты их жизнедеятельности, такие как био-ПАВ, растворители и/или ферменты. В заявленном изобретении также предложены способы  
30 использования этих микроорганизмов и побочных продуктов их жизнедеятельности.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены материалы и способы для улучшения добычи нефти путем обработки нефтесодержащих участков композицией на основе микроорганизмов, способной снижать вязкость сырой нефти. Преимущественно заявленные композиции и способы могут быть использованы для  
35 улучшения вязкости и/или улучшения добычи тяжелой сырой нефти в «зрелых» или даже «заглохших» нефтяных пластах.

В заявленном изобретении предложено выгодное использование микроорганизмов, а также побочных продуктов их жизнедеятельности, таких как био-ПАВ. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены продукты на основе микроорганизмов, а также их применение в улучшенной добыче нефти. В конкретных вариантах осуществления способы и композиции, описанные в настоящем документе, используют микроорганизмы для улучшения качества нефти путем снижения ее вязкости.

Преимущественно в одном варианте осуществления настоящее изобретение может быть использовано для превращения тяжелой битумной части сырой нефти в соединения с более низкой молекулярной массой. Кроме того, настоящее изобретение способно быстро растворять битум, *например*, в течение ночи, с созданием растворимой формы с большей воспламеняемостью по сравнению с твердой формой.

В одном варианте осуществления способ дополнительно включает стадию кавитации тяжелой нефти либо непосредственно перед, одновременно и/или через некоторое время после применения композиции на основе микроорганизмов и/или на основе био-ПАВ к участку добычи тяжелой нефти или нефти. Кавитация может быть проведена с использованием оборудования, известного в данной области техники, и может включать, например, гидродинамические или ультразвуковые способы.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен способ добычи нефти, который включает применение к участку добычи нефти композиции дрожжей, продуцирующих био-ПАВ, таких как дрожжи-киллеры, дрожжи *Starmerella*, дрожжи *Pseudozyma*, и/или бактерии, продуцирующие био-ПАВ, такие как штамм *Bacillus subtilis*.

Микроорганизмы могут быть живыми (или жизнеспособными), в форме спор или неактивными во время применения. Способ может дополнительно включать добавление дополнительных материалов для усиления роста микроорганизмов во время применения (например, добавление питательных веществ для ускорения роста микроорганизмов).

В одном варианте осуществления композиция на основе микроорганизмов содержит культуру, которая была выдержана в течение 24 часов или дольше. Выдержанная культура - это культура, которой давали возможность отдохнуть в течение некоторого времени после первоначального роста и продуцирования метаболита.

В некоторых вариантах осуществления штаммы *Bacillus subtilis* способны активно расти в условиях низкого содержания кислорода и/или с высоким содержанием соли с целью повышения добычи нефти и снижения вязкости в пласте. В некоторых вариантах осуществления штамм *Bacillus subtilis* выращивают в анаэробных условиях. Например, в системе обработки нефтяных скважин аэробная ферментация выполняется в первую очередь для создания высокой плотности клеток и высокой концентрации био-ПАВ. После введения в нефтяную скважину штамм сначала растет в аэробных условиях, затем в микроаэробных, а

затем в полностью анаэробных условиях. В анаэробных условиях в качестве акцептора электронов можно добавлять соли нитратов для поддержки анаэробного дыхания.

5 В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к продукту ферментации дрожжей, который можно использовать для снижения вязкости тяжелой сырой нефти. Преимущественно, микроорганизмы, используемые в указанном продукте, не образуют биопленки в нефти или на нефтяном оборудовании.

10 Продукт ферментации дрожжей может быть получен путем культивирования дрожжей, продуцирующих био-ПАВ и/или метаболиты, таких как, например, *Pichia anomala* (*Wickerhamomyces anomalus*). Ферментационный бульон после 7 дней культивирования при 25-30 °C может содержать суспензию дрожжевых клеток и, например, 4 г/л или более био-ПАВ.

15 Продукт ферментации дрожжей также может быть получен путем культивирования дрожжей, продуцирующих био-ПАВ и/или метаболиты, таких как, например, *Starmerella bombicola*. Ферментационный бульон после 5 дней культивирования при 25 °C может содержать суспензию дрожжевых клеток и, например, 100 г/л или более био-ПАВ.

20 Сырую нефть затем можно инкубировать с продуктом дрожжей, например, в течение 1 дня. Вязкость сырой нефти после инкубации с продуктом ферментации дрожжей может быть снижена, например, от  $2,3 \times 10^5$  сП до  $1,1 \times 10^4$  сП (95 % снижения), тогда как при инкубации с водой не показано какое-либо явное падение вязкости.

25 В одном варианте осуществления продукт ферментации дрожжей содержит дрожжи *Pichia guilliermondii*.

30 В одном варианте осуществления композицию, согласно настоящему изобретению, получают посредством процессов культивирования, варьирующихся от малого до крупного масштаба. Процесс культивирования может представлять собой, например, глубинное культивирование, твердофазную ферментацию (SSF) и/или их комбинацию.

35 В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложены способы производства био-ПАВ путем культивирования штамма микроорганизма согласно настоящему изобретению в условиях, подходящих для роста и продуцирования ПАВ, и очистки био-ПАВ. Настоящее изобретение также относится к способам получения ферментов или других белков путем культивирования штамма микроорганизма по настоящему изобретению в условиях, подходящих для роста и экспрессии белка; и очистки фермента или другого белка.

Преимущественно, настоящее изобретение может быть использовано без выделения больших количеств неорганических соединений в окружающую среду. Кроме того, в композициях и способах используются компоненты, которые являются биоразлагаемыми и токсикологически безопасными. Таким образом, настоящее изобретение может быть использовано во всех возможных операциях добычи нефти и газа в качестве «зеленой» обработки.

## Выбранные определения

Используемый в данном документе термин «композиция на основе микроорганизмов» означает композицию, которая содержит компоненты, которые были получены в результате жизнедеятельности микроорганизмов или других клеточных культур. Таким образом, композиция на основе микроорганизмов может содержать сами микроорганизмы и/или побочные продукты жизнедеятельности микроорганизмов. Микроорганизмы могут находиться в вегетативном состоянии, в форме спор, в форме мицелия, в любой другой форме пропагул или их смеси. Микроорганизмы могут быть в форме планктона или в форме биопленки, или в виде смеси обоих. Побочными продуктами жизнедеятельности могут быть, например, метаболиты, компоненты клеточной мембраны, экспрессированные белки и/или другие клеточные компоненты. Микроорганизмы могут быть целыми или лизированными. В предпочтительных вариантах осуществления микробы присутствуют вместе с бульоном, в котором они были выращены, в композиции на основе микроорганизмов. Клетки могут присутствовать, например, в концентрации  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ , или  $1 \times 10^{11}$  или более пропагул на миллилитр композиции. Используемый в данном документе термин пропагула означает любую часть микроорганизма, из которой может развиваться новый и/или зрелый организм, включая клетки, споры, конидии, мицелий, почки и семена, но не ограничиваясь ими.

В заявленном изобретении дополнительно предложены «продукты на основе микроорганизмов», которые представляют собой продукты, которые должны применяться на практике для достижения желаемого результата. Продукт на основе микроорганизмов может представлять собой просто композицию на основе микроорганизмов, собранную в процессе культивирования микроорганизмов. Альтернативно, продукт на основе микроорганизмов может содержать дополнительные ингредиенты, которые были добавлены. Указанные дополнительные ингредиенты могут включать, например, стабилизаторы, буферы, подходящие носители, такие как вода, растворы солей или любой другой подходящий носитель, добавленные питательные вещества для поддержки дальнейшей жизнедеятельности микроорганизмов, усилители роста, не являющиеся питательными веществами и/или агенты, которые облегчают отслеживание микроорганизмов и/или композиции в среде, в которой они применяются. Продукт на основе микроорганизмов может также содержать смеси композиций на основе микроорганизмов. Продукт на основе микроорганизмов может также содержать один или несколько компонентов композиции на основе микроорганизмов, которые были обработаны каким-либо образом, таким как фильтрация, центрифугирование, лизирование, сушка, очистка и тому подобное, но не ограничиваясь ими.

Используемый в данном документе термин «собранный» относится к удалению части или всей композиции на основе микроорганизмов из емкости для выращивания.

Используемый в данном документе термин «биоупленка» представляет собой сложный агрегат микроорганизмов, таких как бактерии, в котором клетки склеены друг с другом на поверхности. Клетки в биоупленках физиологически отличаются от планктонных клеток одного и того же организма, которые представляют собой отдельные клетки, которые могут плавать на поверхности или плавать в толще в жидкой культуральной среде.

Используемый в данном документе термин «изолированная» или «очищенная» молекула нуклеиновой кислоты, полинуклеотид, полипептид, белок или органическое соединение, такое как малая молекула (например, те, которые описаны ниже), по существу не содержит других соединений, таких как клеточный материал, с которым она связана в природном состоянии. Используемый в данном документе термин «изолированный» по отношению к штамму микроорганизма означает, что штамм изолирован из среды, в которой он существует в природном состоянии. Таким образом, выделенный штамм может существовать в виде, например, биологически чистой культуры или в виде спор (или других форм штамма) в сочетании с носителем.

В определенных вариантах осуществления очищенные соединения составляют по меньшей мере 60 мас. % (сухой вес) представляющего интерес соединения. Предпочтительно препарат составляет, по меньшей мере, 75 мас. %, более предпочтительно, по меньшей мере, 90 мас. % и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 99 мас. % представляющего интерес соединения. Например, очищенное соединение представляет собой соединение, которое составляет по меньшей мере 90 мас. %, 91 мас. %, 92 мас. %, 93 мас. %, 94 мас. %, 95 мас. %, 98 мас. %, 99 мас. % или 100 мас. % желаемого соединения по массе. Чистота измеряется любым подходящим стандартным методом, например колоночной хроматографией, тонкослойной хроматографией или высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ). Очищенный или выделенный полинуклеотид (рибонуклеиновая кислота (РНК) или дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) не содержит генов или последовательностей, которые фланкируют его в своем естественном состоянии. Очищенный или выделенный полипептид не содержит аминокислот или последовательностей, которые его фланкируют в своем естественном состоянии.

Термин «метаболит» относится к любому веществу, продуцируемому в метаболизме, или веществу, необходимому для участия в определенном метаболическом процессе. Метаболит может представлять собой органическое соединение, которое является исходным веществом (например, глюкоза), промежуточным соединением (например, ацетил-КоА) или конечным продуктом (например, н-бутанол) метаболизма. Примеры метаболитов могут включать ферменты, токсины, кислоты, растворители, спирты, белки, углеводы, витамины, минеральные вещества, микроэлементы, аминокислоты, полимеры и ПАВ, но не ограничиваются ими.

Под «модуляцией» подразумевается изменение (например, увеличение или уменьшение). Такие изменения обнаруживаются известными в уровне техники стандартными способами, такими как описанные в данном документе.

5 Представленные в данном документе диапазоны считаются условным обозначением для всех значений в указанном диапазоне. Например, под диапазоном от 1 до 20 понимают любое значение, комбинацию значений или поддиапазон из группы, включающей 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, а также все промежуточные десятичные значения между вышеупомянутыми целыми числами, такие как, например, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и 1,9. Что касается поддиапазонов, специально предусмотрены «охваченные

10 поддиапазоны», которые находятся в пределах любой конечной точки диапазона. Например, охваченный поддиапазон примерного диапазона от 1 до 50 может содержать от 1 до 10, от 1 до 20, от 1 до 30 и от 1 до 40 в одном направлении, или от 50 до 40, от 50 до 30, от 50 до 20 и от 50 до 10 в другом направлении.

Под термином «уменьшает» подразумевают отрицательное изменение, составляющее,

15 по меньшей мере, 1 %, 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 % или 100 %.

Под термином «референтный» подразумевают стандартное или контрольное условие.

Термин «солеустойчивый» означает, что штамм микроорганизма способен расти в концентрации хлорида натрия пятнадцать (15) процентов или более. В конкретном варианте осуществления «солеустойчивый» относится к способности расти при 150 г/л NaCl или более.

20 Под термином «ПАВ» подразумевают соединение, которое снижает поверхностное натяжение (или межфазное натяжение) между двумя жидкостями или между жидкостью и твердым веществом. ПАВ действуют как детергенты, смачивающие агенты, эмульгаторы, пенообразователи и диспергаторы.

Используемый в данном документе термин «применение» композиции или продукта

25 относится к контакту с мишенью или участком, так что композиция или продукт могут оказывать влияние на эту мишень или участок. Эффект может быть обусловлен, например, ростом микроорганизмов и/или действием био-ПАВ или другого побочного продукта жизнедеятельности. Например, композиции или продукты на основе микроорганизмов могут вводиться в нефтяные скважины и/или трубопроводы, насосы, резервуары и т. д., связанные с

30 нефтяными скважинами и переработкой нефти.

Используемый в данном документе термины «тяжелая нефть» или «тяжелые углеводороды» означают вязкие углеводородные жидкости. Тяжелые углеводороды могут включать высоковязкие углеводородные жидкости, такие как тяжелая нефть, сверхтяжелая нефть, гудрон, битуминозные пески, мазут и/или битум. Тяжелая и сверхтяжелая нефть

35 являются высоковязкими с плотностью, близкой или даже превышающей плотность воды. Тяжелые углеводороды могут содержать от умеренных до высоких количеств парафинов, смол и асфальтенов, а также меньшие концентрации серы, кислорода и азота. Тяжелые

углеводороды могут также включать ароматические углеводороды или другие углеводороды с кольцевым комплексом. Дополнительные элементы также могут присутствовать в тяжелых углеводородах в следовых количествах. Тяжелые углеводороды могут быть классифицированы по плотности по API. Тяжелые углеводороды обычно имеют плотность по API ниже примерно 20 °. Например, тяжелая нефть, как правило, имеет плотность по API примерно 10-20°, тогда как сверхтяжелая нефть, как правило, имеет плотность по API ниже примерно 12°. Вязкость тяжелых углеводородов обычно выше примерно 200 сП в пластовых условиях, а вязкость сверхтяжелой нефти обычно составляет примерно 10000 сП или более.

Используемый в данном документе термин «обогащение» или «превращение» или «улучшение качества» или «увеличение стоимости» тяжелой нефти и/или углеводородов означает изменение структуры углеводородов и/или содержимого нефти таким образом, чтобы увеличить их общую полезность для потребителей, и, следовательно, их ценность для производителей. Например, БТЕ, то есть содержание энергии или тепла в нефти, может быть увеличено (ФИГ. 1А-1Б), таким образом увеличивая стоимость тяжелой нефти, прежде чем она будет продана на нефтеперерабатывающие заводы. Это также может принести пользу нефтеперерабатывающим заводам, которые могут покупать более дешевую тяжелую сырую нефть и превращать ее в более пригодный для использования продукт, такой как, например, дорожный битум, используя соответствующие способы и композиции. Обогащение может также включать увеличение плотности по API, снижение вязкости и/или уменьшение содержания примесей тяжелых углеводородов. Примесь часто является свободным радикалом, который присоединяется к большим молекулам углеводородов. Типичные примеси, обнаруживаемые в тяжелой нефти, могут включать, например, серу или сероводород, золу, азот, тяжелые металлы, олефины, ароматические соединения, нафтены и асфальтены.

## 25 Штаммы микроорганизмов, выращенные в соответствии с настоящим изобретением

Микроорганизмами, выращенными в соответствии с системами и способами по настоящему изобретению, могут быть, например, бактерии, дрожжи и/или грибы. Эти микроорганизмы могут быть природными или генетически модифицированными микроорганизмами. Например, микроорганизмы могут быть трансформированы специфическими генами для проявления специфических характеристик. Микроорганизмы также могут быть мутантами желаемого штамма. Процедуры получения мутантов хорошо известны в области микробиологии. Например, ультрафиолетовый свет и нитрозогуанидин широко используются для этой цели.

В одном варианте осуществления микроорганизм представляет собой дрожжи или грибы. Виды дрожжей и грибов, пригодные для использования согласно настоящему изобретению, включают *Candida*, *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, *S. boulardii sequela*, *S. torula*), *Issalchenkia*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Wickerhamomyces* (например, *W. anomalus*), *Starmerella*

(например, *S. bombicola*), *Mycorrhiza*, *Mortierella*, *Phycomyces*, *Blakeslea*, *Thraustochytrium*, *Phythium*, *Entomophthora*, *Aureobasidium pullulans*, *Pseudozyma*, *Fusarium venenatum*, *Aspergillus*, *Trichoderma* (например, *T. reesei*, *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. viride*), и/или *Rhizopus spp.*

В одном варианте осуществления дрожжи являются дрожжами-киллерами.

5 Используемый в данном документе термин «дрожжи-киллеры» означает штамм дрожжей, характеризующийся секрецией токсических белков или гликопротеинов, против которого сам штамм является невосприимчивым. Экзотоксины, выделяемые дрожжами-киллерами, способны убивать другие штаммы дрожжей, грибов или бактерий. Например, микроорганизмы, с которыми можно бороться дрожжами-киллерами, включают *Fusarium* и  
10 другие нитчатые грибы. Примерами дрожжей-киллеров в соответствии с настоящим изобретением являются те, которые можно безопасно использовать в пищевой промышленности и ферментации, например, в пивоварении, виноделии и в хлебопечении; те, которые могут быть использованы для борьбы с другими микроорганизмами, которые могут загрязнять такие производственные процессы; те, которые могут быть использованы в  
15 биоборьбе для сохранения пищевых продуктов; те, которые могут быть использованы для лечения грибных инфекций у людей и растений; и те, которые могут быть использованы в технологии рекомбинантных ДНК. Такие дрожжи могут включать *Wickerhamomyces*, *Pichia* (например, *P. anomala*, *P. guilliermondii*, *P. kudriavzevii*), *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, (например, *H. uvarum*), *Ustilago maydis*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida*,  
20 *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Torulopsis*, *Ustilago*, *Williopsis*, *Zygosaccharomyces* (например, *Z. bailii*), и другие, но не ограничиваются ими.

В одном варианте осуществления микроорганизмы выбраны из штаммов дрожжей *Pichia*. Еще более предпочтительно, дрожжи выбраны из *Pichia anomala* (*Wickerhamomyces anomalus*), *Pichia sydowiorum*, *Pichia guilliermondii* и *Pichia lyndferdii*.

25 В конкретных вариантах осуществления в заявленном изобретении предложено использование *Pichia anomala* и/или *Pichia guilliermondii*.

В одном варианте осуществления штамм микроорганизма представляет собой *Pseudozyma aphidis* и его мутанты. *Pseudozyma aphidis* является эффективным продуцентом липидов маннозилеритрита (MEL).

30 В одном варианте осуществления штамм микроорганизма выбран из класы *Starmerella*. Культура микроорганизма *Starmerella* полезна в соответствии с заявленным изобретением, *Starmerella bombicola*, может быть получена из Американской коллекции типовых культур (ATCC), 10801 Университетский бул., Манассас, Ва. 20110-2209 США. Депозиту присвоен депозитарный номер ATCC 22214 депозитарием.

35 В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено использование штамма дрожжей ATCC 22214 и его мутантов. ATCC 22214 представляет собой эффективный

5 продуцент SLP. Процедуры получения мутантов хорошо известны в области микробиологии. Например, ультрафиолетовый свет и нитрозогуанидин широко используются для этой цели.

Другие штаммы микроорганизмов, включая, например, другие штаммы грибов, способные накапливать значительные количества, например, гликолипид-био-ПАВ, могут  
5 быть использованы в соответствии с настоящим изобретением. Метаболиты микроорганизмов, применимые в соответствии с настоящим изобретением, включают маннопротеин, бета-глюкан и другие вещества, которые обладают биоэмульгирующими свойствами и способствуют снижению поверхностного/межфазного натяжения.

В другом варианте осуществления микроорганизмы представляют собой бактерии,  
10 включая грамположительные и грамотрицательные бактерии. Бактериями могут быть, например, *Bacillus subtilis*, *Bacillus firmus*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquifaciens*, *Azobacter vinelandii*, *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens* (Kluver), *Agrobacterium radiobacter*, *Azospirillum brasiliense*, *Azobacter chroococcum*, *Rhizobium*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Ralstonia eulropha* и/или *Rhodospirillum rubrum*. В одном варианте осуществления микроорганизм представляет собой штамм *B. subtilis*,  
15 такой как, например, *B. subtilis var. locuses* В1 или В2. *B. subtilis* является эффективным продуцентом сурфактина.

Культура микроорганизма *B. subtilis* В1 был депонирован в Американской коллекции типовых культур (АТСС), 10801 Университетский бул., Манассас, Ва. 20110-2209 США.  
20 Депозиту присвоен депозитарный номер АТСС РТА-123459 депозитарием и депозит был депонирован 30 августа 2016 года.

Заявленные культуры были депонированы в условиях, которые гарантируют, что доступ к культурам будет доступен в течение срока действия настоящей патентной заявки, определенные Уполномоченным по патентам и товарным знакам согласно 37 CFR 1.14 и 35  
25 U.S.C 122. Депозиты доступны в соответствии с требованиями зарубежного патентного законодательства в странах, где поданы аналоги данной заявки или выделенные заявки. Однако следует понимать, что наличие депозита не представляет собой лицензию на практическое использование заявленного изобретения при нарушении патентных прав, предоставленных правительством.

30 Кроме того, указанные депонированные культуры будут храниться и предоставляться в распоряжение общественности в соответствии с положениями Будапештского договора о депонировании микроорганизмов, т.е. они будут храниться со всей тщательностью, необходимой для сохранения его жизнеспособным и незагрязненным в течение периода времени не менее пяти лет после последнего запроса о предоставлении образца депозита и, в  
35 любом случае, на срок не менее 30 (тридцати) лет после даты депонирования или в течение срока действия любого патента, который может раскрывать указанные культуры. Депозитор признает обязанность заменить депозиты, если депозитарий не сможет предоставить образец

по запросу в связи с состоянием депозитов. Все ограничения на доступность для публики депозитов заявленной культуры будут безвозвратно сняты при выдаче патента, раскрывающего их.

## 5 **Культивирование микроорганизмов в соответствии с заявленным изобретением**

В заявленном изобретении используют способы культивирования микроорганизмов и продуцирования микробных метаболитов и/или других побочных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов. Настоящее изобретение дополнительно использует процессы культивирования, которые подходят для культивирования микроорганизмов и получения метаболитов микроорганизмов в желаемом масштабе. Указанные процессы культивирования включают глубинное культивирование/ферментацию, твердофазную ферментацию (SSF) и их комбинации, но не ограничиваются ими.

Системы культивирования микроорганизмов обычно используют глубинное культивирование культур; тем не менее, поверхностные культуры и гибридные системы также могут быть использованы. Используемый в данном документе термин «культивирование» относится к выращиванию клеток в контролируемых условиях. Культивирование может быть аэробным или анаэробным.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложены материалы и методы для производства биомассы (например, жизнеспособного клеточного материала), внеклеточных метаболитов (например, небольших молекул и выделенных белков), остаточных питательных веществ и/или внутриклеточных компонентов (например, ферментов и других белков).

Емкость для выращивания микроорганизмов, используемый в соответствии с настоящим изобретением, может представлять собой любой ферментер или реактор для культивирования для промышленного использования. В одном варианте осуществления емкость может иметь функциональные элементы управления/датчики или может быть связана с функциональными элементами управления/датчиками для измерения важных факторов в процессе культивирования, таких как pH, кислород, давление, температура, мощность на валу мешалки, влажность, вязкость и/или плотность микроорганизмов и/или концентрация метаболитов.

В дополнительном варианте осуществления емкость также может быть способна контролировать рост микроорганизмов внутри емкости (например, измерение количества клеток и фаз роста). Альтернативно, суточный образец может быть взят из емкости и подвергнут подсчету методами, известными в данной области техники, такими как посев методом разведения. Посев методом разведения – это простой метод, используемый для подсчета количества бактерий в образце. Указанным методом также можно рассчитать индекс, по которому можно сравнивать различные среды или методы обработки.

В одном варианте осуществления способ включает дополнение культивирования источником азота. Источником азота может быть, например, нитрат калия, нитрат аммония, сульфат аммония, фосфат аммония, аммиак, мочеви́на и/или хлорид аммония. Указанные источники азота могут использоваться независимо или в комбинации двух или более.

5           Способ может обеспечить оксигенацию растущей культуры. В одном варианте осуществления используется медленное движение воздуха для удаления воздуха с низким содержанием кислорода и введения насыщенного кислородом воздуха. Насыщенный кислородом воздух может быть окружающим воздухом, ежедневно пополняемым через механизмы, включающие в себя турбинные мешалки для механического перемешивания жидкости и распределители воздуха для подачи пузырьков газа в жидкость для растворения кислорода в жидкости.

10           Способ может дополнительно включать дополнение культивирования источником углерода. Источником углерода обычно является углевод, такой как глюкоза, сахароза, лактоза, фруктоза, трегалоза, манноза, маннит и/или мальтоза; органические кислоты, такие как уксусная кислота, фумаровая кислота, лимонная кислота, пропионовая кислота, яблочная кислота, малоновая кислота и/или пировиноградная кислота; спирты, такие как этанол, пропанол, бутанол, пентанол, гексанол, изобутанол и/или глицерин; жиры и масла, такие как соевое масло, масло рисовых отрубей, оливковое масло, масло канолы, кукурузное масло, кунжутное масло и/или льняное масло; и т.п. Указанные источники углерода могут использоваться независимо или в комбинации двух или более.

15           В одном варианте осуществления факторы роста и микроэлементы для микроорганизмов включены в питательную среду. Это особенно предпочтительно при культивировании микроорганизмов, которые не способны вырабатывать все необходимые им витамины. Неорганические питательные вещества, включая микроэлементы, такие как железо, цинк, медь, марганец, молибден и/или кобальт, также могут быть включены в питательную среду.

20           В одном варианте осуществления также могут быть включены неорганические соли. Пригодными неорганическими солями могут быть дигидрофосфат калия, гидрофосфат дикалия, гидрофосфат натрия, сульфат магния, хлорид магния, сульфат железа, хлорид железа, сульфат марганца, хлорид марганца, сульфат цинка, хлорид свинца, сульфат меди, хлорид кальция, карбонат кальция и/или карбонат натрия. Указанные неорганические соли могут использоваться независимо или в комбинации двух или более.

25           В некоторых вариантах осуществления способ культивирования может дополнительно включать добавление дополнительных кислот и/или противомикробных препаратов в жидкую питательную среду перед и/или во время процесса культивирования. Антимикробные агенты или антибиотики используются для защиты культуры от загрязнения. Кроме того, могут быть

добавлены пеногасители для предотвращения образования и/или накопления пены, когда газ образуется во время культивирования.

5 Значение pH смеси должно соответствовать интересующему микроорганизму. Буферы и регуляторы pH, такие как карбонаты и фосфаты, могут быть использованы для стабилизации pH примерно предпочтительного значения. Когда ионы металлов присутствуют в высоких концентрациях, может потребоваться использование хелатирующего агента в жидкой питательной среде.

10 Способ и оборудование для культивирования микроорганизмов и получения микробных побочных продуктов жизнедеятельности могут быть выполнены в периодическом, полунепрерывном процессе или непрерывном процессе культивирования.

15 Микроорганизмы могут быть выращены в планктонной форме или в виде биопленки. В случае биопленки в емкости может быть субстрат, на котором можно выращивать микроорганизмы в состоянии биопленки. Система также может иметь, например, возможность применять стимулы (такие как механическое раздражение), которые стимулируют и/или улучшают характеристики роста биопленки.

20 В одном варианте осуществления способ культивирования микроорганизмов осуществляют при температуре от примерно 5 до примерно 100 °C, предпочтительно от 15 до 60 °C, более предпочтительно от 25 до 50 °C. В дополнительном варианте осуществления культивирование может проводиться непрерывно при постоянной температуре. В другом варианте культивирование может подвергаться изменению температуры.

25 В одном варианте осуществления оборудование, используемое в способе и процессе культивирования, является стерильным. Оборудование для культивирования, такое как реактор/емкость, может быть отделено от стерилизационного устройства, например, от автоклава, но подключено к нему. Оборудование для культивирования также может иметь стерилизационный блок, который стерилизует *in situ* перед началом инокуляции. Воздух можно стерилизовать способами, известными в данной области техники. Например, окружающий воздух может проходить через, по меньшей мере, один фильтр, прежде чем попадет в емкость. В других вариантах осуществления питательная среда может быть пастеризована или, необязательно, вообще не нагреваться, причем может быть использовано низкая активность воды и низкий pH для борьбы с ростом бактерий.

30 В одном варианте осуществления настоящее изобретение дополнительно относится к способу получения микробных метаболитов, таких как этанол, молочная кислота, бета-глюкан, белки, пептиды, промежуточные метаболиты, полиненасыщенные жирные кислоты и липиды. Содержание метаболита, полученного этим способом, может составлять, например, по меньшей мере 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % или 90 %.

Содержание биомассы в ферментационном бульоне может составлять, например, от 5 до 180 г/л или более. В одном варианте осуществления содержание твердых веществ в бульоне составляет от 10 до 150 г/л.

Побочный продукт жизнедеятельности микроорганизмов, продуцируемый микроорганизмами, представляемыми интерес, может удерживаться в микроорганизмах или секретироваться в жидкую питательную среду. В другом варианте осуществления способ получения побочного продукта жизнедеятельности микроорганизмов может дополнительно включать стадии концентрирования и очистки побочного продукта жизнедеятельности микроорганизмов, представляющего интерес. В дополнительном варианте осуществления жидкая питательная среда может содержать соединения, которые стабилизируют активность побочного продукта жизнедеятельности микроорганизмов.

В одном варианте осуществления ПАВ получают путем культивирования штамма микроорганизма по заявленному изобретению в условиях, подходящих для роста и продуцирования ПАВ; и, в оптимальном варианте, очистки ПАВ. Ферменты или другие белки также могут быть получены путем культивирования штамма микроорганизма по настоящему изобретению в условиях, подходящих для роста и экспрессия белка; и, в оптимальном варианте, очистки фермента или другого белка.

В одном варианте осуществления всю композицию для культивирования микроорганизмов удаляют по завершении культивирования (например, после достижения желаемой плотности клеток или плотности указанного метаболита в бульоне). В указанном периодическом режиме культивирования совершенно новая партия начинается после получения первой партии.

В другом варианте осуществления только часть продукта ферментации удаляется одновременно. В этом варианте осуществления биомасса с жизнеспособными микроорганизмами остается в сосуде в качестве инокулянта для новой партии культивирования. Композиция, которая удаляется, может представлять собой бульон, не содержащий клеток, или содержать клетки. Таким образом, создают полунепрерывную систему.

Преимущественно, способ не требует сложного оборудования или большого потребления энергии. Представляющие интерес микроорганизмы можно культивировать в малом или крупном масштабе на месте и использовать, даже все еще смешанными с питательной средой. Аналогичным образом, микробные метаболиты могут также продуцироваться в больших количествах в нужном месте.

Преимущественно продукты на основе микроорганизмов можно производить в удаленных местах. В одном варианте осуществления продукты на основе микроорганизмов можно использовать для питания человека и/или профилактики и/или лечения заболеваний. Средства

для выращивания микроорганизмов могут работать вне сети с использованием, например, солнечной, ветровой и/или гидроэнергетики.

### **Композиции на основе микроорганизмов**

5 В настоящем изобретении предложены композиции для снижения вязкости нефти. Композиция может быть использована для превращения тяжелой нефти в легкую нефть. Композиция может быть дополнительно использована для повышения добычи нефти, включая добычу нефти из нефтеносных песков. Кроме того, композиция может быть использована для улучшения транспортировки нефти, позволяя транспортировать ее по трубопроводам, а не в резервуарах для хранения и транспортировки.

10 В определенных вариантах осуществления композиция на основе микроорганизмов по настоящему изобретению содержит микроорганизмы и/или их побочные продукты. В одном варианте осуществления микроорганизмы, используемые в способах по настоящему изобретению, представляют собой бактерии или дрожжи, продуцирующие био-ПАВ, или их комбинации. В одном варианте осуществления микроорганизм может представлять собой один или несколько штаммов *Bacillus subtilis*. В другом варианте осуществления композиция на основе микроорганизмов содержит культурные дрожжи *Starmerella bombicola*. В еще одном варианте осуществления композиция содержит культурные дрожжи *Pseudozyma aphidis*.

20 В предпочтительных вариантах осуществления микроорганизмы представляют собой дрожжи *Pichia*, такие как, например, *Pichia anomala* (*Wickerhamomyces anomalus*), *Pichia sydowiorum*, *Pichia guilliermondii* и *Pichia lyndferdii*. Наиболее предпочтительно в композиции на основе микроорганизмов используются *Pichia anomala* и/или *Pichia guilliermondii*.

25 В некоторых вариантах осуществления микроорганизмы, используемые в соответствии с заявленным изобретением, являются «сверхпродуцентами ПАВ». Например, штамм может продуцировать по меньшей мере 0,1-10 г/л, например, 0,5-1 г/л побочных продуктов в виде ПАВ. Например, микроорганизмы продуцируют по меньшей мере 10 %, 25 %, 50 %, 100 %, в 2 раза, 5 раз, 7,5 раз, 10 раз, 12 раз, 15 раз или больше по сравнению с другими штаммами микроорганизмов для добычи нефти.

30 Композиция на основе микроорганизмов может содержать ферментационный бульон, содержащий живую культуру и/или метаболиты микроорганизмов, продуцируемые микроорганизмом, и/или любые остаточные питательные вещества. Продукт ферментации может быть использован непосредственно без экстракции или очистки. При желании экстракция и очистка могут быть легко достигнуты с использованием стандартных методов или методик экстракции и/или очистки, описанных в литературе.

35 Преимущественно в соответствии с заявленным изобретением композиция на основе микроорганизмов может содержать бульон, в котором были выращены микроорганизмы. Продукт может представлять собой, например, по меньшей мере, 1 мас. %, 5 мас. %, 10 мас. %, 15 мас. %, 20 мас. %, 25 мас. %, 30 мас. %, 35 мас. %, 40 мас. %, 45 мас. %, 50 мас. %, 55 мас. %, 60 мас. %, 65 мас. %, 70 мас. %, 75 мас. %, 80 мас. %, 85 мас. %, 90 мас. %, 95 мас. % или 100 мас. %.

25 мас. %, 50 мас. %, 75 мас. % или 100 мас. % бульона. Количество биомассы в продукте может составлять, например, от 0 до 100 мас. %, включая все процентные значения в диапазоне между ними.

5 Содержание биомассы в ферментационном бульоне может составлять, например, от 5 до 180 г/л или более. В одном варианте осуществления содержание твердых веществ в бульоне составляет от 10 до 150 г/л.

10 Дополнительные компоненты могут быть добавлены к композиции на основе микроорганизмов, например, буферные агенты, носители, другие композиции на основе микроорганизмов, производимые в той же или другой установке, модификаторы вязкости, консерванты, питательные вещества для роста микроорганизмов, агенты для отслеживания, биоциды, другие микроорганизмы, ПАВ, эмульгаторы, смазывающие вещества, агенты, регулирующие растворимость, агенты, регулирующие рН, консерванты, стабилизаторы и устойчивые к ультрафиолету агенты.

15 В одном варианте осуществления композиция может дополнительно содержать буферные агенты, включая органические кислоты и аминокислоты или их соли для стабилизации рН около предпочтительного значения. Подходящие буферы включают цитрат, глюконат, тартрат, малат, ацетат, лактат, оксалат, аспартат, малонат, глюкогептонат, пируват, галактарат, глюкарат, тартронат, глутамат, глицин, лизин, глутамин, метионин, цистеин, аргинин и их смеси, но не ограничиваются ими. Фосфорная и фосфористая кислоты или их соли также могут быть использованы. Синтетические буферы пригодны для использования, но предпочтительно использовать природные буферы, такие как органические кислоты и аминокислоты или их соли.

25 В дополнительном варианте осуществления регуляторы рН включают гидроксид калия, гидроксид аммония, карбонат или бикарбонат калия, соляную кислоту, азотную кислоту, серную кислоту или их смеси. Значение рН композиции на основе микроорганизмов должно соответствовать интересующему микроорганизму. В предпочтительном варианте осуществления рН композиции на основе микроорганизмов находится в диапазоне 7,0-7,5.

30 В одном варианте осуществления в композицию на основе микроорганизмов могут быть включены дополнительные компоненты, такие как водный препарат соли в виде полипротоновой кислоты, такой как бикарбонат или карбонат натрия, сульфат натрия, фосфат натрия или бифосфат натрия.

35 По желанию, продукт может храниться до использования. Время хранения предпочтительно короткое. Так, время хранения может составлять менее 60 дней, 45 дней, 30 дней, 20 дней, 15 дней, 10 дней, 7 дней, 5 дней, 3 дней, 2 дней, 1 дня или 12 часов. В предпочтительном варианте осуществления, если в продукте присутствуют живые клетки,

продукт хранят при прохладной температуре, такой как, например, менее 20, 15, 10 или 5 °С. С другой стороны, композицию био-ПВА обычно можно хранить при температуре окружающей среды.

5 В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению имеют преимущества перед, например, одними био-ПАВ, включая одно или несколько из следующих: высокие концентрации маннопротеина как части внешней поверхности клеточной стенки дрожжей; присутствие бета-глюкана в клеточных стенках дрожжей; наличие софоролипидов в культуре и присутствие растворителей и других метаболитов (например, молочной кислоты, этанола, и т. д.).

10 Известные в данной области системы могут быть использованы для культивирования микроорганизмов для использования в настоящем изобретении, таких как глубинная ферментация культур, поверхностное культивирование и гибридные системы. Используемый в данном документе термин «культивирование» относится к выращиванию клеток в контролируемых условиях. Культивирование может быть аэробным или анаэробным.

15 Продукт ферментации может быть использован непосредственно без экстракции или очистки. При желании экстракция и очистка могут быть легко достигнуты с использованием стандартных методов или методик экстракции, известных специалистам в данной области.

20 Способ и оборудование для культивирования микроорганизмов и получения микробных побочных продуктов жизнедеятельности могут быть выполнены в периодическом процессе, полунепрерывном процессе или непрерывном процессе культивирования.

25 Микроорганизмы в продукте на основе микроорганизмов могут находиться в активной или неактивной форме. Продукты на основе микроорганизмов могут использоваться без дальнейшей стабилизации, консервации и хранения. Преимущественно, прямое использование этих продуктов на основе микроорганизмов сохраняет высокую жизнеспособность микроорганизмов, уменьшает возможность загрязнения посторонними агентами и нежелательными микроорганизмами и поддерживает активность побочных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

30 Микроорганизмы и/или бульон, полученный в результате роста микроорганизмов, могут быть удалены из емкости для выращивания, в которой происходит культивирование, и перенесены, например, через трубопровод для немедленного использования.

В одном варианте осуществления композиция на основе микроорганизмов содержит культуру, которая была выдержана в течение 24 часов или дольше. Выдержанная культура - это культура, которой давали возможность отдохнуть в течение некоторого времени после первоначального роста и продуцирования метаболита.

35 В других вариантах осуществления композиции (микроорганизмы, бульон или микроорганизмы и бульон) может быть помещена в контейнеры соответствующего размера, принимая во внимание, например, предполагаемое использование, предполагаемый способ

5 применения, размер ферментационной емкости и любой способ транспортировки от установки для выращивания микроорганизма до места использования. Таким образом, контейнеры, в которые помещена композиция на основе микроорганизмов, могут иметь объем, например, от 1 до 1000 галлонов или более. В определенных вариантах осуществления контейнеры имеют

10 После получения композиции на основе микроорганизмов из емкости для выращивания можно добавлять дополнительные компоненты, когда полученный продукт помещают в контейнеры и/или доставляют по трубам (или иным образом транспортируют для использования). Добавками могут быть, например, буферы, носители, другие композиции на основе

15 микроорганизмов, производимые в той же или другой установке, модификаторы вязкости, консерванты, питательные вещества для роста микроорганизмов, отслеживающие агенты, пестициды и другие ингредиенты, специфичные для предполагаемого использования.

### **Местное производство продуктов на основе микроорганизмов**

15 В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения установка для выращивания микроорганизмов продуцирует новые микроорганизмы с высокой плотностью и/или побочные продукты жизнедеятельности микроорганизмов, представляющие интерес, в желаемом масштабе. Установка для выращивания микроорганизмов может быть расположена в месте применения или рядом с ним. Предприятие производит микробные композиции с

20 высокой плотностью при периодическом, полунепрерывном или непрерывном культивировании.

Распределенные установки для выращивания микроорганизмов по настоящему изобретению могут быть расположены в месте, где будет использоваться продукт на основе микроорганизмов (например, в месторождении) или рядом с местом использования. Например,

25 средство для выращивания микроорганизмов может находиться менее чем в 300, 250, 200, 150, 100, 75, 50, 25, 15, 10, 5, 3 или 1 миле от места использования.

Поскольку продукт на основе микроорганизмов производится локально, не прибегая к процессам стабилизации, сохранения, хранения и транспортировки микроорганизмов при обычном производстве микроорганизмов, может быть получена значительно более высокая

30 плотность живых микроорганизмов в вегетативном состоянии или состоянии пропагул, тем самым требуется меньший объем продукта на основе микроорганизмов для использования на месте применения или который позволяет применять микроорганизмы с гораздо более высокой плотностью, где это необходимо для достижения желаемой эффективности. Это позволяет использовать биореактор уменьшенного размера (например, меньший резервуар для брожения;

35 меньшие запасы исходного материала, питательных веществ, агентов для регулирования pH и пеногасителей и т. д.) без необходимости стабилизировать клетки или отделять их от

культурального бульона, что делает систему эффективной и облегчает транспортабельность продукта.

Локальное получение продукта на основе микроорганизмов также способствует включению в продукт ростового бульона. Бульон может содержать агенты, образующиеся во время ферментации, которые особенно хорошо подходят для местного применения.

Произведенные локально высокоплотные и устойчивые культуры микроорганизмов более эффективны в полевых условиях, чем те, которые подверглись вегетативной стабилизации клеток или некоторое время находились в цепочке поставок. Продукты на основе микроорганизмов по настоящему изобретению особенно выгодны по сравнению с традиционными продуктами, в которых клетки были отделены от метаболитов и питательных веществ, присутствующих в ферментационной питательной среде. Сокращение сроков транспортировки позволяет производить и доставлять новые партии микроорганизмов и/или их метаболитов в определенное время и в объеме, как этого требует местный спрос.

Установки для выращивания микроорганизмов по настоящему изобретению производят новые композиции на основе микроорганизмов, содержащие сами микроорганизмы, метаболиты микроорганизмов и/или другие компоненты бульона, в котором выращиваются микроорганизмы. При желании композиции могут иметь высокую плотность вегетативных клеток или смесь вегетативных клеток, репродуктивных спор, конидий и/или мицелия.

Преимущественно композиции могут быть адаптированы для использования в указанном месте. В одном варианте осуществления установка для выращивания микроорганизмов расположена на участке или вблизи него, где будут использоваться продукты на основе микроорганизмов.

Преимущественно, указанные установки для выращивания микроорганизмов обеспечивают решение текущей проблемы, заключающейся в том, чтобы полагаться на крупных промышленных производителей, чье качество продукции страдает из-за задержек в процессе переработки, затруднений в цепочке поставок, неправильного хранения и других непредвиденных обстоятельств, которые препятствуют своевременной доставке и применению, например, жизнеспособного продукта с высоким содержанием клеток и связанных с ним бульона и метаболитов, в котором первоначально выращивались клетки.

Преимущественно, в предпочтительных вариантах осуществления системы по настоящему изобретению используют возможности природных микроорганизмов и их побочных продуктов их метаболизма для улучшения добычи нефти. Установки для выращивания микроорганизмов обеспечивают универсальность производства за счет способности адаптировать продукты на основе микроорганизмов для улучшения синергии с географическими точками назначения.

Время культивирования для отдельных емкостей может составлять, например, от 1 до 7 дней или дольше. Продукт культивирования можно получать любым из множества способов.

5 Местное производство и доставка в течение, например, 24 часов после ферментации приводит к чистым композициям с высокой плотностью клеток и существенно снижает стоимость доставки. Учитывая перспективы быстрого продвижения в разработке более эффективных и мощных микроорганизмов для инокуляции, потребители получают большую выгоду от этой способности быстро доставлять продукты на основе микроорганизмов.

Местные микроорганизмы могут быть идентифицированы на основании, например, солеустойчивости и способности расти при высоких температурах.

10 В одном варианте осуществления композицию, согласно настоящему изобретению, получают посредством процессов культивирования, варьирующихся от небольших (например, лабораторных условий) до крупных (например, промышленных условий) масштабов. Указанные процессы культивирования включают глубинное культивирование/ферментацию, твердофазную ферментацию (SSF) и их комбинации, но не ограничиваются ими.

15 Преимущественно продукты на основе микроорганизмов можно производить в удаленных местах. Средства для выращивания микроорганизмов могут работать вне сети с использованием, например, солнечной, ветровой и/или гидроэнергетики.

#### **Методы повышения добычи нефти**

20 В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен способ снижения вязкости тяжелой сырой нефти, включающий контактирование композиции на основе микроорганизмов с нефтью. Способ может быть использован для превращения тяжелой нефти в легкую нефть. Способ необязательно включает применение питательных веществ и/или других агентов вместе с композицией на основе микроорганизмов. Способ может быть  
25 осуществлен *in situ* путем применения композиции и необязательных питательных веществ и/или других агентов непосредственно к нефтяному пласту.

Настоящее изобретение может применяться на всех стадиях цепочки операций, включая операторов разведки и добычи (E&P) (например, стволы скважин на суше и на шельфе, отводные линии и резервуары), транспортировку и хранение углеводородов  
30 (например, трубопроводы, танкеры, транспортировка, резервуары для хранения) и на нефтеперерабатывающих заводах (например, теплообменники, печи, ректификационные колонны, коксовые установки, гидрокрекинг).

Преимущественно, как показано на **ФИГ. 2**, настоящее изобретение может повысить плотность по API сырой нефти, тяжелой нефти, битуминозных песков и нефтяных коксов, а также уменьшить или исключить необходимость и затраты, связанные с введением пара и  
35 другими термическими, химическими и механическими способами добычи тяжелой нефти. Кроме того, уменьшается или устраняется необходимость в веществах для разбавления

(например, легкой или очищенной сырой нефти) и водяных рубашках, чтобы помочь перемещать тяжелую нефть по трубопроводам. Более того, с уменьшением вязкости тяжелой нефти транспортировка нефти становится менее сложной или дорогостоящей, поскольку потребность в автоцистернах и резервуарах для хранения уменьшается, а использование 5 трубопроводного транспорта становится более осуществимым.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен способ улучшения добычи нефти путем применения к участку добычи нефти, содержащему тяжелую нефть, композиции на основе микроорганизмов. Участок добычи нефти может содержать нефтеносные пески. Способ необязательно включает добавление питательных веществ и/или 10 других агентов на участок.

Способ также может включать применение микроорганизмов с одним или несколькими щелочными соединениями. Щелочные соединения могут быть выбраны, например, из гидроксида натрия, карбоната натрия, гидрокарбоната натрия, силиката натрия, ортосиликата натрия и их комбинаций.

15 В некоторых вариантах осуществления способ также может включать применение композиции на основе микроорганизмов с одним или несколькими полимерными соединениями. Полимерные соединения могут быть выбраны, например, из гидрогелей, акриловой кислоты, акриламида, полиакриламида, гидролизованного полиакриламида (НРАМ), полисахарида, ксантановой камеди, гуаровой камеди и полимеров целлюлозы.

20 В некоторых вариантах осуществления способ также может включать применение композиции на основе микроорганизмов с одним или несколькими ПАВ. ПАВ могут быть, например, анионными, катионными или цвиттерионными.

В одном варианте осуществления способ дополнительно включает стадию кавитации тяжелой нефти либо непосредственно перед, одновременно и/или через некоторое время после 25 применения заявленной композиции на основе микроорганизмов к тяжелой нефти. Кавитация может быть осуществлена с использованием оборудования, известного в данной области техники, например, гидродинамического или ультразвукового способа кавитации.

Используемый в данном документе термин «кавитация» в контексте обработки тяжелой нефти означает образование, рост и разрушение или разрыв пузырьков, заполненных 30 газом или паром, в жидкостях. Кавитация требует наличия небольших и кратковременных микрополостей или микропузырьков пара или газа, которые растут, а затем разрываются или разрушаются. Во время кавитации тяжелой нефти часть жидкости, содержащей тяжелую нефть, находится в форме газа, который диспергирован в виде пузырьков в жидкой части. Указанный процесс эффективно разрушает расположение молекул тяжелых углеводов в 35 нефти (например, асфальтенов, которые могут образовывать высокоассоциативные и когезионные агрегаты), тем самым снижая ее вязкость.

При гидродинамической кавитации жидкость, содержащую тяжелую нефть, пропускают через зону сужения проходного сечения или зону кавитации, такую как, например, капилляр или насадка, для увеличения скорости смеси. Газообразная часть может присутствовать до прохождения жидкости, содержащей тяжелую нефть, через зону кавитации  
5 и/или такая газообразная часть может образовываться в результате падения давления, возникающего в результате пропускания жидкости, содержащей тяжелую нефть, через зону кавитации.

При ультразвуковой кавитации звуковые волны распространяются в жидкости, что приводит к чередованию циклов высокого и низкого давления. Во время цикла низкого  
10 давления ультразвуковые волны высокой интенсивности создают небольшие вакуумные пузырьки или пустоты в жидкости. Когда пузырьки достигают объема, при котором они больше не могут поглощать энергию, они резко разрушаются во время цикла высокого давления.

Стадия кавитации в соответствии с заявленными способами может быть применена к  
15 тяжелой сырой нефти в любой точке во время добычи нефти и транспортной цепи операции для предотвращения или уменьшения осаждения тяжелых углеводородов в неочищенных жидкостях, например, после извлечения из скважины и до помещения в сборный резервуар; во время хранения; после хранения в сборном резервуаре и перед транспортировкой в танкере; во время транспортировки; до процесса переработки и т. д. Оборудование для кавитации может  
20 быть прикреплено к резервуару для хранения, автоцистерне, насосной системе, трубопроводам, трубам и/или любому другому оборудованию, используемому для транспортировки, передачи и/или хранения сырой нефти.

Преимущественно, указанные способы могут увеличить количество превращенных, пригодных для использования и ценных нефтепродуктов, которые могут быть получены из  
25 тяжелой нефти, например, путем снижения БТЕ тяжелой нефти перед переработкой. Другими словами, поскольку нефть обрабатывали перед переработкой, более полезные продукты, такие как мазуты, керосин и дизельное топливо, и, например, меньшее количество нефтяного кокса, могут быть получены с использованием менее сложных процессов переработки, чем если бы нефть оставалась необработанной и высоковязкой. Кроме того, в предпочтительных вариантах  
30 осуществления настоящее изобретение может использоваться без увеличения значения TAN сырой нефти.

В одном варианте осуществления предложены способы добычи нефти из нефтеносных песков. Нефтеносные пески, битуминозные пески или битумные пески представляют собой тип нефтяных месторождений, включающих либо рыхлые пески, либо частично цементированные  
35 песчаники. Они могут содержать смесь песка, глины и воды и, как правило, насыщены густой, высоковязкой нефтью известной как битум (или гудрон). Для извлечения нефти из нефтеносных песков можно применять композицию на основе микроорганизмов к

нефтеносным пескам, повышая смачиваемость песков и позволяя отделить нефть от песков. Необязательно, теплообменники или другой источник тепла могут быть использованы для нагрева в указанном процессе.

Согласно указанному способу, пески и другие твердые частицы, присутствующие в смеси, оседают на дно смеси, а нефть и другие композиционные жидкости могут подаваться по трубопроводу, например, в резервуар для хранения, где они могут быть в дальнейшем отделены от друг друга. В одном варианте осуществления нефтеносные пески подвергают обработке кавитацией. В дополнительном варианте осуществления нефть, которая была отделена от нефтеносных песков, подвергают обработке кавитацией.

В одном варианте осуществления вязкость нефти, извлеченной из нефтеносных песков, может быть уменьшена в соответствии со способами по настоящему изобретению, то есть путем применения заявленных композиций на основе микроорганизмов к нефти, необязательно с последующим подверганием нефти кавитации.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложены способы производства био-ПАВ путем культивирования штамма микроорганизма согласно настоящему изобретению в условиях, подходящих для роста и продуцирования ПАВ, и очистки ПАВ.

Био-ПАВ микроорганизмов вырабатываются различными микроорганизмами, такими как бактерии, грибы и дрожжи. Иллюстративные микроорганизмы, продуцирующие био-ПАВ, включают виды *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. syringae*); *Pseudozyma* (*P. aphidis*); *Flavobacterium* spp.; *Pichia* spp. (*P. anomala*, *P. lynferdii*, *P. guilliermondii*, *P. sydowiorum*), *Bacillus* spp. (*B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumillus*, *B. cereus*, *B. licheniformis*); *Wickerhamomyces* spp. (*W. anomalus*), *Starmerella* spp. (*S. bombicola*), *Candida* spp. (*C. albicans*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *C. lipolytica*, *C. torulopsis*); *Rhodococcus* spp.; *Arthrobacter* spp.; *Campylobacter* spp.; *Cornybacterium* spp. и так далее. Био-ПАВ могут быть получены известными в данной области техники способами ферментации.

Безопасные, эффективные био-ПАВ микроорганизмов снижают поверхностное и межфазное натяжение между молекулами жидкостей, твердых веществ и газов. Как обсуждалось в настоящем документе, указанная активность может быть очень выгодной в контексте добычи нефти.

Био-ПАВ являются биоразлагаемыми и могут легко и дешево производиться с использованием выбранных организмов на возобновляемых субстратах. Большинство организмов, продуцирующих био-ПАВ, продуцируют био-ПАВ в ответ на присутствие источника углеводов (например, масел, сахара, глицерина и т. д.) в ростовой среде. Другие компоненты среды, такие как концентрация железа, также могут значительно влиять на продукцию био-ПАВ.

Био-ПАВ, согласно настоящему изобретению, включают, например, низкомолекулярные гликолипиды (GL), липопептиды (LP), флаволипиды (FL), фосфолипиды и

высокомолекулярные полимеры, такие как липопротеины, липополисахарид-белковые комплексы и комплексы полисахарид-белок-жирная кислота.

В одном варианте осуществления микробный био-ПАВ представляет собой гликолипид, такой как рамнолипид, софоролипиды (SLP), трегалозный липид или липид маннозилеритрита (MEL).

В одном варианте осуществления био-ПАВ микроорганизма представляет собой сурфактин.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложены способы улучшения транспортировки тяжелой сырой нефти, включающие контактирование нефти с композицией на основе микроорганизмов и необязательными питательными веществами и/или другими агентами. Когда вязкость тяжелой нефти снижается, тяжелую нефть можно легко транспортировать по трубопроводу, не требуя транспортировки в резервуарах для хранения грузовиками.

## 15 Дальнейшие определения

Переходный термин «содержащий», который является синонимом слова «включающий» или «вмещающий», является включающим или открытым, и не исключает дополнительных неучтенных элементов или стадий способа. Напротив, переходная фраза «состоящий из» исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не указанные в формуле изобретения. Переходная фраза «состоящий по существу из» ограничивает объем формулы изобретения указанными материалами или стадиями «и теми, которые не оказывают существенного влияния на основную и новую характеристику (и)» заявленного изобретения.

Если специально не указано или не очевидно из контекста, используемый в данном документе термин «или» понимается как включающий. Если специально не указано или не очевидно из контекста, используемые в данном документе термины в единственном числе также подразумевают и множественное число.

Если специально не указано или не очевидно из контекста, используемый в данном документе термин «примерно» понимают, как находящийся в диапазоне нормальных допусков в данной области техники, например, в пределах 2 стандартных отклонений от среднего значения. Термин «примерно» можно понимать, как находящийся в пределах 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 %, 0,05 % или 0,01 % от указанного значения. Если иное не ясно из контекста, все числовые значения, приведенные в данном документе, дополнены термином «примерно».

Изложение перечня химических групп в любом определении переменной в данном документе включает определения этой переменной как любой отдельной группы или комбинации указанных в перечне групп. Изложение варианта осуществления для переменной или аспекта в данном документе включает этот вариант осуществления в качестве любого

отдельного варианта осуществления или в сочетании с любыми другими вариантами осуществления или их частями.

Любые композиции или способы, представленные в настоящем документе, можно комбинировать с одной или несколькими любыми другими композициями и способами, представленными в настоящем документе.

Другие признаки и преимущества данного изобретения будут очевидны из последующего описания его предпочтительных вариантов осуществления и из формулы изобретения. Все ссылки, цитируемые в данном документе, включены в него посредством ссылки.

10

### ПРИМЕРЫ

Более глубокое понимание настоящего изобретения и его многочисленных преимуществ можно получить из следующих примеров, приведенных в качестве иллюстрации. Следующие примеры иллюстрируют некоторые способы, применения, варианты осуществления и варианты настоящего изобретения. Они, конечно, не должны рассматриваться как ограничивающие изобретение. Многочисленные изменения и модификации могут быть сделаны в отношении изобретения.

15

#### ПРИМЕР 1 – ПОЛУЧЕНИЕ *BACILLUS SUBTILIS*

Ферментацию *Bacillus subtilis var. locuses* можно проводить в реакторе объемом 500 л с 350 л питательной среды, содержащей:

20

Глюкоза	18 г/л
Порошковая меласса	2 г/л
Сахароза	1 г/л
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,5 г/л
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,1 г/л
KCl	0,1 г/л
$\text{MgSO}_4$	0,5 г/л
$\text{CaCl}_2$	0,05 г/л
Мочевина	2,5 г/л
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1,24 г/л
Дрожжевой экстракт	2 г/л
Кукурузный пептон	0,5 г/л
Микроэлементы TekNova	1 мл

Культивирование можно проводить при 40 °С, со стабилизацией pH от 6,8 до 7,0 и стабилизацией растворенного кислорода (DO) на уровне 16,8 % (концентрация кислорода в

воздухе принимается за 100 %) при давлении в свободном пространстве около 11 фунт/кв. дюйм. Продолжительность культивирования составляет 24-32 часа. Конечная концентрация бактериальной культуры не менее  $1 \times 10^9$  КОЕ/мл. Конечная концентрация сурфактина составляет от 0,5 до 3 г/л.

- 5            Количество культуры, произведенной за один цикл ферментации, позволяет получить более 2000 баррелей конечного состава для обработки, содержащего  $10^6$  КОЕ указанного штамма *Bacillus*.

## 10 ПРИМЕР 2 – ФЕРМЕНТАЦИЯ ДРОЖЖЕЙ *WICKERHAMOMYCES* ИЛИ *PICHIA* ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА СОФОРОЛИПИДОВ В РЕАКТОРЕ ОБЪЕМОМ 450 Л

Используется передвижной аэролифтный реактор, управляемый ПЛК, оснащенный блоком фильтрации воды, блоком контроля температуры и компрессором для достаточной аэрации. Процесс может осуществляться как периодический процесс культивирования. Реактор имеет рабочий объем 400 л при выращивании *Pichia* (например, *Pichia anomala*) для  
15 производства SLP.

В предпочтительных вариантах осуществления питательными веществами для производства SLP являются глюкоза, мочевины, дрожжевой экстракт, масло канолы, сульфат магния и фосфат калия.

Для инокуляции этого реактора требуется до 5 % жидкой посевной культуры от  
20 рабочего объема. Продолжительность цикла культивирования составляет 7 дней, при температуре 25 °C и pH 3,5, при этом отбор проб производится два раза в день.

Конечная концентрация SLP составляет примерно 20-25 % от рабочего объема, в этом случае образуется более 90 л продукта.

## 25 ПРИМЕР 3 - ФЕРМЕНТАЦИЯ ДРОЖЖАМИ *PICHIA* ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОМАССЫ И БЕЛКА ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ОРГАНИЗМОВ В РЕАКТОРЕ ОБЪЕМОМ 900 Л

Используется переносной реактор, разделенный на два резервуара, управляемых центральным аерлифтом, чтобы помочь смешать содержимое двух резервуаров одновременно. Реактор имеет рабочий объем 600 л при выращивании дрожжей *Pichia* (например, *Pichia*  
30 *anomala*) для производства биомассы.

В предпочтительном варианте осуществления питательные вещества для производства биомассы представляют собой глюкозу или сахар для выпечки, мочевины, дрожжевой экстракт, сульфат магния и фосфат калия.

Реактор инокулируют 2 % посевной культуры. Ферментация продолжается в течение  
35 48-72 часов без стабилизации pH и при температуре от 26 до 32 °C.

Конечная концентрация клеток будет 100 г сырой массы на литр. Концентрация влажной биомассы может достигать 90 кг за цикл при концентрации белка до 45 кг.

#### ПРИМЕР 4 – ФЕРМЕНТАЦИЯ ДРОЖЖАМИ *PICNIA* ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОМАССЫ И БЕЛКА ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ОРГАНИЗМОВ В РЕАКТОРЕ ОБЪЕМОМ 2000 Л

Используется переносной реактор, разделенный на 2 квадратных резервуара с двумя петлями для массообмена между ними. Реактор имеет рабочий объем 2000 л при выращивании дрожжей *Pichia* (например, *Pichia anomala*) для производства биомассы.

В предпочтительном варианте осуществления питательные вещества для производства биомассы представляют собой глюкозу или сахар для выпечки, мочевины, дрожжевой экстракт, сульфат магния и фосфат калия.

Реактор инокулируют 2 % посевной культуры. Ферментация продолжается в течение 48-72 часов без стабилизации pH и при температуре от 26 до 32 °C.

Конечная концентрация клеток будет 100 г сырой массы на литр. Концентрация влажной биомассы может достигать до 200 кг за цикл при концентрации белка до 100 кг.

#### ПРИМЕР 5 – ФЕРМЕНТАЦИЯ *STARMERELLA BOMBICOLA* ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОПАВ В ПЕРЕНОСНОМ РЕАКТОРЕ ОБЪЕМОМ 14 ЛИТРОВ

Указанный реактор представляет собой автоклавируемую стеклянную емкость с рубашкой и с воздушным распылителем и турбинной мешалкой. Он оснащен датчиком растворенного кислорода, pH, температуры и пены; он имеет встроенную станцию управления с цветным сенсорным интерфейсом, встроенные насосы, регуляторы расхода газа и регуляторы pH/ растворенного кислорода и уровня пены.

Рабочий объем реактора составляет 10 литров.

Питательная среда содержит глюкозу, дрожжевой экстракт, мочевины и растительное масло. Инокулят может быть 1-2-дневной культурой *Starmarella bombicola* примерно 5-10 % от общего объема культуры. Продолжительность культивирования и отбор готового продукта продолжается 5-14 дней. Конечное производство софоролипидов может достигать 1-2 кг за цикл.

#### ПРИМЕР 6 – ФЕРМЕНТАЦИЯ *STARMERELLA BOMBICOLA* ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОПАВ В РЕАКТОРЕ С РАБОЧИМ ОБЪЕМОМ 2100 Л

Полностью закрытый реактор аэролифтного типа из нержавеющей стали, работающий от ПЛК, оснащен блоком фильтрации воды, блоком контроля температуры и турбинной мешалкой. Реактор имеет рабочий объем 2100 л при выращивании *S. bombicola* для производства SLP.

В предпочтительных вариантах осуществления питательная среда для производства SLP содержит глюкозу, мочевины, дрожжевой экстракт и масло канолы.

Реактор инокулируют 10 литрами жидкой культуры, получаемой отдельно в небольших реакторах. Продолжительность цикла культивирования для производства SLP составляет 5 дней при 25 °С и начальном рН 5,5. Затем рН снижают до 3,5 во время процесса ферментации.

Каждый цикл ферментации производит примерно 70-75 галлонов SLP с концентрацией SLP 300-400 г/л конечного продукта.

#### ПРИМЕР 7 – ФЕРМЕНТАЦИЯ *STARMERELLA BOMBICOLA* ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОПАВ В РЕАКТОРАХ ОБЪЕМОМ 100, 110 И 500 ЛИТРОВ

Ферментер представляет собой автоклавируемую емкость из нержавеющей стали в рубашке с воздушным распылителем и турбинной мешалкой. Он оснащен датчиком растворенного кислорода, рН, температуры и пены; он имеет встроенную станцию управления с цветным сенсорным интерфейсом, встроенные насосы, регуляторы расхода газа и регуляторы рН/ растворенного кислорода и уровня пены. Рабочий объем 500-литрового реактора составляет 350 литров. Рабочий объем 110-литрового реактора составляет 90 литров. Рабочий объем 100-литрового реактора составляет 60 литров.

Питательная среда содержала глюкозу, дрожжевой экстракт, мочевины и растительное масло. Инокулят представлял собой 1-2-дневную культуру *Starmerella bombicola*, приготовленную с использованием 100-литрового ферментера (5-10 % об./об. инокулята). Продолжительность культивирования и отбор готового продукта продолжается 5-14 дней при 25-30 °С и рН 3,5. Конечный уровень софоролипида может достигать 40 % рабочего объема за цикл. Уровень SLP содержит от 300 до 500 г/л SLP.

#### ПРИМЕР 8 – ФЕРМЕНТАЦИЯ *PSEUDOZYMA APHIDIS* ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ЛИПИДА МАННОЗИЛЭРИТРИТА (MEL) В ПЕРЕНОСНОМ РЕАКТОРЕ ОБЪЕМОМ 14 Л, ПОДЛЕЖАЩЕМ ПЕРЕНОСУ

Указанный реактор представляет собой стеклянную емкость с автоклавируемой паровой рубашкой с воздушным выбросом и турбинной мешалкой Раштона. Он оснащен датчиком растворенного кислорода, рН, температуры и пены. Он имеет встроенную контрольную станцию с цветным сенсорным интерфейсом, встроенные насосы, регуляторы расхода газа и регуляторы рН/растворенного кислорода и уровня пены. Рабочий объем реактора составляет 10 литров.

Состав питательной среды: Нитрат натрия, фосфат калия, сульфат магния, дрожжевой экстракт и растительное масло. Инокулят может представлять собой 1-2-дневную культуру *Pseudozyma aphidis* в количестве примерно 5-10 % от общего объема культуры. Продолжительность культивирования и отбора образцов: 9-15 дней. Конечное производство MEL: 800 -1000 граммов.

## ПРИМЕР 9 – ОБЩИЙ ПРОТОКОЛ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ СНИЖЕНИЯ ВЯЗКОСТИ НА ЛАБОРАТОРНОЙ УСТАНОВКЕ

Образец неомогенной сырой нефти отбирали из ведра с исходным материалом ложкой, ковшом или выливали в герметичный контейнер для транспортировки. Образец  
5 наливали в мерный стакан и затем, если нефть имела большие видимые частицы, ее гомогенизировали с использованием ручного смесителя в течение 30 секунд, пока образец не становился визуально однородным.

Затем 100 мл образца нефти пипеткой переносили в стеклянную колбу с устойчивым к растворителям герметизирующим колпачком. Затем в колбу добавляли 100 мл средства  
10 обработки для снижения вязкости (создавая соотношение нефти к средству обработки 1:1). Горлышко колбы обматывали PTFE/тефлоновой лентой, и крышка была надежно закреплена на колбе для уменьшения потери легких летучих веществ. Затем колбу помещали на круговую качалку. При необходимости колбу можно завернуть в абсорбирующие прокладки перед тем, как закрепить на качалке.

Колбу со смесью перемешивали при 70 об./мин в течение ночи или  $18 \pm 4$  ч при  
15 контролируемой температуре 30-40 °C. После перемешивания образец оставляли под действием силы тяжести в течение 30-60 минут. Если разделение силой тяжести не являлось достаточным или являлось слишком медленным, образец можно центрифугировать при 8000 об./мин в течение 30 минут.

Сначала удаляли водный слой, чтобы обеспечить сбор безводного слоя нефти. Затем  
20 слой нефти повторно гомогенизировали, используя ручной смеситель, и собирали для тестирования вязкости. Вязкость тестировали при желаемой температуре с использованием ротационного вискозиметра следуя стандартным процедурам для вискозиметра.

## 25 ПРИМЕР 10 – СНИЖЕНИЕ ВЯЗКОСТИ НЕФТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОДУКТОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *STARMERELLA BOMBICOLA*

В нашем исследовании использовалась сверхтяжелая нефть (полутвердая) плотностью по API -3,7° и вязкостью 24000 сП. Тяжелая нефть содержит до 50 % твердого парафина.

Для изучения обработки тяжелой нефти 120 мл тяжелой сырой нефти смешивали с 120  
30 мл ферментационной культуры *S. bombicola* в колбе объемом 1 л. Система контроля воды содержала 120 мл тяжелой сырой нефти и 120 мл воды. Колбы инкубировали на качалке при 30 °C со скоростью перемешивания 200 об./мин в течение 1 дня. После обработок колбы снимали с качалки и затем центрифугировали при 8000 об./мин в течение 10 минут, чтобы смесь воды и нефти разделилась на три фракции. Легкая фракция нефти находилась в верхнем слое. Тяжелая  
35 фракция нефти в середине и водная фракция на дне пробирки. Две верхние фракции сырой нефти отбирали и перемешивали в термостате при 50 °C в течение 1 дня, чтобы твердые

вещества растворились в нефти. Затем нефть извлекали из термостата и хранили при 21 °С для измерения вязкости нефти и плотности по API.

Показатели вязкости тяжелой нефти и плотности по API контроля воды сравнивали с показателями после 1 дня обработки. Плотность по API увеличилась с  $-3,7^\circ$  до  $7,2^\circ$  после 5 обработки в течение 1 дня. Скорость снижения вязкости была использована для количественного определения изменения вязкости. Было обнаружено, что вязкость тяжелой нефти снизилась с  $24000 \pm 3600$  сП до  $1100 \pm 190$  сП, что составляет 95 % снижения после 1 дня обработки (ФИГ. 2), тогда как вязкость тяжелой нефти из водной системы не показала какого-либо снижения.

10

#### ПРИМЕР 11 – ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЫДЕРЖАННОЙ КУЛЬТУРЫ *STARMERELLA BOMBICOLA* ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ВЯЗКОСТИ

Культуру *Starmarella bombicola* выращивали в биореакторе, контролируемом ПЛК. Температуру и pH контролировали для оптимизации производства био-ПАВ софоролипида. 15 Питательная среда содержала глюкозу, дрожжевой экстракт, мочевины и растительное масло. После четырех дней выращивания софоролипида, превышающему предел растворимости, давали осесть под действием силы тяжести.

Ферментационный бульон после осаждения био-ПАВ выдерживали в течение 7 дней. Культуральный бульон, содержащий продукты метаболизма, приводили в контакт с тяжелой 20 битумной нефтью в течение 24 часов при соотношении 1 часть средства обработки к 10 частям нефти. Оставшуюся эмульгированную воду удаляли и тестировали вязкость.

Снижение вязкости перед удалением воды составило 4 % (от 4882 сСт до 4696 сСт). Удаление оставшейся эмульгированной воды дополнительно снижало вязкость до 57 % (от 4882 сСт до 2121 сСт). Удаление воды само по себе могло снизить вязкость только на 31 %, 25 приписывая 26 % снижения микробиологической обработке. Было обнаружено, что культуры в возрасте 24 часов не снижают вязкость (от 4882 сСт до 5007 сСт).

#### ПРИМЕР 12 – СНИЖЕНИЕ ВЯЗКОСТИ КОЛУМБИЙСКОЙ СЫРОЙ НЕФТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПОЗИЦИИ MEL

30 Образец остаточной колумбийской сырой нефти обрабатывали с использованием обработки MEL. Если сырая нефть была сильно неоднородной с большими видимыми частицами, нефть гомогенизировали с помощью коммерческого ручного смесителя до однородности при комнатной температуре. Часть обработки MEL добавляли в разных количествах. Образец перемешивали вручную при комнатной температуре до тех пор, пока 35 MEL не был достаточно включен в состав. Затем вязкость тестировали при 30 °С в вискозиметре типа Брукфилда.

Исходный образец имел вязкость 149460 сП. Добавление MEL уменьшило вязкость до 29530 сП, затем до 27370 сП. Уменьшение возврата дополнительного MEL от 0,4 % до 0,5 % может указывать на распад мицелл асфальтенов. Эта обработка была успешной в снижении вязкости указанного образца на 64 % (ФИГ. 3).

5

#### ПРИМЕР 13 – СНИЖЕНИЕ ВЯЗКОСТИ МАЗУТА И БИТУМНОЙ НЕФТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПОЗИЦИИ MEL

Образцы мазута и битумной нефти обрабатывали обработкой MEL. Если нефть была сильно неоднородной с большими видимыми частицами, нефть гомогенизировали с помощью коммерческого ручного смесителя до однородности при комнатной температуре. Часть обработки MEL добавляли в разных количествах. Каждый образец перемешивали вручную при комнатной температуре до тех пор, пока MEL не был достаточно включен в состав. Затем вязкость тестировали при 30 °С в вискозиметре типа Брукфилда.

Исходный образец мазута имел вязкость 1234 сП. Было проведено три повторения обработки 5 % MEL. Каждый повтор обработки приводил к снижению вязкости на 24 % (Повтор 1: вязкость снижена до 944 сП; Повтор 2: вязкость снижена до 943 сП; Повтор 3: вязкость снижена до 939 сП).

Исходный образец битумной нефти имел вязкость 4882 сП. Было проведено два повторения обработки 5 % MEL. Каждый повтор обработки приводил к снижению вязкости на 48 % (Повтор 1: вязкость снижена до 2528 сП; Повтор 2: вязкость снижена до 2533 сП).

#### ПРИМЕР 14 – ОБРАБОТКА *PICHTIA ANOMALA* И ПЕРЕМЕШИВАНИЕМ НА КАЧАЛКЕ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ВЯЗКОСТИ

Неоднородную сырую нефть смешивали с культурой *Pichia anomala*, выращенной с 6 % маслом канолы и, необязательно, с индукторами на основе нефти, состоящими из 15 % парафина и 15 % битума на основе масла канолы. Индукторы добавляли в количестве 0,5 % (об./об.). Культуру смешивали 1:1 с сырой нефтью. Смеси помещали на круговую качалку. Температуру поддерживали на уровне 40 °С во время перемешивали в течение 18 ± 4 часов. Вязкость тестировали при 30 °С

Сырая нефть, перемешиваемая при 70 об/мин и 40 °С с индуцированными углеводородами культурами, выращенными в течение 3 дней, показывала снижение вязкости на 70 ± 13 %. Сырая нефть, перемешиваемая при 100 об/мин и 40 °С с культурами, выращенными в течение 3 дней, имела снижение вязкости на 27 ± 1 % независимо от индукторов.

35

## ПРИМЕР 15 – ИСПЫТАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФРАКЦИЙ КУЛЬТУРЫ *PICHIA ANOMALA* ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ВЯЗКОСТИ

Образец остаточной сырой нефти обрабатывали фракциями обработки культуры *Pichia anomala*. Если сырая нефть была сильно неоднородной с большими видимыми частицами, нефть гомогенизировали с помощью коммерческого ручного смесителя до однородности при комнатной температуре. Неоднородную сырую нефть приводили в контакт с культурой *Pichia anomala*, выращенной с 6 % маслом канолы и индукторами на основе нефти, состоящими из 15 % парафина и 15 % битума на основе масла канолы. Индукторы добавляли в количестве 0,5 % (об./об.).

10            Различные фракции культуры (перечисленные ниже в таблице 1) также приводили в контакт с сырой нефтью, чтобы обеспечить их индивидуальный вклад в снижение вязкости. Культуру или эквивалентную фракцию культуры смешивали 1:1 (100 мл : 100 мл) с сырой нефтью.

15            Образцы перемешивали в течение ночи при 70 об/мин при температуре 30 °С. Вязкость тестировали при 30 °С. Снижение вязкости отмечалось во всех случаях, при этом вся культура оказывала наиболее выраженный эффект.

Таблица 1. Фракции *Pichia anomala* и % снижения вязкости сырой нефти

Исследуемый компонент	сП	% снижения
Гомогенизированная сырая нефть	65350	
Вся культура	4990	92 %
Супернатант и фракция нефти	6270	90 %
Только клетки	23740	64 %
Лизированные клетки*	17400	73 %

\* 100 мл клеток суспендировали в 50 мл культуры и нагревали в 0,1 молярном растворе гидроксида натрия при 98 °С в течение 20 минут.

## ПРИМЕР 16 – СРАВНЕНИЕ СНИЖЕНИЯ ВЯЗКОСТИ ДЛЯ РАЗЛИЧНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ *PICHIA*

20            Разные штаммы дрожжей *Pichia* тестировали на их способность снижать вязкость сырой нефти. Культуры выращивали в течение 3 дней при 30 °С на круговой качалке с 6 % маслом канолы и 0,5 % (об./об.) индуктора, состоящего из 15 % парафина и 15% битума на основе масла канолы.

Все тесты проводили при соотношении 1:1. При необходимости, сырую нефть гомогенизировали с помощью ручного смесителя до однородного состояния. Образцы осторожно перемешивали при 30 °С в закрытой стеклянной бутылке при 70 об/мин в течение ночи. После разделения фракции нефти и водной фракции вязкость нефти тестировали при 30 °С. Как указано в Таблице 2, большинство культур *Pichia* снижало вязкость гомогенизированной сырой нефти. *P. occidentalis* была единственной культурой, которая показала повышение вязкости.

Таблица 2. % снижения вязкости сырой нефти с использованием различных обработок *Pichia*.

Исследуемые условия	сП	% снижения
Гомогенизированная сырая нефть	149460	
<i>Pichia lynferdii</i>	57900	61 %
<i>Pichia guillermundii</i>	7462	95 %
<i>Pichia sydowiorum</i>	49120	67 %
<i>Pichia anomala</i>	52630	65 %
* <i>Pichia occidentalis</i>	> 400 000	(повышение)

## ССЫЛКИ

PetroWiki. *Heavy Oil*. SPE International; [updated 19 Jan., 2016; accessed 7 Feb. 2017].  
[http://petrowiki.org/Heavy\\_oil#cite\\_note-r1-1](http://petrowiki.org/Heavy_oil#cite_note-r1-1). (“Heavy Oil” 2016).

5

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для снижения вязкости нефти, отличающаяся тем, что композиция содержит микроорганизм, продуцирующий био-ПАВ, и/или один или несколько био-ПАВ, продуцируемых микроорганизмом.
2. Композиция по п. 1, где микроорганизм представляет собой дрожжи *Pichia*, выбранные из одного или нескольких *Pichia anomala*, *Pichia sydowiorum*, *Pichia guilliermondii* и *Pichia lynferdii*.
3. Композиция по п. 2, в которой дрожжи выбраны из *Pichia anomala* и *Pichia guilliermondii*.
4. Композиция по п. 1, в которой микроорганизм представляет собой *Starmerella bombicola*.
5. Композиция по п. 1, в которой микроорганизм представляет собой *Pseudozyma aphidis*.
6. Композиция по п. 1, где микроорганизм представляет собой штамм *Bacillus subtilis*.
7. Композиция по п. 1, в которой один или несколько био-ПАВ представляют собой гликолипиды, выбранные из софоролипидов (SLP), рамнолипидов (RLP) и липидов маннозилеритритолола (MEL).
8. Композиция по п. 1, где композиция на основе микроорганизмов содержит культуру микроорганизмов, которая была выдержана в течение 24 часов или дольше.
9. Композиция по п. 1, дополнительно содержащая сурфактин.
10. Композиция по п. 1, содержащая один или несколько био-ПАВ без микроорганизма.
11. Способ снижения вязкости нефти, включающий контактирование композиции по пп. 1-10 с нефтью.
12. Способ по п. 11, в котором стадия контактирования композиции включает введение композиции в ствол скважины, отводную линию или резервуар с нефтью.

13. Способ по п. 11, дополнительно включающий введение питательных веществ для роста микроорганизмов.

14. Способ по п. 13, в котором питательные вещества включают азот, нитрат, фосфор, магний и/или углерод.

15. Способ по п. 11, используемый для улучшения передачи нефти через трубопровод, резервуар, обсадную колонну, насосно-компрессорную трубу, стержень, насос и/или ствол скважины на нефтепромысле.

16. Способ по п. 11, используемый для превращения тяжелой битумной части сырой нефти в соединения с более низкой молекулярной массой.

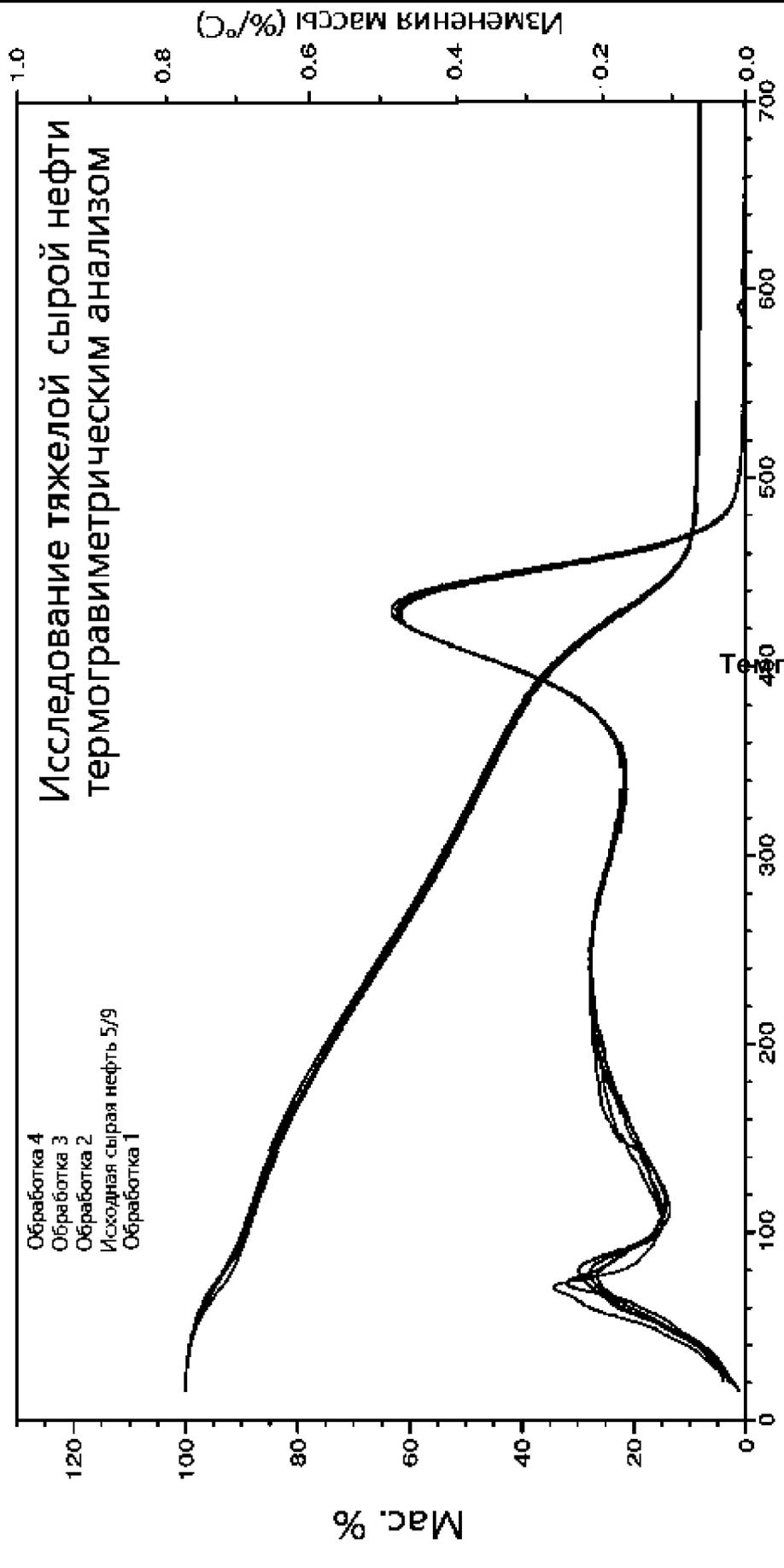
17. Способ по п. 11, в котором композицию производят на месте на расстоянии не более 50 миль от участка, на котором она используется.

18. Способ по п. 11, дополнительно включающий этап, на котором нефть подвергают кавитации.

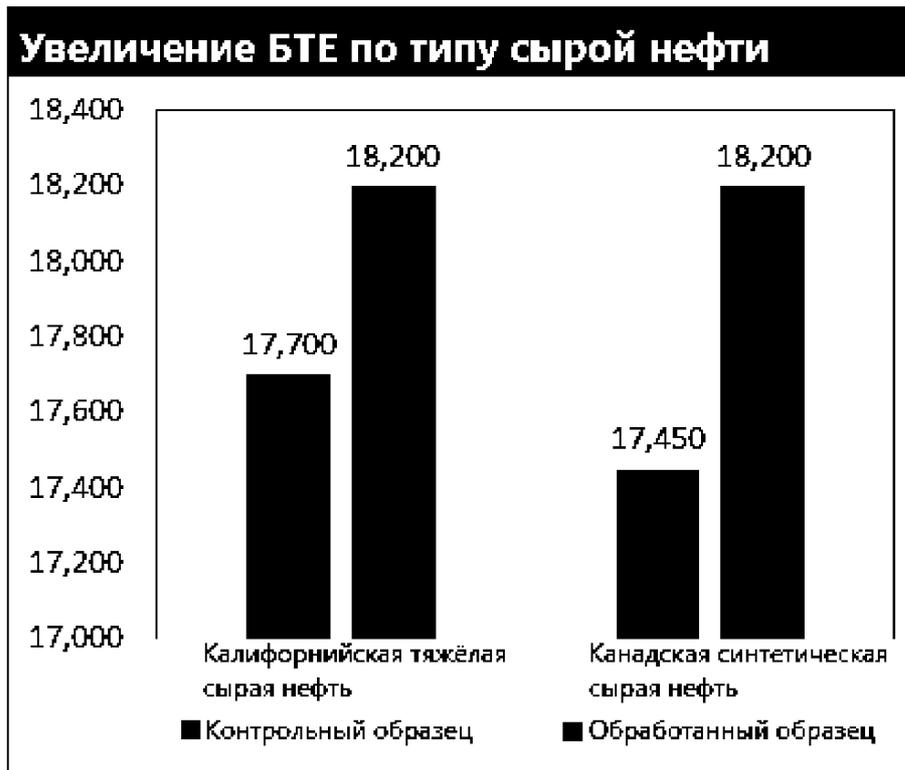
19. Способ добычи нефти из нефтеносных песков, включающий применение композиции по пп. 1-8 к нефтеносным пескам, отделение нефти от песков и выкачивание нефти.

20. Способ по п. 19, который дополнительно включает снижение вязкости нефти, добытой путем применения композиции по пп. 1-10 к нефти, и, необязательно, подвергание нефти кавитации.

**Без потери углеводородов (сохраняя стоимость)**



ИГ. 1А

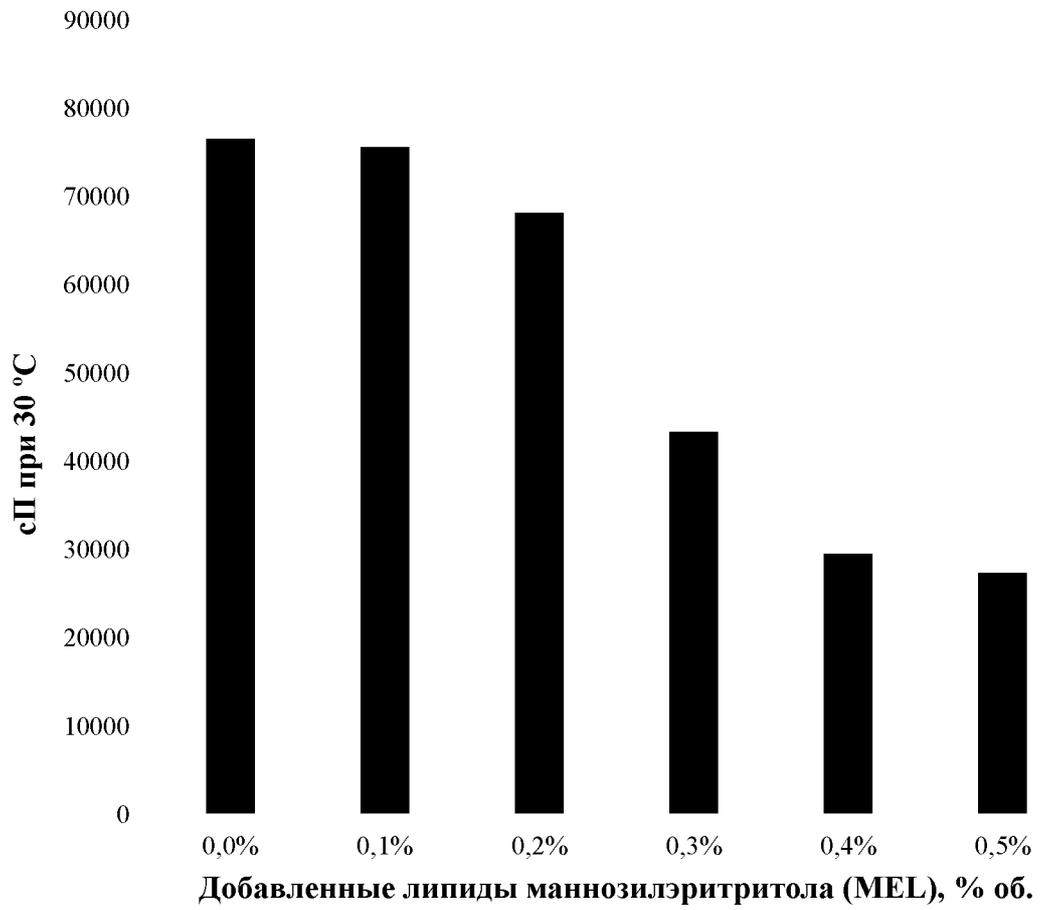


ФИГ. 1Б

Парафинистая тяжёлая	Естественная	Обработанная	% Повышения
API	-3.7	7.2	<b>295%</b> повышения
Вязкость	24,000 сП	1,100 сП	<b>95%</b> снижения

Канадская синтетическая сырая нефть	Естественная	Обработанная	% Изменений
API	16.2	32.08	<b>100%</b> повышения
Вязкость	455 сП	43 сП	<b>91%</b> снижения

ФИГ. 2



ФИГ. 3