

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201991869** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2020.02.19

(51) Int. Cl. *C10G 75/02* (2006.01)  
*C10G 75/04* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.02.08

**(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ УРОВНЯ СЕРОВОДОРОДА И КОРРОЗИИ, ВЫЗВАННОЙ МИКРООРГАНИЗМАМИ, В СЫРОЙ НЕФТИ, ПРИРОДНОМ ГАЗЕ И В СОПУТСТВУЮЩЕМ ОБОРУДОВАНИИ**

(31) 62/456,979; 62/463,864; 62/507,904;  
62/528,731

(32) 2017.02.09; 2017.02.27; 2017.05.18;  
2017.07.05

(33) US

(86) PCT/US2018/017408

(87) WO 2018/148397 2018.08.16

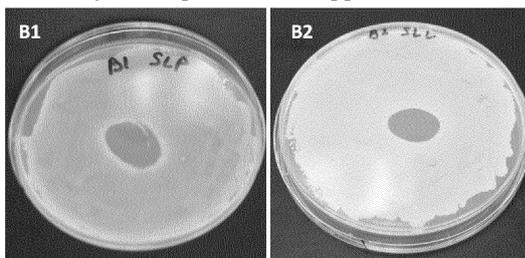
(88) 2018.11.01

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

(72) Изобретатель:  
Фармер Шон, Алибек Кен, Каратур  
Картик Н., Неррис Энтони, Шумвай  
Мартин Р., Кэллоу Николас,  
Макгонагл Райан, Креагер Дон, Чен  
Яцзе (US)

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

(57) В настоящем изобретении предложены композиции и способы для снижения уровня сероводорода и/или меркаптанов в нефти и/или природном газе, а также для снижения коррозии, вызванной микроорганизмами ("MIC"), в средах добычи нефти и газа. В частности, в заявленном изобретении предложены экологически чистые композиции и способы для снижения уровня сероводорода в средах нефти и природного газа путем борьбы с биокоррозионными бактериями, такими как SRB.



**A1**

**201991869**

**201991869**

**A1**

## КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ УРОВНЯ СЕРОВОДОРОДА И КОРРОЗИИ, ВЫЗВАННОЙ МИКРООРГАНИЗМАМИ, В СЫРОЙ НЕФТИ, ПРИРОДНОМ ГАЗЕ И В СОПУТСТВУЮЩЕМ ОБОРУДОВАНИИ

### 5 ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка испрашивает приоритет следующих предварительных заявок США: № 62456979, поданной 9 февраля 2017 года; № 62463864, поданной 27 февраля 2017 года, № 62507904, поданной 18 мая 2017 года и № 62528731, поданной 5 июля 2017 года, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки в  
10 полном объеме.

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Углеводородные композиции являются критически важными ресурсами для производства топлива, смазочных материалов, пластмасс и множества других  
15 продуктов. Из-за высокого спроса на углеводородные композиции безопасность и эффективность их производства и транспортировки имеют важное значение. Одним из основных факторов, влияющих на безопасность и эффективность добычи нефти и природного газа, является наличие сероводорода ( $H_2S$ ). Газ  $H_2S$  естественно содержится в нефти и природном газе в небольших количествах, однако, когда уровни  
20  $H_2S$  становятся высокими, нефть или газ становятся, как говорится, «кислыми».

Сероводород является проблемой в нефтегазовой промышленности по ряду причин. Например,  $H_2S$  может стать загрязнителем воздуха вблизи нефтеперерабатывающих заводов и в районах добычи нефти и газа. Выбросы  $H_2S$  в атмосферу представляют серьезную проблему для общественного здравоохранения.  
25  $H_2S$  чрезвычайно токсичен. Воздействие концентраций выше 100 ч/млн может привести к повреждению внутренних органов, а воздействие концентраций свыше 600 ч/млн может быть смертельным.

Другая группа серосодержащих соединений может присутствовать на нефтяных и газовых месторождениях. Эти серосодержащие соединения, известные как  
30 меркаптаны, содержат сульфгидрильную группу, связанную с углеродом, и находятся во многих углеводородных потоках, главным образом в виде примеси. Они похожи на спирты, но с атомом серы (S), замещающим атом кислорода. Некоторые меркаптаны имеют сильный запах и могут вызвать серьезные нарушения в повседневной жизни. Люди очень чувствительны к меркаптанам при очень низких уровнях. По этой причине

меркаптаны используются в качестве одорантов в потребительском и коммерческом природном газе для сигнализации об утечках газа. Некоторые меркаптаны могут вызывать коррозию и часто приводят к неудачным испытаниям медной пластинкой при определенных условиях. Меркаптаны также могут отрицательно влиять на катализ и твердые адсорбционные слои, такие как силикагель или оксид алюминия, конкурируя за доступ к одним и тем же активным центрам. Удаление меркаптана необходимо для сокращения выбросов серы, поскольку сжигание и выбросы меркаптансодержащих соединений приведут к образованию SO<sub>x</sub>.

Помимо непосредственных проблем со здоровьем, H<sub>2</sub>S и меркаптаны вызывают коррозию оборудования для добычи и транспортировки нефти и газа. Коррозия труб, клапанов, штуцеров и резервуаров может привести к выходу из строя систем сбора нефти и газа, и может представлять серьезную угрозу для работников и населения. Кроме того, ремонт и замена корродированного оборудования может привести к значительным расходам.

Коррозия, которая возникает в результате присутствия микроорганизмов, то есть коррозия, вызванная микроорганизмами (MIC), является значительной проблемой для добычи и транспортировки нефти и газа. Когда поверхности в скважине или других поверхностях подвергаются воздействию естественной среды, они быстро колонизируются бактериями, которые естественным образом присутствуют в окружающей среде, которые, в свою очередь, могут образовывать биопленку. Верхние слои биопленки в основном аэробные, в то время как области под ними могут быть анаэробными из-за истощения кислорода биопленкой.

Некоторые микроорганизмы могут колонизировать эти анаэробные ниши и производить побочные продукты, которые снижают качество сырой нефти и природного газа, вызывают коррозию металлов и представляют значительную угрозу для здоровья и окружающей среды. MIC причастны к ухудшению состояния металлов, например, в трубопроводах и морских нефтяных вышек на шельфе в нефтяной и судоходной отраслях. Также пострадали другие среды, в том числе системы рециркуляции охлаждающей воды в промышленных установках, а также очистные сооружения канализации и трубопроводы.

Микроорганизмы, ответственные за MIC, включают сульфатредуцирующие бактерии («SRB») и кислотообразующие бактерии («APB»). APB производят коррозионно-индуцирующие соединения путем анаэробной ферментации. Эти соединения могут включать органические кислоты, такие как летучие жирные

кислоты, и спирты. В результате производства органической кислоты pH под биопленкой APB может быть значительно ниже, чем у основной жидкости, что способствует разрушению конструкций, на которых растут бактерии.

5 SRB и археи получают энергию путем окисления органических соединений или молекулярного водорода ( $H_2$ ) при восстановлении сульфата ( $SO_4^{2-}$ ) до  $H_2S$ . В каком-то смысле эти организмы «дышат» сульфатом, а не кислородом, в форме анаэробного дыхания. Большинство SRB также могут восстанавливать другие окисленные неорганические соединения серы, такие как сульфит, тиосульфат или элементарную серу, до сероводорода.

10 SRB вносят существенный вклад в повышение концентраций  $H_2S$  и меркаптана в сырой нефти и природном газе, что влияет на качество нефти и газа, а также на безопасность и целостность оборудования для добычи нефти и природного газа. Кроме того, производство  $H_2S$  SRB приводит к прогрессивной коррозии железа в бескислородной богатой сульфатом среде. SRB также могут подвергать коррозии  
15 железо путем непосредственного использования самого металла, что, вероятно, является основным процессом, вызывающим коррозию железа в сульфатсодержащих бескислородных средах.

Кроме того,  $H_2S$ , продуцируемый SRB, метаболизируется сероокисляющими организмами, такими как *Thiobacillus*, в серную кислоту - одну из самых сильных  
20 известных кислот. Разложение серной кислоты может привести к серьезному повреждению труб и другого оборудования, используемого в нефтегазовой промышленности, и, как было установлено, ежегодно вызывает коррозионные повреждения в США на миллиарды долларов.

Предпочтительная стратегия удаления биологической коррозии зависит от того,  
25 какие организмы присутствуют в обрабатываемой среде. Например, восприимчивость архей к противомикробным агентам отличается от восприимчивости протеобактерий. Археи характеризуются, например, своей устойчивостью широкого спектра к противомикробным агентам. В частности, в клеточных стенках архей отсутствует пептидогликан (таким образом, они являются грамотрицательными), что делает их  
30 устойчивыми ко многим противомикробным агентам, которые препятствуют биосинтезу пептидогликана. Однако, археи восприимчивы к противомикробным агентам, которые препятствуют синтезу белка.

С другой стороны, протеобактерии могут иметь различную восприимчивость и/или устойчивость из-за других факторов, таких как, например, типы пептидогликана,

которые они содержат, наличие капсул, образование спор и модификация молекулярных мишеней. Таким образом, в свете этих различий разработка и применение противобактериальной стратегии широкого спектра действия с высокой эффективностью желательны для устранения вызывающих коррозию бактерий и снижения уровня  $H_2S$  в сырой нефти, природном газе и в соляном растворе из ствола скважины.

Традиционные стратегии ингибирования коррозии включают в себя множество стратегий. Они включают изменение pH, окислительно-восстановительного потенциала и/или удельного сопротивления среды, в которой должно быть установлено оборудование, неорганические покрытия, катодную защиту и использование «традиционных» биоцидов. Однако многие из этих стратегий непрактичны при добыче нефти и газа.

Из указанных способов борьбы с биологической коррозией наиболее распространенные способы обычно включают традиционные биоциды. Окисляющие биоциды, такие как хлорирующие соединения, могут быть использованы в некоторых системах, а также неокисляющие биоциды, такие как соединения аминного типа и альдегиды. Неокисляющие биоциды более стабильны и могут использоваться в различных средах. Несмотря на то, что биоциды широко используются, стоимость биоцидов и потенциальный вред, вызванный выбросом большого количества неорганических соединений в окружающую среду, являются значительными.

Альтернативным способом, который стал популярным в последние годы, является обработка нитратами. Нитратная технология основана на избирательном росте нитратредуцирующих бактерий («NRB»), которые замещают вредные SRB и снижают способность SRB к экстенсивному росту. Многие нитратные соединения растворимы в воде, но не растворяются в нефти, не чувствительны к уровню соли и имеют низкую токсичность. Кроме того, нитратные соединения могут полностью потребляться, их активность увеличивается со временем, и они не чувствительны к температуре.

Даже при том, что удельная стоимость нитратов не высока, стоимость обработки в большом масштабе, таком как нефтегазовая установка, может быть чрезвычайно высокой. Кроме того, обработки нитратами имеют и другие недостатки. Например, они могут быть неэффективными для самотёчных трубопроводов и могут повышать уровень азота в сточных водах. Кроме того, результирующий газ  $N_2$  (или остаточный  $NO_3$ ) может вызывать проблемы для водоочистных сооружений; затраты

на способ предотвращения могут быть чрезмерными на линиях с продолжительным временем удерживания, на которые могут влиять высокие уровни БПК; и способ биопосредованного окисления может потребовать нескольких часов, что делает нитраты менее эффективными в определенных применениях.

5 Таким образом, ущерб нефтяной и газовой промышленности, вызванный МПС, в частности ущерб, вызванный  $H_2S$ , остается значительным. Каждый год эти отрасли несут убытки на многие миллиарды долларов из-за воздействия коррозии, необходимости очистки «кислого» природного газа и сырой нефти и осуществления мер по снижению различных экологических опасностей, вызванных  $H_2S$ .

10 Как отмечалось выше, многие биоцидные препараты не являются экологически чистыми и не очень эффективны. Обработки нитратами могут быть более безопасными и эффективными, но они могут сопровождаться значительными затратами.

15 Таким образом, в данной области техники существует потребность в эффективных, экологически чистых и экономически приемлемых средствах для снижения содержания  $H_2S$  и меркаптанов и предотвращения или ингибирования роста SRB в нефтяных и газовых пластах и на поверхностях оборудования, используемого во всех аспектах добычи нефти и газа.

### КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

20 В заявленном изобретении предложены экологически чистые композиции и способы для снижения и/или удаления сероводорода ( $H_2S$ ) и других серосодержащих соединений в нефти и природном газе, с одновременным повышением добычи нефти. В одном варианте осуществления это достигается эффективной борьбой с сульфатвосстанавливающими бактериями (SRB). Композиции и способы также могут  
25 быть использованы для снижения «кислотности» сырой нефти и газа.

В настоящем изобретении также предложены композиции и способы снижения и/или удаления коррозии, вызванной микроорганизмами («МПС»).

Способы и композиции могут быть использованы в нефтегазовой промышленности, сельском хозяйстве, очистке окружающей среды и других отраслях, где рост биопленки и других микроорганизмов вызывает такие осложнения, как, например, производство токсичных побочных продуктов, таких как  $H_2S$  и меркаптаны, коррозию оборудования и снижение качества производимой продукции.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены материалы и способы для улучшения качества нефти и/или газа при

одновременном повышении добычи нефти путем обработки участков бурения композициями, содержащими микроорганизмы и/или их побочные продукты.

В предпочтительных вариантах осуществления первая композиция предназначена для снижения уровня  $H_2S$  и борьбы с биокоррозионными бактериями, присутствующими в средах добычи нефти и природного газа, при одновременном повышении добычи нефти, при этом первая композиция содержит смесь  
5 противомикробного био-ПАВ, хелатирующего агента и один или несколько поглотителей  $H_2S$ .

В некоторых вариантах осуществления смесь противомикробного био-ПАВ содержит один или несколько био-ПАВ. Одно или несколько био-ПАВ могут включать гликолипиды, такие как, например, софоролипиды, рамнолипиды и/или их  
10 комбинации. Преимущественно био-ПАВ можно использовать в относительно низких концентрациях для ингибирования роста бактерий, в частности грамположительных бактерий.

В некоторых вариантах осуществления смесь противомикробного био-ПАВ дополнительно содержит один или несколько липопептидных био-ПАВ, таких как,  
15 например, сурфактин. Использование сурфактина расширяет спектр противомикробной активности для охвата грамотрицательные бактерии.

В некоторых вариантах осуществления первая композиция дополнительно содержит хелатирующий агент. В конкретных вариантах осуществления хелатирующий агент представляет собой ЭДТА.

В некоторых вариантах осуществления первая композиция дополнительно  
20 содержит один или несколько поглотителей  $H_2S$ , способных преобразовывать  $H_2S$  в более инертные формы. Одним или несколькими поглотителями  $H_2S$  могут быть, например, растворы нитратов или нитритов. В конкретных вариантах осуществления поглотители  $H_2S$  выбраны из нитратных или нитритных солей, включая нитрат натрия,  
25 нитрит натрия, нитрат аммония, нитрит аммония, нитрат калия и нитрит калия, но не ограничиваясь ими. В другом варианте осуществления поглотитель  $H_2S$  может включать глиоксаль.

В некоторых вариантах осуществления первая композиция может содержать  
30 одно или несколько природных биологических веществ с известными противомикробными свойствами, особенно против грамотрицательных микроорганизмов. В одном варианте осуществления природное биологическое вещество может содержать низин, противомикробный полипептид, полученный при

культивировании *Lactococcus lactis*. В другом варианте осуществления природное биологическое вещество может содержать цитронеллу (экстракт лемонграсса). Цитронелла может использоваться для подавления как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий, а также некоторых грибов и дрожжей.

5 В одном варианте осуществления вторая композиция предназначена для стабилизации и продления противомикробного и восстанавливающего сероводород эффектов, а также для повышения добычи нефти первой композиции, например, путем предотвращения размножения любого оставшегося SRB.

10 Вторая композиция может содержать микроорганизм, способный победить остаточные SRB в конкурентной борьбе за обычные источники углерода и энергии, тем самым подавляя возобновление роста SRB, и, необязательно, источники питательных веществ для обеспечения эффективного роста культуры микроорганизмов в анаэробных условиях, включая нитриты, нитраты, фосфор, магний, источники белка и/или углерод, но не ограничиваясь ими.

15 Предпочтительно, микроорганизм второй композиции находится в форме споры. Соответственно, в одном варианте осуществления вторая композиция может содержать вещества для усиления прорастания спор, такие как, например, L-аланин и/или марганец.

20 В одном варианте осуществления микроорганизм второй композиции представляет собой спорообразующий штамм бактерий, продуцирующий био-ПАВ. В предпочтительных вариантах осуществления бактерии могут быть введены в виде нитратредуцирующих бактерий («NRB»).

25 В одном варианте осуществления бактерия представляет собой виды из клалды *Bacillus*. В одном варианте осуществления бактерия представляет собой виды из клалды *Pseudomonas*. В предпочтительных вариантах осуществления бактерии второй композиции представляют собой штамм *Bacillus subtilis*. Еще конкретнее, *Bacillus subtilis* может являться штаммами *B. subtilis var. locuses* B1 и/или B2, которые являются эффективными продуцентами липопептидного сурфактина.

30 В одном варианте осуществления бактерии представляют собой штамм *Pseudomonas*, такой как, например, *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* является эффективным продуцентом рамнолипидных био-ПАВ.

В одном варианте осуществления первая и вторая композиции могут быть использованы для ингибирования продукции H<sub>2</sub>S SRB и другими биокоррозионными бактериями при одновременном повышении добычи нефти и/или газа.

Преимущественно композиции могут обладать противомикробными свойствами широкого спектра действия, что означает, что они могут быть использованы для борьбы, например, с грамположительными и грамотрицательными бактериями, а также с другими биокоррозионными микроорганизмами. В одном варианте осуществления биокоррозионные бактерии находятся в форме биопленки.

В одном варианте осуществления первая и вторая композиции могут быть использованы для снижения коррозии и ухудшения состояния металлического оборудования и конструкций, в которых и на которых растут биокоррозионные бактерии, в частности, коррозии и ухудшения состояния оборудования и конструкций, используемых для добычи сырой нефти и природного газа.

В одном варианте осуществления предложен двухфазный способ улучшения добычи нефти и природного газа. В частности, способы могут быть использованы для ингибирования продукции  $H_2S$  SRB и другими биокоррозионными бактериями, а также для снижения «кислотности» сырой нефти и газа, одновременно повышая добычу нефти и газа. Способы также могут быть использованы для снижения преобразования нефти с низким содержанием серы в нефть и газ с высоким содержанием серы, для повышения преобразования нефти и газа с высоким содержанием серы в нефть и газ с низким содержанием серы и/или для сохранения малосерности нефти и газа. Способы также могут быть использованы для снижения уровня  $H_2S$  и меркаптанов в нефти в скважине или вне ее.

В определенных вариантах осуществления двухфазный способ может дополнительно использоваться для снижения и/или удаления коррозии, вызванной микроорганизмами («MIC»), оборудования и конструкций, используемых для добычи сырой нефти и природного газа.

В одном варианте осуществления первая фаза способа включает применение первой композиции по настоящему изобретению к нефтегазосодержащему пласту, например, путем введения первой композиции как можно глубже в ствол скважины, закрытие пласта; откачивание композиции и открытие пласта для возобновления добычи нефти и/или газа.

Предпочтительно первая фаза проводится при непрерывном мониторинге уровня сероводорода в пласте.

В одном варианте осуществления первой фазы стадию закрытия пласта осуществляют до тех пор, пока уровень сероводорода не снизится до желаемой концентрации. Например, период закрытия может длиться от около 3 до около 60 дней

или до тех пор, пока уровни сероводорода не снизятся до концентрации от около 0 ч/млн до около 50 ч/млн, предпочтительно от около 0 ч/млн до около 25 ч/млн.

Первая фаза способа может служить в качестве начальной обработки для (а) борьбы с биокоррозионными бактериями, (б) снижения концентрации  $H_2S$  в пласте и  
5 (в) повышения добычи нефти и газа из пласта.

В одном варианте осуществления вторая фаза способа включает добычу нефти и/или газа из пласта до тех пор, пока не будет наблюдаться увеличение концентрации сероводорода применение второй композиции по настоящему изобретению к пласту, например, путем введения ее как можно глубже в ствол скважины, закрытие пласта и  
10 открытие пласта для возобновления добычи нефти и/или газа.

Предпочтительно вторая фаза проводится при непрерывном мониторинге уровня сероводорода в пласте.

В одном варианте осуществления увеличение концентрации сероводорода, которое наблюдается до применения второй композиции на второй фазе, представляет собой увеличение от около 1 до примерно 50 ч/млн или около до 100 ч/млн, или выше,  
15 выше самой низкой наблюдаемой концентрации. В одном варианте осуществления увеличение концентрации сероводорода, которое наблюдается до применения второй композиции, представляет собой любое увеличение, которое приводит к концентрации сероводорода на уровне от около 50 до около 100 ч/млн или выше.

В одном варианте осуществления второй фазы стадию закрытия пласта осуществляют до тех пор, пока уровень сероводорода не снизится до желаемой концентрации. Например, период закрытия может длиться от около 3 до около 60 дней или до тех пор, пока уровни сероводорода не снизятся до концентрации от около 0  
20 ч/млн до около 50 ч/млн, предпочтительно от около 0 ч/млн до около 25 ч/млн.

Вторая фаза способа может служить для повышения борьбы с биокоррозионными бактериями, снижения концентрации сероводорода и повышения добычи нефти и газа. Вторая фаза также может служить для стабилизации и продления противомикробного и восстанавливающего сероводород действия первой фазы, например, предотвращая размножение любых оставшихся SRB.  
25

В одном варианте осуществления заявленного способа используется только первая фаза без второй фазы. В одном варианте осуществления фаза два используется без предварительной первой фазы.  
30

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 при добыче нефти и газа (и другие отрасли) в качестве «зеленой» обработки.

5

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **ФИГ. 1** показано ингибирование роста *Bacillus subtilis var. locuses* В1 и В2 софоролипидами.

10 На **ФИГ. 2** показана суточная добыча нефти, добыча газа и концентрация  $H_2S$  до и после обработки первой фазой и второй фазой заявленных способов в горизонтальной скважине (Спичли Сэнд, Пенсильвания).

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

15 В заявленном изобретении предложены экологически чистые композиции и способы для снижения и/или удаления сероводорода ( $H_2S$ ) и других серосодержащих соединений в нефти и природном газе, с одновременным повышением добычи нефти. В одном варианте осуществления это достигается эффективной борьбой с сульфатвосстанавливающими бактериями (SRB). Композиции и способы также могут быть использованы для снижения «кислотности» сырой нефти и газа.

В настоящем изобретении также предложены композиции и способы снижения и/или удаления коррозии, вызванной микроорганизмами («MIC»).

Способы и композиции могут быть использованы в нефтегазовой промышленности, сельском хозяйстве, очистке окружающей среды и других отраслях, где рост биопленки и других микроорганизмов вызывает такие осложнения, как, например, производство токсичных побочных продуктов, таких как  $H_2S$  и меркаптаны, коррозию оборудования и снижение качества производимой продукции.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены материалы и способы для улучшения качества нефти и/или газа при одновременном повышении добычи нефти путем обработки участков бурения композициями, содержащими микроорганизмы и/или их побочные продукты.

### **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 субстратом, 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 пропадаула 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» в контексте ферментации микроорганизмами относится к удалению части или всей композиции на основе микроорганизмов из емкости для выращивания.

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 ПАВ. Например, бактерии могут продуцировать по меньшей мере 10 %, 25 %, 50 %, 100 %, в 2 раза, 5 раз, 7,5 раз, 10 раз, 12 раз, 15 раз или больше ПАВ по сравнению с другими штаммами микроорганизмов для добычи нефти. Конкретно, *Bacillus subtilis* ATCC 39307 используется в настоящем документе в качестве эталонного штамма.

Используемый в данном документе термин «применение» композиции или продукта 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 нефтяными скважинами.

Используемый в данном документе термин «ПАВ» относится к соединению, 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/или диспергаторы. ПАВ, продуцируемый микроорганизмами, называют «био-ПАВ».

Используемый в данном документе термин «меркаптан» является другим термином для обозначения тиола. Меркаптаны представляют собой сероорганические соединения, которые содержат связанную с углеродом сульфгидрильную группу. Их химическая структура похожа на спирты, но с атомом серы вместо атома кислорода. Некоторые меркаптаны, особенно их чистые формы, имеют сильный неприятный запах, напоминающий чеснок или тухлые яйца. Другие ответственны за ароматы жареного кофе или грейпфрута. Люди очень чувствительны к меркаптанам, даже при очень низких уровнях. Любая ссылка на  $H_2S$  в рамках данной заявки должна включать меркаптаны и другие серосодержащие соединения.

Используемый в данном документе термин «биопленка» представляет собой сложный агрегат микроорганизмов, таких как бактерии, в котором клетки склеены друг с другом на поверхности. Клетки в биопленках 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 «добыча нефти и природного газа»  
5 относится к любым и всем операциям, связанным с добычей сырой нефти и/или природного газа из земли, переработкой и в дальнейшем ее конечной покупкой и использованием потребителями. Добыча нефти и природного газа может включать бурение, откачку, добычу, фрэкинг, обводнение скважины, перекачивание, обработку, переработку, транспортировку и хранение нефти и/или газа, но не ограничивается ими.

10 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  
15 (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.

«Среда добычи нефти и природного газа» относится к любой окружающей  
20 среде, оборудованию, структуре или поверхности, будь они природного или техногенного происхождения, в которых происходит один или несколько процессов добычи и переработки нефти и природного газа, включая нефтегазосодержащие пласты, буровые установки, нефтеперерабатывающие заводы, стволы скважин, стержни нефтяных скважин, подводные трубопроводы, сепараторы, насосы, трубы,  
25 трубопроводы, обсадные колонны, клапаны, штуцера, системы сбора и резервуары для хранения, но не ограничиваясь ими.

Используемый в данном документе термин «борьба», используемый в отношении активности, производимой био-ПАВ или микроорганизмами, продуцирующими ПАВ, распространяется на уничтожение, потерю активности,  
30 иммобилизацию или снижение численности популяции организма, или иным образом делающий организм практически неспособным причинять вред. Что касается биопленки, борьба может дополнительно относиться к нарушению образования биопленок и/или разрушение существующей биопленки.

Используемый в данном документе термин «биокоррозионные бактерии» или «биокоррозионный микроорганизм» означает любую таксономическую группу бактерий (или микроорганизмов), о которых известно, что они способствуют коррозии, вызванной микроорганизмами («МИС»), металлических и/или неметаллических материалов. Неограничивающие примеры включают хемоавтотрофы, сульфатредуцирующие бактерии, железокисляющие бактерии, сероокисляющие бактерии, нитратредуцирующие бактерии, метаногены и кислотообразующие бактерии. Указанные бактерии способны непосредственно восстанавливать металл, образуя продукты метаболизма, которые являются коррозионными (например, газообразный сероводород), и/или приводят к образованию биопленок, которые могут изменять местную среду, способствуя коррозии.

Используемая в данном документе фраза «улучшение качества» применительно к качеству нефти и/или газа может включать снижение преобразования нефти и газа с низким содержанием серы в нефть и газ с высоким содержанием серы, увеличение преобразования нефти и газа с высоким содержанием серы в нефть и газ с низким содержанием серы, сохранение малосерности нефти и газа, снижение концентрации серосодержащих соединений, таких как сероводород и меркаптаны, в нефти и/или газе (как внутри скважины, так и снаружи скважины, например, в резервуаре для хранения), и ингибирование роста SRB и других биокоррозионных бактерий в нефти и газе.

#### **Композиции для снижения уровня сероводорода и меркаптанов**

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 данном документе, используют микроорганизмы и/или побочные продукты их жизнедеятельности для улучшения качества нефти и газа, улучшения целостности оборудования, используемого для добычи нефти и газа, и повышения добычи нефти и газа из пласта.

В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения первая и вторая композиции предназначены для снижения уровня  $H_2S$  и меркаптанов, и борьбы с биокоррозионными бактериями, присутствующими в средах добычи нефти и природного газа. Вследствие сниженных концентраций  $H_2S$  композиции могут дополнительно предотвращать, снижать и/или устранять коррозию и износ

оборудования и конструкций, в которых растут биокоррозионные бактерии, особенно тех, которые изготовлены из металла. В конкретном варианте осуществления композиции могут быть использованы для снижения МІС и износа оборудования и конструкций, используемых для добычи нефти и природного газа.

5 В предпочтительных вариантах осуществления первая композиция содержит смесь противомикробного био-ПАВ, хелатирующий агент и один или несколько поглотителей  $H_2S$ .

В некоторых вариантах осуществления смесь противомикробного био-ПАВ содержит один или несколько био-ПАВ. Предпочтительно, одно или несколько био-  
10 ПАВ включают, по меньшей мере, один гликолипид и, по меньшей мере, один липопептид. Преимущественно био-ПАВ можно использовать в относительно низких концентрациях для ингибирования роста бактерий, в том числе грамотрицательных и грамположительных бактерий.

Био-ПАВ представляют собой структурно разнообразную группу поверхностно-  
15 активных веществ, продуцируемых микроорганизмами. Все биоПАВ являются амфифильными. Они состоят из двух частей: полярного (гидрофильного) фрагмента и неполярной (гидрофобной) группы. Благодаря своей амфифильной структуре био-ПАВ увеличивают площадь поверхности гидрофобных нерастворимых в воде веществ, увеличивают биодоступность таких веществ в воде и изменяют свойства поверхности  
20 бактериальных клеток.

Био-ПАВ накапливаются на границах раздела, тем самым уменьшая межфазное натяжение и приводя к образованию агрегированных мицеллярных структур в растворе. Способность био-ПАВ образовывать поры и дестабилизировать биологические мембраны позволяет использовать их в качестве противобактериальных,  
25 противогрибковых и гемолитических агентов. В сочетании с такими характеристиками как низкая токсичность и способность к биологическому разложению, био-ПАВ выгодны для использования в нефтегазовой промышленности как эффективные ингибиторы роста SRB и связанного с этим снижения производства сероводорода.

Био-ПАВ включают гликолипиды с низкой молекулярной массой, липопептиды,  
30 флаволипиды, фосфолипиды и полимеры с высокой молекулярной массой, такие как липопротеины, липополисахарид-белковые комплексы и комплексы полисахарид-белок-жирная кислота. Углеводородная цепь жирной кислоты действует как обычный липофильный фрагмент молекулы био-ПАВ, тогда как гидрофильная часть образована сложноэфирными или спиртовыми группами нейтральных липидов, карбоксилатной

группой жирных кислот или аминокислот (или пептидов), органической кислотой в случае флаволипидов или углеводов в случае гликолипидов.

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

В некоторых вариантах осуществления био-ПАВ, используемые в противомикробной смеси, включают гликолипиды, такие как рамнолипиды (RLP), софоролипиды (SLP), трегалозные липиды или липиды маннозилеритрита (MEL).

В определенных вариантах осуществления один или несколько био-ПАВ могут включать один или несколько гликолипидов, таких как, например, софоролипиды, рамнолипиды или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления смесь противомикробных био-ПАВ дополнительно содержит липопептидный био-ПАВ, например сурфактин или лихенизин. Различные бактерии *Bacillus* способны продуцировать липопептиды, такие как *B. subtilis*, *B. licheniformis* и *B. amyloliquefaciens* помимо других.

В частности, сурфактин является одним из ряда липопептидных био-ПАВ, называемых поринами. Он обладает противомикробными, противовирусными, противогрибными свойствами и, в частности, обладает противобактериальным действием как на грамположительные, так и на грамотрицательные бактерии. Таким образом, использование сурфактина расширяет спектр противомикробной активности для охвата грамотрицательные бактерии. Сурфактин может быть получен известными в данной области техники способами ферментации.

В некоторых вариантах осуществления био-ПАВ первой композиции находятся в очищенной форме. В других вариантах осуществления био-ПАВ продуцируются *in situ* микроорганизмами, присутствующими в месте применения.

Био-ПАВ могут быть использованы для подавления роста бактерий при относительно низких концентрациях. В предпочтительных вариантах осуществления

общая концентрация био-ПАВ, используемого в заявленной композиции, составляет от 1000 ч/млн до 3000 ч/млн или более. В конкретном варианте концентрация био-ПАВ составляет около 2500 ч/млн.

5 Смесь био-ПАВ, используемых в настоящем изобретении, может быть составлена с использованием любого количества комбинаций и пропорций. В определенных вариантах осуществления смесь био-ПАВ включает SLP, RLP и сурфактин. В одном варианте осуществления смесь био-ПАВ содержит SLP в пропорции от 30% до 90% смеси. В одном варианте осуществления смесь био-ПАВ содержит RLP в пропорции от 10% до 60% смеси. В одном варианте осуществления смесь био-ПАВ включает сурфактин в пропорции от 2% до 40% смеси. В одном варианте осуществления смесь био-ПАВ включает SLP, RLP и сурфактин в соотношении 60%:30%:10%. В другом варианте осуществления смесь био-ПАВ включает SLP, RLP и сурфактин в соотношении 40%:40%:20%. В предпочтительном варианте осуществления смесь био-ПАВ включает SLP, RLP и сурфактин в соотношении 15:1:1.

В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит хелатор или хелатирующий агент. Используемый в данном документе термин «хелатор» или «хелатирующий агент» означает активный агент, способный удалять ион металла из системы путем образования комплекса, так что ион металла не может легко участвовать или катализировать образование радикала кислорода.

Примеры хелатирующих агентов, подходящих для настоящего изобретения, включают димеркаптосукциновую кислоту (DMSA), 2,3-димеркаптопропансульфоновую кислоту (DMPS), альфа-липоевую кислоту (ALA), тиаминтетрагидрофуруилдисульфид (TTFD), пеницилламин, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) и лимонная кислота, но не ограничиваются ими.

Преимущественно, хелатирующий агент повышает эффективность смеси противомикробного био-ПАВ, модифицируя клеточные стенки, например, грамотрицательных бактерий, чтобы они были более восприимчивыми к обработке сурфактантом. Следовательно, способность проникать в грамотрицательные бактерии расширяет спектр противомикробных возможностей для заявленного изобретения.

Хелатирующий агент может быть добавлен в композицию в количестве до около 5 г/л или более. В конкретных вариантах осуществления хелатирующий агент представляет собой ЭДТА в концентрации от около 4 г/л до около 5 г/л.

В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит один или несколько поглотителей  $H_2S$ . Используемый в данном документе термин «поглотитель сероводорода» относится к любому химическому веществу, которое может реагировать с одним или несколькими серосодержащими веществами, включая меркаптаны, и может превращать его в более инертную форму. Эффективное поглощение основано на проведении необратимой и полной химической реакции между поглотителем и одним или несколькими серосодержащими веществами.

Одним или несколькими поглотителями  $H_2S$ , используемыми в заявленной композиции, могут быть, например, растворы нитратов или нитритов. В определенных вариантах осуществления поглотители  $H_2S$  выбраны из глиоксаля и нитратных или нитритных солей, включая нитрат натрия, нитрит натрия, нитрат аммония, нитрит аммония, нитрат калия и нитрит калия, но не ограничиваясь ими. В конкретных вариантах осуществления поглотитель  $H_2S$  представляет собой 5 г/л нитрата калия и/или 5 г/л нитрата натрия и/или 5 г/л глиоксаля.

В одном варианте осуществления эффективность противомикробного действия первой композиции может быть дополнительно повышена путем добавления одного или нескольких природных биологических веществ с известными противомикробными свойствами, включая противомикробные свойства против грамотрицательных микроорганизмов.

В одном варианте осуществления природное биологическое вещество может содержать низин, противомикробный полипептид, полученный при культивировании *Lactococcus lactis*. Общая концентрация низина, включенного в первую композицию, может составлять по меньшей мере 200 ч/млн, 250 ч/млн, 300 ч/млн или более.

В одном варианте природным биологическим веществом является цитронелла (экстракт лемонграсса). Цитронелла является недорогим веществом растительного происхождения, которое может использоваться для подавления как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий, а также некоторых грибов и дрожжей. Общая концентрация цитронеллы, включенной в первую композицию, может составлять от около 30 до 100 ч/млн, предпочтительно около 50 ч/млн.

В одном варианте осуществления первая композиция может содержать любое количество описанных выше био-ПАВ, хелаторов, природных противомикробных веществ и поглотителей сероводорода в любой комбинации, так что можно контролировать максимально широкий спектр биокоррозионных бактерий и наибольшее количество сероводорода и меркаптанов могут быть снижено.

В одном варианте осуществления предложена вторая композиция, содержащая микроорганизм, способный победить остаточные SRB в конкурентной борьбе за обычные источники углерода и энергии, например, нитратредуцирующих бактерий, тем самым подавляя возобновление роста SRB, и, необязательно, источники питательных веществ для обеспечения эффективного роста микроорганизмов в анаэробных условиях.

В одном варианте осуществления микроорганизм, используемый во второй композиции, содержит штамм *Bacillus* способный продуцировать липопептидные био-ПАВ, например, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. firmus*, *B. laterosporus*, *B. megaterium* и/или *B. amyloliquefaciens*. Предпочтительно, штамм *Bacillus* выбран из штаммов *Bacillus subtilis* var. *locuses* В1 и/или В2, которые являются эффективными продуцентами сурфактина.

В одном варианте осуществления В1 и/или В2 служат в качестве нитратредуцирующих бактерий («NRB»). В предпочтительных вариантах осуществления исходная стабильная растущая концентрация В1 и/или В2 во второй композиции составляет от  $10^5$  до  $10^7$  КОЕ/мл. Еще более предпочтительно исходная стабильная растущая концентрация В1 и/или В2 составляет по меньшей мере  $10^6$  КОЕ/мл второй композиции.

В некоторых вариантах осуществления штаммы *Bacillus*, используемые в соответствии с настоящим изобретением, способны активно расти в условиях низкого содержания кислорода и/или высокого содержания соли. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, штамм *Bacillus* выращивают в анаэробных условиях.

Использование других видов *Bacillus*, такие как *B. licheniformis*, который продуцирует лихенизин, и *B. amyloliquefaciens*, который продуцирует циклические липопептиды и фенгицин, также предложены в заявленном изобретении.

В одном варианте осуществления вторая композиция дополнительно содержит источники питательных веществ, включая нитриты, нитраты, фосфор, магний, источники белка и/или углерод, но не ограничиваясь ими.

В одном варианте осуществления источники питательных веществ добавляют ко второй композиции следующим образом: от около 1,0 до около 10 г/л  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , по крайней мере 0,5 г/л  $\text{KNO}_3$ , по крайней мере 0,2 г/л  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  и от около 2,0 до около 6,0 г/л углеводов, таких как патока или глюкоза, и 0,1-0,5 г/л дрожжевого экстракта.

В одном варианте осуществления вторая композиция дополнительно содержит одно или несколько веществ для повышения роста микроорганизма. То есть активация

и/или споруляция микроорганизмов может быть повышена путем добавления микромолярных количеств L-аланина, марганца, L-валина и L-аспарагина или любого другого известного усилителя роста во вторую композицию.

5 Другие штаммы микроорганизмов, включая, например, другие штаммы бактерий, способные накапливать значительные количества, например, гликолипидных и/или липопептидных био-ПАВ, могут быть использованы в соответствии с настоящим изобретением. Например, штаммы *Bacillus* могут использоваться отдельно или в комбинации с другим микроорганизмом, таким как бактерии клады *Pseudomonas*. *Pseudomonas aeruginosa*, например, является эффективным продуцентом рамнолипидов.

10 Другие био-ПАВ, применимые в соответствии с настоящим изобретением, включают маннопротеин, бета-глюкан и другие метаболиты, которые обладают биоэмульгирующими свойствами и способствуют снижению поверхностного/межфазного натяжения.

15 Преимущественно, в одном варианте осуществления предлагаемые композиции и способы могут быть использованы для предотвращения развития у видов SRB в средах добычи нефти и газа и нефтегазовых пластов устойчивости к противобактериальной обработке.

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

### 25 **Бактерии, снижающие содержание серы и МІС**

В одном варианте осуществления композиция может быть использована для борьбы с SRB и другими биокоррозионными бактериями. В одном варианте осуществления биокоррозионные бактерии находятся в форме биопленки.

30 Многие SRB относятся к типу *Proteobacteria*. Одна из них, группа облигатных анаэробов принадлежит к классу *Deltaproteobacteria*. Эта группа включает *Desulfuromonas*, *Desulfurella*, *Geobacter* и *Pelobacter*. Другие классы *Proteobacteria* включают микроаэрофилы, которые включают *Wolinella*, *Campylobacter*, *Shewanella*, *Sulfurospirillum* и *Geospirillum bamesi*.

Многие другие SRB принадлежат к археям из филогенетически разнородного класса и относятся (но не ограничиваются) к следующим порядкам: *Thermococcales*, *Thermoproteales*, *Pyrodictales* и *Sulfolobales*. Кроме того, SRB обнаружены в нескольких других филогенетических линиях. В настоящее время известно 60 родов, содержащих более 220 видов SRB.

В определенных вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению могут обладать противомикробными свойствами широкого спектра действия, что означает, что они могут быть использованы для борьбы как с грамположительными, так и с грамотрицательными бактериями, а также с другими биокоррозионными микроорганизмами. Дополнительные примеры микроорганизмов, с которыми могут бороться при помощи настоящей композиции, которые ответственны за процессы разрушения в природном газе и нефти и которые были выделены из нефти, соляного раствора, нефтегазового оборудования, включают следующие, но не ограничиваются ими: *Methanobacterium curvum*, *Methanocalculus halotolerans*, *Methanoculleus spp.*, *Methanofollis spp.* (например, *M. liminatans*), *Methanosarcina spp.* (например, *M. barkeri*, *M. siciliae*), *Methanospirillum hungatei*, *Anaerobaculum mobile*, *Thermodesulfovibrio yellowstonii*, *Desulfovibrio spp.* (например, *D. vulgaris*), *Thermotoga spp.* (например, *T. hypogea*, *T. neapaitan*), *Clostridium spp.* (например, *C. sporogenes*, *C. bifermentas*, *C. celerecrescens*), *Desulfotomaculum spp.* (например, *D. kuznetsorii*), *Desulfovibrio desulfuricans*, *Citrobacter freundii*, *Cetobacterium somerae*, *Klebsiella pneumonia*, *Acinetobacter spp.* (например, *A. junii*), *E. coli* и *Staphylococcus auriculari*.

В одном варианте осуществления композиция может ингибировать продуцирование  $H_2S$  SRB и другими биокоррозионными бактериями путем борьбы с биокоррозионными бактериями. В другом варианте осуществления композиция может снижать концентрацию сероводорода, присутствующего в нефтесодержащем пласте или в оборудовании для добычи нефти.

### **Культивирование микроорганизмов**

В некоторых вариантах осуществления предложены способы культивирования микроорганизмов и/или производства их побочных продуктов жизнедеятельности, например био-ПАВ, для использования в заявленных композициях и способах. Микроорганизмы, выращенные согласно настоящему изобретению, могут быть спорообразующими бактериями. 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.

5 В предпочтительном варианте осуществления микроорганизмы представляют собой бактерии, включая грамположительные и грамотрицательные бактерии. Бактерии могут быть, например, *Bacillus* (например, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. firmus*, *B. laterosporus*, *B. megaterium*, *B. amyloliquifaciens*), *Clostridium* (например, *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*, *C. acetobutyricum*, *Clostridium* NIPER 7, и *C. beijerinckii*),  
10 *Azobacter* (например, *A. vinelandii*, *A. chroococcum*), *Pseudomonas* (например, *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* (Kluyver), *P. aeruginosa*), *Agrobacterium radiobacter*, *Azospirillum brasiliensis*, *Rhizobium*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Ralslonia eutropha*, и/или *Rhodospirillum rubrum*.

В конкретных вариантах осуществления микроорганизм представляет собой  
15 штамм *Bacillus*, способный продуцировать липопептидные био-ПАВ, например, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. firmus*, *B. laterosporus*, *B. megaterium* и/или *B. amyloliquefaciens*. Предпочтительно, штамм *Bacillus* выбран из штаммов *Bacillus subtilis* var. *locuses* В1 и/или В2, которые являются эффективными продуцентами сурфактина.

20 Использование других видов *Bacillus*, такие как *B. licheniformis*, который продуцирует лихенизин, и *B. amyloliquefaciens*, который продуцирует циклические липопептиды и фенгицин, также предложены в заявленном изобретении.

В одном варианте осуществления микроорганизм представляет собой непатогенный штамм *Pseudomonas*, такой как, например, *P. aeruginosa*.  
25 Предпочтительно, штамм *Pseudomonas* является продуцентом рамнолипидных (RLP) био-ПАВ.

В заявленном изобретении используют способы культивирования микроорганизмов и продуцирования метаболитов микроорганизмов и/или других побочных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов. Настоящее изобретение  
30 дополнительно использует процессы культивирования, которые подходят для культивирования микроорганизмов и получения метаболитов микроорганизмов в желаемом масштабе. 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 композиции, согласно настоящему изобретению, получают посредством процессов культивирования, варьирующихся от  
5 малого до крупного масштаба. Указанные процессы культивирования включают глубинное культивирование, поверхностное культивирование, твердофазную ферментацию (SSF) и их комбинации, но не ограничиваются ими.

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

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  
20 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  
25 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  
30 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.

Способ культивирования 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.

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, изопропил, пропанол, бутанол, пентанол, гексанол, изобутанол и/или глицерин; жиры и масла, такие как соевое масло, масло рисовых отрубей, оливковое масло, кукурузное масло, кунжутное масло и/или льняное масло. Указанные источники углерода могут использоваться независимо или в комбинации двух или более.

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. Кроме того, источники витаминов, незаменимых аминокислот и микроэлементов могут быть включены, например, в форме муки или муки крупного помола, таких как кукурузная мука, или в форме экстрактов, таких как дрожжевой экстракт, экстракт картофеля, экстракт говядины, экстракт соевых бобов, экстракт банановой кожуры и тому подобное или в очищенных

формах. Аминокислоты, такие как, например, те, которые полезны для биосинтеза белков, также могут быть включены, например, L-аланин.

В одном варианте осуществления также могут быть включены неорганические соли. Пригодными неорганическими солями могут быть дигидрофосфат калия, гидрофосфат дикалия, гидрофосфат динатрия, 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.

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. Противомикробные 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.

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.

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

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.

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.

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 рН для борьбы с ростом бактерий.

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.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение дополнительно относится к способу получения метаболитов микроорганизмов, 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 %.

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, такого как био-ПАВ, 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 всю композицию для культивирования микроорганизмов удаляют по завершении культивирования (например, после достижения желаемой плотности спор 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  
5 жизнеспособными клетками 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  
10 потребления энергии. Представляющие интерес микроорганизмы можно культивировать в малом или крупном масштабе на месте. Аналогичным образом, метаболиты микроорганизмов или другие побочные продукты могут также продуцироваться в больших количествах в нужном месте.

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

#### **Приготовление продуктов на основе микроорганизмов**

Одним из продуктов на основе микроорганизмов по настоящему изобретению является просто ферментационный бульон, содержащий микроорганизм и/или  
20 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.

25 Микроорганизмы в продукте на основе микроорганизмов могут находиться в активной или неактивной форме. Предпочтительно микроорганизмы находятся в форме спор.

Продукты на основе микроорганизмов могут использоваться без дальнейшей стабилизации, консервации и хранения. Преимущественно, прямое использование этих  
30 продуктов на основе микроорганизмов сохраняет высокую жизнеспособность микроорганизмов, уменьшает возможность загрязнения посторонними агентами и нежелательными микроорганизмами и поддерживает активность побочных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

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

5 В других вариантах осуществления микроорганизмы и/или бульон могут быть помещены в контейнеры соответствующего размера, принимая во внимание, например, предполагаемое использование, предполагаемый способ применения, размер ферментационной емкости и любой способ транспортировки от установки для выращивания микроорганизма до места использования. Таким образом, контейнеры, в которые помещен продукт на основе микроорганизмов, могут иметь объем, например, 10 от 1 до 1000 галлонов или более. В других вариантах осуществления контейнеры имеют объем 2 галлона, 5 галлонов, 25 галлонов или больше.

После получения микроорганизмов и/или бульона из емкости для выращивания можно добавлять дополнительные компоненты, когда полученный продукт помещают в контейнеры и/или доставляют по трубам (или иным образом транспортируют для 15 использования). Добавками могут быть, например, буферы, носители, другие композиции на основе микроорганизмов, производимые в той же или другой установке, модификаторы вязкости, консерванты, питательные вещества для роста микроорганизмов, отслеживающие агенты, растворители, биоциды, другие микроорганизмы и другие ингредиенты, специфичные для предполагаемого 20 использования.

Другие подходящие добавки, которые могут содержаться в составах согласно настоящему изобретению, включают вещества, которые обычно используются для таких препаратов. Примеры таких добавок включают поверхностно-активные вещества, эмульгаторы, смазывающие вещества, буферные агенты, агенты, 25 регулирующие растворимость, агенты, регулирующие рН, консерванты, стабилизаторы и агенты, устойчивые к ультрафиолетовому излучению.

В одном варианте осуществления продукт может дополнительно содержать буферные агенты, включая органические кислоты и аминокислоты или их соли. Подходящие буферы включают цитрат, глюконат, тартрат, малат, ацетат, лактат, 30 оксалат, аспарат, малонат, глюкогоптонат, пируват, галактарат, глюкарат, тартронат, глутамат, глицин, лизин, глутамин, метионин, цистеин, аргинин и их смеси. 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, перечисленные выше.

В дополнительном варианте осуществления регуляторы pH включают гидроксид калия, гидроксид аммония, карбонат или бикарбонат калия, соляную кислоту, азотную кислоту, серную кислоту или их смеси.

Значение pH продукта на основе микроорганизмов должно соответствовать интересующему микроорганизму. В предпочтительном варианте осуществления pH композиции на основе микроорганизмов находится в диапазоне 7,0-7,5.

В одном варианте осуществления в состав могут быть включены дополнительные компоненты, такие как водный препарат соли в виде, например, бикарбоната или карбоната натрия, сульфата натрия, фосфата натрия или бифосфата натрия.

Преимущественно в соответствии с заявленным изобретением продукт 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. %, 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.

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 °C. С другой стороны, композицию био-ПВА обычно можно хранить при температуре окружающей среды.

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

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 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, 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 генерируется локально, не прибегая к процессам стабилизации, сохранения, хранения и транспортировки микроорганизмов при обычном производстве микроорганизмов, может быть получена значительно более высокая плотность вегетативных клеток, репродуктивных спор, мицелия, конидий и/или других пропагул микроорганизмов, 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 ферментации и меньшие запасы исходного материала, питательных веществ, агентов для регулирования рН и пеногасителей), что делает систему эффективной. 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, репродуктивных клеток, мицелия, конидий и/или их смеси.

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.

Время культивирования для отдельных емкостей может составлять, например, от 1-7 до 14 дней или дольше. Продукт культивирования можно получать любым из множества способов.

Поскольку продукт на основе микроорганизмов образуется на месте или вблизи места применения, без необходимости стабилизации, консервации, длительного хранения и обширных процессов транспортировки, характерных для обычного производства, может быть получена гораздо более высокая плотность живых микроорганизмов, что требует гораздо меньший объем продукта на основе микроорганизмов для использования на месте применения. Это позволяет использовать биореактор уменьшенного размера (например, меньший резервуар для брожения; меньшие запасы исходного материала, питательных веществ, агентов для регулирования pH и пенообразователя и т. д.), нет причин стабилизировать клетки или отделять их от культурального бульона, и, при желании, может облегчать транспортабельность продукта.

Установки для выращивания микроорганизмов обеспечивают универсальность производства за счет способности адаптировать продукты на основе микроорганизмов для улучшения синергии с географическими точками назначения.

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, способности расти при высоких температурах.

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, поверхностное культивирование, твердофазную ферментацию (SSF) и их комбинации, но не ограничиваются ими.

#### 15 **Способы снижения серосодержащих соединений, ингибирования МІС и повышения добычи нефти и газа**

В одном варианте осуществления предложен двухфазный способ улучшения добычи нефти и природного газа. В частности, способы могут быть использованы для ингибирования продукции  $H_2S$  SRB и другими биокоррозионными бактериями, а также для снижения «кислотности» сырой нефти и газа, одновременно повышая добычу нефти и газа. Способы также могут быть использованы для снижения преобразования нефти с низким содержанием серы в нефть и газ с высоким содержанием серы, для повышения преобразования нефти и газа с высоким содержанием серы в нефть и газ с низким содержанием серы и/или для сохранения малосерности нефти и газа. Способы также могут быть использованы для снижения уровня  $H_2S$  и меркаптанов в нефти в скважине или вне ее.

В определенных вариантах осуществления двухфазный способ может дополнительно использоваться для снижения и/или удаления коррозии, вызванной микроорганизмами («МІС»), оборудования и конструкций, используемых для добычи сырой нефти и природного газа.

В одном варианте осуществления первая фаза способа включает применение первой композиции по настоящему изобретению к нефтегазосодержащему пласту, например, путем введения первой композиции как можно глубже в ствол скважины,

закрытие пласта; откачивание композиции и открытие пласта для возобновления добычи нефти и/или газа.

В предпочтительных вариантах осуществления композиция, используемая на первой стадии (то есть первая композиция по настоящему изобретению), содержит смесь противомикробного био-ПАВ, хелатирующий агент и один или несколько поглотителей  $H_2S$ .

В одном варианте осуществления смесь противомикробного био-ПАВ включает одно или несколько био-ПАВ, выбранных из гликолипидов, например, софоролипидов, рамнолипидов и/или их комбинации, и липопептидов, например, сурфактина, лихенизина, фенгицина и/или их комбинации.

В одном варианте осуществления хелатирующий агент представляет собой ЭДТА.

В одном варианте осуществления один или несколько поглотители  $H_2S$  выбраны из глиоксаля и нитратных или нитритных солей, включая нитрат натрия, нитрит натрия, нитрат аммония, нитрит аммония, нитрат калия и нитрит калия, но не ограничиваясь ими.

В одном варианте осуществления первая композиция дополнительно содержит одно или несколько природных биологических веществ с известными противомикробными свойствами, таких как, например, низин и/или цитронелла (экстракт лимонграсса).

Предпочтительно первая фаза проводится при непрерывном мониторинге уровня сероводорода в пласте.

В одном варианте осуществления первой фазы стадию закрытия пласта осуществляют до тех пор, пока уровень сероводорода не снизится до желаемой концентрации. Например, период закрытия может длиться от около 3 до около 60 дней или до тех пор, пока уровни сероводорода не снизятся до концентрации от около 0 ч/млн до около 50 ч/млн, предпочтительно от около 0 ч/млн до около 25 ч/млн.

Первая фаза способа разработана как начальная обработка для (а) борьбы с биокоррозионными бактериями, такими как SRB, (б) снижения концентрации  $H_2S$  в пласте и (в) повышения добычи нефти и газа из пласта.

В одном варианте осуществления вторая фаза способа включает добычу нефти и/или газа из пласта до тех пор, пока не будет наблюдаться увеличение концентрации сероводорода применение второй композиции по настоящему изобретению к пласту,

например, путем введения ее как можно глубже в ствол скважины, закрытие пласта и открытие пласта для возобновления добычи нефти и/или газа.

Предпочтительно вторая фаза проводится при непрерывном мониторинге уровня сероводорода в пласте.

5 В одном варианте осуществления композиция, используемая на второй фазе (то есть вторая композиция по настоящему изобретению), содержит микроорганизм, способный победить остаточные SRB в конкурентной борьбе за обычные источники углерода и энергии, тем самым подавляя возобновление роста SRB, и, необязательно, источники питательных веществ для обеспечения эффективного роста культуры  
10 микроорганизмов в анаэробных условиях, включая нитриты, нитраты, фосфор, магний, источники белка и/или углерод, но не ограничиваясь ими.

В одном варианте осуществления источники питательных веществ включены во вторую композицию следующим образом: от около 1,0 до около 10 г/л  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , по крайней мере 0,5 г/л  $\text{KNO}_3$ , по крайней мере 0,2 г/л  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  и от около 2,0 до около  
15 6,0 г/л углеводов, таких как патока или глюкоза, и 0,1-0,5 г/л дрожжевого экстракта.

Предпочтительно, микроорганизм второй композиции находится в форме споры. Соответственно, в одном варианте осуществления вторая композиция может содержать вещества для усиления прорастания спор, такие как, например, L-аланин и/или марганец.

20 В одном варианте осуществления микроорганизм второй композиции представляет собой спорообразующий штамм бактерий, продуцирующий био-ПАВ. В предпочтительных вариантах осуществления бактерии могут быть введены в виде нитратредуцирующих бактерий («NRB»).

В одном варианте осуществления бактерия представляет собой виды из клады  
25 *Bacillus*. В предпочтительных вариантах осуществления бактерии второй композиции представляют собой штамм *Bacillus subtilis*. Еще конкретнее, *Bacillus subtilis* может являться штаммами *B. subtilis var. locuses* B1 и/или B2, которые являются эффективными продуцентами липопептидного сурфактина.

В одном варианте осуществления бактерии представляют собой штамм  
30 *Pseudomonas*, такой как, например, *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* является эффективным продуцентом рамнолипидных био-ПАВ.

В одном варианте осуществления вторая композиция содержит комбинацию бактерий клады *Bacillus* и бактерий клады *Pseudomonas*.

В одном варианте осуществления бактериальные споры растут и размножаются при продуцировании био-ПАВ, таких как сурфактин и/или рамнолипид, *in situ*. Таким образом, вторая фаза усиливает способы, расширяя спектр противомикробных возможностей как для грамположительных, так и для грамотрицательных бактерий. В результате добыча сырой нефти и природного газа из нефтегазосодержащих пластов также повышается.

В одном варианте осуществления увеличение концентрации сероводорода, которое наблюдается до применения второй композиции на второй фазе, представляет собой увеличение от около 1 до примерно 50 ч/млн или около до 100 ч/млн, или выше, выше самой низкой наблюдаемой концентрации. В одном варианте осуществления увеличение концентрации сероводорода, которое наблюдается до применения второй композиции, представляет собой любое увеличение, которое приводит к концентрации сероводорода на уровне от около 50 до около 100 ч/млн или выше.

В одном варианте осуществления второй фазы стадию закрытия пласта осуществляют до тех пор, пока уровень сероводорода не снизится до желаемой концентрации. Например, период закрытия может длиться от около 3 до около 60 дней или до тех пор, пока уровни сероводорода не снизятся до концентрации от около 0 ч/млн до около 50 ч/млн, предпочтительно от около 0 ч/млн до около 25 ч/млн.

Вторая фаза способа предназначена для повторного заселения ствола скважины и/или пласта полезными бактериями, которые могут победить в конкурентной борьбе и расти быстрее, чем любые оставшиеся SRB. Вторая фаза также может служить для стабилизации и продления противомикробного и восстанавливающего сероводород действия первой фазы, например, предотвращая размножение любых оставшихся SRB. Таким образом, вторая фаза дополнительно усиливает борьбу с биокоррозионными бактериями, снижение концентрации сероводорода и добычи нефти и газа.

В одном варианте осуществления заявленного способа используется только первая фаза без второй фазы. В одном варианте осуществления фаза два используется без предварительной первой фазы. Другими словами, если определено, что произошло достаточное снижение уровня сероводорода с использованием только одной фазы, вторая фаза может быть пропущена или отложена до тех пор, пока не будет определено, что уровни сероводорода увеличиваются /или происходит снижение добычи нефти.

В определенных вариантах осуществления первая и/или вторая композиции могут быть применены в количестве от 50-1000 баррелей до 10000 баррелей в

зависимости от количества присутствующего сероводорода. В предпочтительных вариантах осуществления первую и/или вторую композиции применяют в диапазоне от 50 до 1000 баррелей.

5 В одном варианте осуществления стадия определения количества сероводорода (например, в ч/млн), присутствующего в пласте, выполняется до первой фазы и/или второй фазы заявленного способа, после чего следует стадия определения объема композиции, необходимой для обработки.

10 Применение композиций по заявленному изобретению может быть выполнено во время операций бурения (например, во время бурения, при спуске или подъеме бурильной колонны в/из скважины, при прокачке бурового раствора, при обсаживании колонны, при размещении хвостовика обсадной колонны, и/или при цементировании и т. д.) и/или в качестве производственной обработки. Применение может включать перекачивание в течение 1 часа, 5 часов, 10 часов или более, в зависимости от количества применяемой композиции.

15 Кроме того, применение может быть выполнено к любой части оборудования для добычи нефти и газа, например, к стволу скважины, обсадной колонне, в межтрубному пространству между трубопроводом и обсадной колонной, трубопроводу, резервуару, отводной линии и/или сепаратору.

20 В предпочтительных вариантах осуществления способ дополнительно включает, после завершения второй фазы, стадию постоянного мониторинга концентраций  $H_2S$  в пласте в течение любого количества дней или месяцев после обработки, чтобы гарантировать, что уровни сероводорода остаются под контролем. Если уровни сероводорода снова начинают увеличиваться, способы могут повторять столько раз, сколько необходимо.

25 В одном варианте осуществления способ можно использовать в нескважинных установках для контроля уровня  $H_2S$  и/или меркаптанов, присутствующих в нефти и газе. Применяя первую и вторую композиции к нефти и/или газу вне скважины, например, после извлечения из скважины или во время хранения, микроорганизмы по настоящему изобретению могут отделять  $H_2S$  и/или меркаптаны, так что они  
30 осаждаются в виде соли.

В одном варианте осуществления содержание сероводорода в природном газе, в частности, может быть снижено с использованием биологического поглотителя и композиций по настоящему изобретению. Биологические поглотители используют микробную фиксацию для очищения природного газа от серы. В определенных

поглотителях газ направляют через емкость, содержащую питательную среду, такую как сетка-подложка или жидкая матрица, на которой или в которой обеспечивают рост микроорганизмов, таких как микроорганизмы согласно настоящему изобретению. Затем в емкость вводят воздух, а сероводород в газе окисляется в химических и биологических реакциях.

#### **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.

5 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.

### ПРИМЕРЫ

10 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 не должны рассматриваться как ограничивающие изобретение. Многочисленные изменения и модификации могут быть сделаны в отношении изобретения.

#### 15 ПРИМЕР 1 – ЭФФЕКТ ИНГИБИРОВАНИЯ РОСТА ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ БИО-ПАВ

Грамположительные *Bacillus subtilis* В1 и В2 высаживали газоном. 20 мкл 2 % софоролипидов вносили каплями в центр чашки Петри и инкубировали в течение ночи при 40 °С.

20 После культивирования в течение ночи, как показано на **ФИГ. 1**, присутствовала чистая зона в центре газона, указывающая на то, что софоролипиды могут эффективно ингибировать рост или убивать *B. subtilis*.

#### ПРИМЕР 2 - ПОЛУЧЕНИЕ *BACILLUS SUBTILIS*

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

Глюкоза	18
Порошковая меласса	2
Сахароза	1
КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	0,5
Na <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub> ·7Н <sub>2</sub> О	2,1
КСl	0,1
MgSO <sub>4</sub>	0,5
CaCl <sub>2</sub>	0,05

Мочевина	2,5
NH <sub>4</sub> Cl	1,24
Дрожжевой экстракт	2
Кукурузный пептон	0,5
Микроэлементы TekNova (мл)	1

Температура культивирования составляет 40 ° С, стабилизация рН составляет 6,8-7,0, стабилизация DO составляет 30% (концентрация кислорода в воздухе принимается за 100%). Продолжительность культивирования составляет 24-32 часа. Конечная концентрация бактериальной культуры не менее 1×10<sup>9</sup> КОЕ/мл.

5 Количество культуры, произведенной за один цикл ферментации, позволяет получить более 2000 баррелей конечного состава для обработки, содержащего 10<sup>6</sup> КОЕ указанного штамма *Bacillus*.

10 ПРИМЕР 3 – ПОЛНОЕ СНИЖЕНИЕ УРОВНЯ СЕРОВОДОРОДА В МЕСТОРОЖДЕНИИ НЕФТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФАЗЫ ОДИН ДВУХФАЗНОГО СПОСОБА

До обработки уровень сероводорода в скважине составлял 400 ч/млн. Восемьдесят баррелей обработки, включающей 60% SLP, 30% RLP и 10% сурфактина, вводили в скважину в течение приблизительно 5 часов. Затем скважину закрывали на 3 дня. После возобновления добычи в скважине уровень сероводорода составил 0 ч/млн.  
15 Это первая фаза заявленного способа.

Затем обработка может быть дополнена второй фазой, в которой 1000 баррелей продукта на основе *Bacillus subtilis* (вторая композиция по настоящему изобретению) вносят в скважину в течение приблизительно 8 часов. Питательные вещества могут содержать, например, 6 г глюкозы, 10 г/л нитрата аммония, 0,1-0,5 г/л дрожжевого экстракта, 0,5 г/л KNO<sub>3</sub> и 0,2 г/л Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Конечная концентрация био-ПАВ в стволе скважины может составлять примерно 1000-2000 ч/млн, а конечная концентрация В1 может составлять, например, 10<sup>6</sup> клеток/мл. Затем нефтяные скважины могут быть закрыты на 4-7 дней или на столько времени, сколько потребуется для обработки.

25 Мониторинг скважин может и должен проводиться в течение любого количества дней или месяцев после обработки, чтобы обеспечить контроль уровня сероводорода.

## ПРИМЕР 4 – СТИМУЛИРОВАНИЕ СКВАЖИНЫ И ОБРАБОТКА СЕРОВОДОРОДА В ГОРИЗОНТАЛЬНОЙ СКВАЖИНЕ С ПОМОЩЬЮ ДВУХФАЗНОГО СПОСОБА

Горизонтальная скважина с уровнями сероводорода, исторически находящимися в диапазоне от 200 до 400 ч/млн, была обработана заявленными двухфазными способами. Уровни  $H_2S$  тестировали с использованием насоса Дрегерра.

### *Первая фаза*

В день 0 уровни  $H_2S$  на месте измеряли до начала обработки, а также ежедневно в течение всей обработки. Грузовик с цистерной использовали для закачивания 70 баррелей первой композиции по настоящему изобретению в обсадную колонну ствола скважины. Смесь био-ПАВ первой композиции в этом примере включает софоролипид, рамнолипид и сурфактин в соотношении 15:1:1. 10 баррелей первой композиции также закачивали в резервуар, отводную линию и сепаратор. Затем скважину закрывали на 4 дня. Затем откачивание возобновляли до тех пор, пока жидкость для обработки не была извлечена.  $H_2S$  и уровни добычи нефти/газа измеряли ежедневно (ФИГ. 2).

### *Вторая фаза*

На 13-й день в сертифицированный чистый резервуар ГРП на 2500 баррелей загружали фильтрованный соляной раствор. 60 баррелей питательных веществ смешивали с концентрированным В1 с помощью насосного агрегата. 863 барреля соляного раствора, питательных веществ и композиции В1 закачивали в обсадную колонну со скоростью от 3,4 до 4,0 баррель/мин. Скважину закрывали на 5 дней, после чего возобновили нормальное откачивание. Уровни  $H_2S$  и добычи нефти и газа измеряли ежедневно (ФИГ. 2).

### *Результаты*

На ФИГ. 2 показаны измерения уровней  $H_2S$  при ежедневной добычей нефти и газа. После обработки с помощью заявленных способов уровень  $H_2S$  немного повысился, но оставался относительно стабильным при 100 ч/млн.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Первая композиция для борьбы с биокоррозионными бактериями и/или бактериями, которые способствуют производству сероводорода и меркаптана, содержащая смесь противомикробных био-ПАВ, хелатирующий агент и один или несколько поглотителей сероводорода.
2. Композиция по п. 1, в которой смесь био-ПАВ включает один или несколько гликолипидов и один или несколько липопептидов.
3. Композиция по п. 2, в которой смесь био-ПАВ включает софоролипид, рамнолипид и сурфактин.
4. Композиция по п. 1, в которой хелатирующий агент представляет собой ЭДТА.
5. Композиция по п. 1, в которой поглотитель сероводорода представляет собой глиоксаль, нитрат калия или нитрат натрия.
6. Композиция по п. 1, дополнительно содержащая одно или несколько природных биологических веществ, обладающих противомикробными свойствами.
7. Композиция по п. 6, в которой одно или несколько природных биологических веществ выбраны из цитронеллы и низина.
8. Композиция по п. 1, используемая для повышения добычи нефти и/или газа.
9. Вторая композиция для борьбы с биокоррозионными бактериями и/или бактериями, которые способствуют производству сероводорода, содержащая спорообразующий микроорганизм, продуцирующий био-ПАВ, и, необязательно, питательные вещества для усиления роста микроорганизмов, выбранные из нитритов, нитратов, фосфора, магния, источников белка и углерода.
10. Композиция по п. 9, дополнительно содержащая усилитель роста, выбранный из L-аланина, марганца, L-валина и L-аспарагина.
11. Композиция по п. 9, в которой микроорганизм представляет собой штамм *Bacillus*.
12. Композиция по п. 11, в которой штамм *Bacillus* представляет собой *Bacillus subtilis* vars. *Locuses* B1 и/или B2.
13. Композиция по п. 9, в которой микроорганизм представляет собой штамм *Pseudomonas*.
14. Композиция по п. 13, в которой *Pseudomonas* представляет собой *Pseudomonas aeruginosa*.

15. Двухфазный способ снижения концентрации сероводорода и меркаптана в среде добычи нефти и/или природного газа с одновременным повышением добычи нефти и/или газа, включающий:

первую фазу, которая включает применение первой композиции к нефте- и/или газосодержащему пласту, закрытие пласта, откачивание композиции и открытие пласта для возобновления добычи нефти и/или газа; и

вторую фазу, которая включает добычу нефти и/или газа из пласта до тех пор, пока не наблюдается увеличение концентрации сероводорода, применение второй композиции к пласту, закрытие пласта и открытие пласта для возобновления добычи нефти и/или газа,

где первая композиция содержит смесь противомикробных био-ПАВ, хелатирующий агент и один или несколько поглотителей сероводорода, и

где вторая композиция содержит спорообразующий микроорганизм, продуцирующий био-ПАВ.

16. Способ по п. 15, в котором смесь био-ПАВ первой композиции содержит один или несколько гликолипидов и один или несколько липопептидов.

17. Способ по п. 16, в котором смесь био-ПАВ включает софоролипид, рамнолипид и сурфактин.

18. Способ по п. 15, в котором хелатирующий агент первой композиции представляет собой ЭДТА.

19. Способ по п. 15, в котором поглотитель сероводорода первой композиции представляет собой глиоксаль, нитрат калия или нитрат натрия.

20. Способ по п. 15, в котором первая композиция дополнительно содержит одно или несколько природных биологических веществ, обладающих противомикробными свойствами.

21. Способ по п. 20, в котором одно или несколько природных биологических веществ выбраны из цитронеллы и низина.

22. Способ по п. 15, в котором вторая композиция дополнительно содержит питательные вещества для усиления роста микроорганизмов, выбранные из нитритов, нитратов, фосфора, магния, источников белка и углерода.

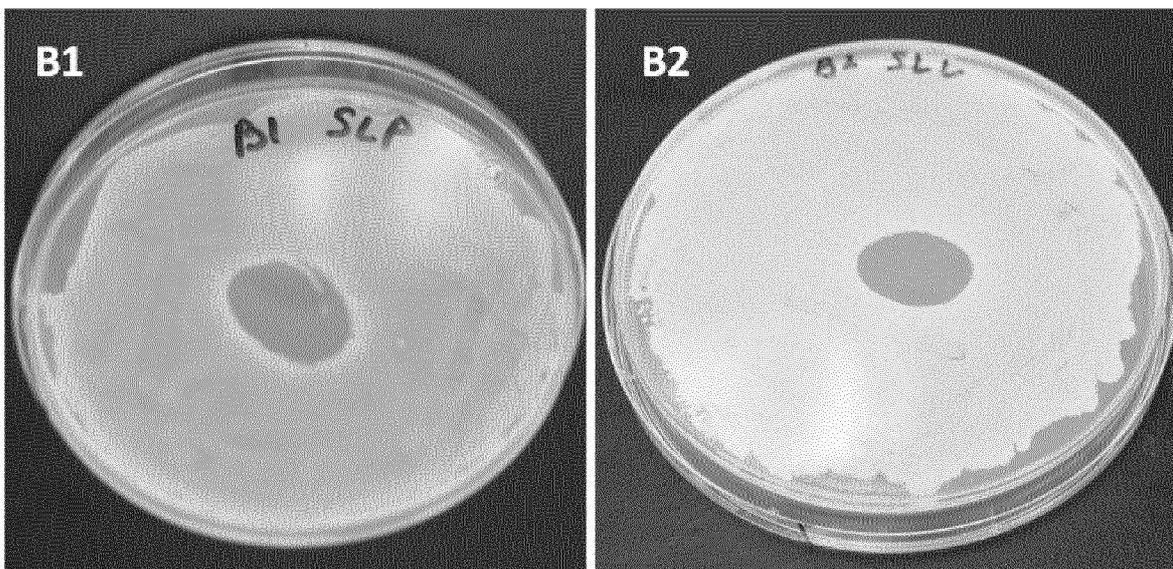
23. Способ по п. 15, в котором вторая композиция дополнительно содержит усилитель роста, выбранный из L-аланина, марганца, L-валина и L-аспарагина.

24. Способ по п. 15, где микроорганизм второй композиции представляет собой штамм *Bacillus*.

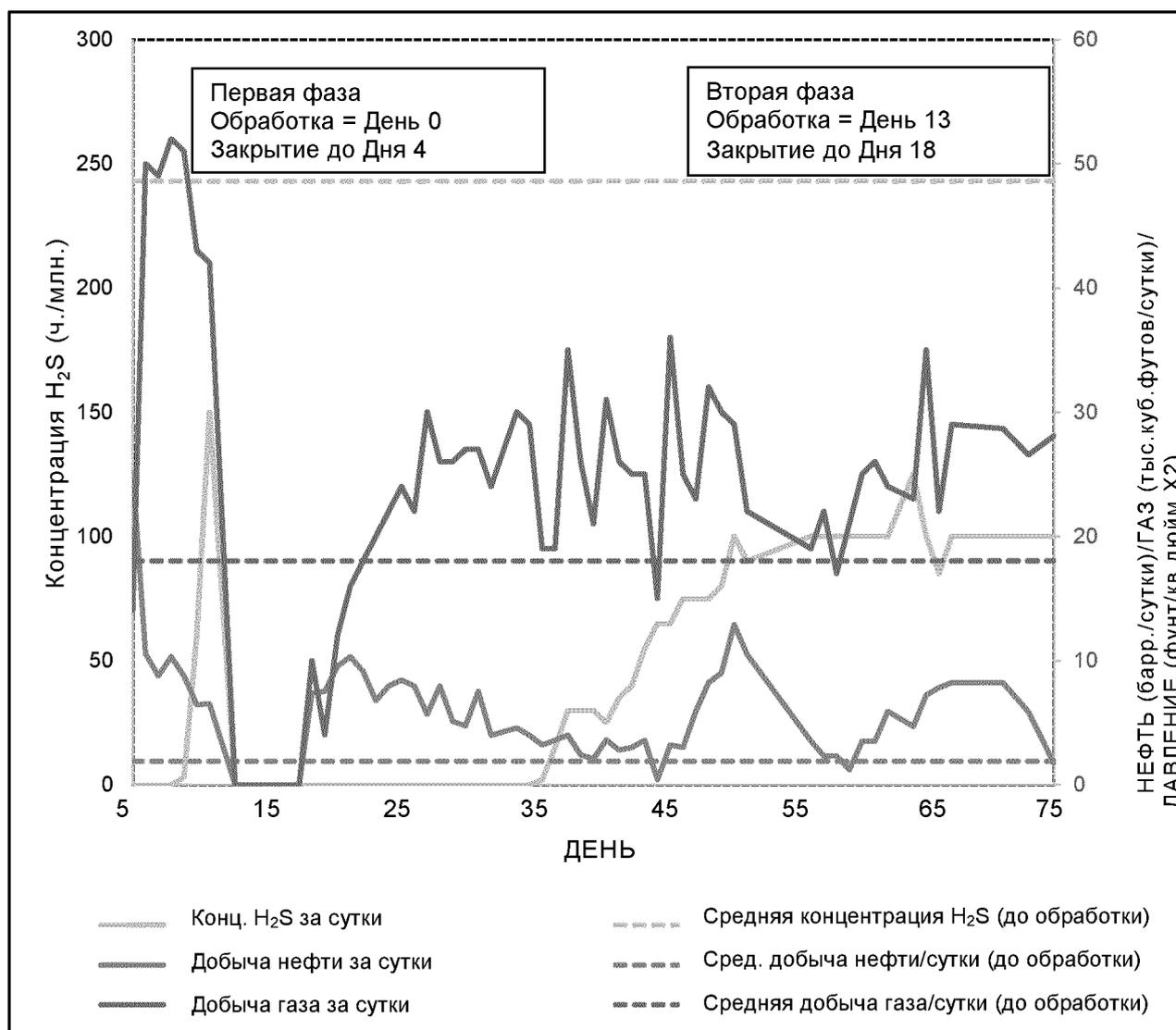
25. Способ по п. 24, в котором штамм *Bacillus* представляет собой *Bacillus subtilis* vars. *Locuses* B1 и/или B2.
26. Способ по п. 15, где микроорганизм второй композиции представляет собой штамм *Pseudomonas*.
27. Способ по п. 26, где *Pseudomonas* представляет собой *Pseudomonas aeruginosa*.
28. Способ по п. 15, в котором стадия применения первой композиции и/или стадия применения второй композиции включает закачивание первой композиции или второй композиции как можно глубже в ствол скважины.
29. Способ по п. 15, в котором уровни сероводорода в пласте непрерывно контролируют во время одной или обеих фаз.
30. Способ по п. 15, в котором стадию закрытия пласта в первой фазе проводят в течение от около 3 до около 60 дней или до тех пор, пока уровень сероводорода не снизится до концентрации от около 0 до около 50 ч/млн.
31. Способ по п. 15, в котором увеличение концентрации сероводорода, которое наблюдается перед стадией применения второй композиции на второй фазе, представляет собой увеличение от около 50 до около 100 ч/млн.
32. Способ по п. 15, в котором стадию закрытия пласта во второй фазе проводят в течение от около 3 до около 60 дней или до тех пор, пока уровень сероводорода не снизится до концентрации от около 0 до около 50 ч/млн.
33. Способ по п. 15, включающий только первую фазу без второй фазы.
34. Способ по п. 15, включающий только вторую фазу без первой фазы.
35. Способ по п. 15, который снижает коррозию, вызванную микроорганизмами (MIC).
36. Способ по п. 15, используемый для борьбы с сульфатредуцирующими бактериями (SRB).
37. Способ по п. 15, используемый для снижения коррозии в трубопроводе, резервуаре, обсадной колонне, насосно-компрессорных трубах, стержне, насосе и/или стволе скважины на нефтепромысле.
38. Способ по п. 15, используемый для снижения превращения нефти с низким содержанием серы в нефть с высоким содержанием серы и/или увеличения превращения нефти с высоким содержанием серы в нефть с низким содержанием серы.
39. Способ по п. 15, в котором перед первой фазой или второй фазой способ включает стадию определения количества сероводорода в пласте.

40. Способ снижения кислотности природного газа, включающий применение второй композиции по пп. 9-14 к биологическому поглотителю и пропускание природного газа через указанный поглотитель.

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ УРОВНЯ  
 СЕРОВОДОРОДА И КОРРОЗИИ, ВЫЗВАННОЙ МИКРООРГАНИЗМАМИ, В СЫРОЙ  
 НЕФТИ, ПРИРОДНОМ ГАЗЕ И В СОПУТСТВУЮЩЕМ ОБОРУДОВАНИИ



ФИГ. 1



ФИГ. 2