

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992274** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2020.02.19

(51) Int. Cl. *C09K 8/582* (2006.01)
C09K 8/584 (2006.01)
C09K 8/588 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.04.09

(54) **ПРОДУКТЫ МИКРООРГАНИЗМОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ
ДОБЫЧИ НЕФТИ**

(31) 62/483,425

(32) 2017.04.09

(33) US

(86) PCT/US2018/026724

(87) WO 2018/191172 2018.10.18

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

(72) Изобретатель:

Фармер Шон, Алибек Кен, Мазумдер

Шармиста, Адамс Кент, Диксон

Тайлер, Чэнь Яцзе, Милованович

Майя (US)

(74) Представитель:

Тагбергенова А.Т., Тагбергенова М.М.

(KZ)

(57) Настоящее изобретение относится к композициям и способам микробиологического повышения добычи нефти с применением микроорганизмов, продуцирующих биохимические вещества. В конкретных вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают применение бактерий, продуцирующих био-ПАВ, и/или побочных продуктов их жизнедеятельности к нефтедобывающему участку. В предпочтительных вариантах осуществления бактерии представляют собой штамм *Bacillus* в форме спор. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают применение бактерии с продуктом ферментации дрожжей, щелочным соединением, полимером, небиологическим ПАВ и/или одним или более хелатирующими агентами. Предпочтительно настоящее изобретение может быть использовано для стимулирования потока нефти из скважины, а также растворения осадений, присутствующих в нефтеносном пласте.

A1

201992274

201992274

A1

ПРОДУКТЫ МИКРООРГАНИЗМОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ДОБЫЧИ НЕФТИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США с номером 62/483425, поданной 9 апреля 2017 г., которая включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Высокий спрос на ископаемое топливо требует эффективной добычи нефти. Когда нефтяные скважины становятся зрелым, продолжать выкачку нефти при экономически целесообразной скорости становится более трудным и дорогостоящим. Таким образом, существует необходимость в разработке улучшенных способов добычи нефти. Один из таких механизмов использует микроорганизмы и их побочные продукты жизнедеятельности.

Нефть существует в небольших порах и узких трещинах в пластовой породе под поверхностью земли. Естественное давление в пласте заставляет нефть вытекать на поверхность, обеспечивая тем самым первичную добычу; однако по мере добычи нефти пластовое давление снижается до точки, в которой требуется искусственный подъем или откачка для поддержания оптимальной скорости добычи нефти.

Когда необходимо подвести внешнюю энергию к пласту для достижения дополнительной добычи нефти (вторичная добыча), дополнительная энергия может быть введена путем подачи газа (нагнетания газа) и/или воды (заводнение). После нескольких лет работы на месторождении нагнетаемые жидкости текут преимущественно вдоль слоев с высокой проницаемостью, которые заставляют эти жидкости обходить нефтенасыщенные участки в пласте. Таким образом, увеличивающееся количество воды (или газа) поднимается вместе с нефтью и из-за уменьшения соотношения нефти к воде в конечном итоге становится нерентабельным продолжать процесс; в это время месторождение должно быть заброшено.

Первичная добыча обычно приводит к средней добыче только фракция нефти, изначально присутствующей в нефтеносном пласте. Вторичная добыча, например, заводнение, как правило, обеспечивает добычу еще 10 % к тому времени, как продолжать становится нерентабельно. Это не является необычным оставлять от 60 до 70 % нефти, изначально присутствующей в пласте, даже после того, как вторичная

добыча достигает экономического предела. В этой ситуации может рассматриваться третья стадия добычи нефти, так называемая третичная добыча.

На этом третичном этапе используются технически-передовые методы для изменения свойств либо пластовых жидкостей, либо характеристик пластовых пород. В целом методы могут быть разделены на четыре основные категории: термические методы, химические методы, смешивание или нагнетание растворителя и микробиологические методы.

Микробиологический метод повышения добычи нефти пластов (MEOR) — это междисциплинарная область, включающая, в частности, геологию, химию, микробиологию, механику жидкостей, технологию добычи нефтепродуктов, технологию моделирования эксплуатационных условий и химическую технологию. MEOR использует микроорганизмы и/или их метаболиты для повышения извлечения нефти. Микробиологические способы, используемые в MEOR могут быть направлены на очистку ствола скважины, чтобы удалить грязь и другой обломочный материал, блокирующий каналы, по которым течет нефть; стимуляция скважины, которая улучшает приток нефти из области дренажа в ствол скважины; и повышение закачивания воды, которое увеличивает микробиологическую активность путем введения выбранных микроорганизмов, а иногда и питательных веществ.

В MEOR питательные вещества и подходящие микроорганизмы, которые предпочтительно растут в условиях анаэробного пласта, вводятся в пласт. Побочные продукты жизнедеятельности микроорганизмов, которые могут включать биологические поверхностно-активные вещества (био-ПАВ), биополимеры, кислоты, растворители, газы и ферменты, например, могут изменять свойства нефти и обмен между нефтью, водой и пористой средой, изменять проницаемость подземных пластов, и в конечном итоге увеличивать мобильность и добычу нефти.

Интерес к ПАВ микроорганизмов неуклонно растет в последние годы в связи с их разнообразием, экологически чистой сущностью, возможностью крупномасштабного производства, селективностью, производительностью в экстремальных условиях, а также потенциальным применением в области охраны окружающей среды. Полученные микробиологическим способом ПАВ, т.е. био-ПАВ, уменьшают межфазное натяжение между водой и нефтью, и, следовательно, требуется более низкое гидростатическое давление для перемещения жидкости, захваченной в порах, чтобы преодолеть капиллярный эффект. Во-вторых, био-ПАВ способствуют

образованию мицелл, обеспечивающих физический механизм для мобилизации нефти в движущейся водной фазе.

Существует постоянная потребность в улучшенных способах добычи нефти, конкретных способах, которые могут быть устойчивыми в течение длительных периодов времени. Это включает потребность в усовершенствованных способах повышения добычи нефти, таких как способы с использованием, например, микроорганизмов и/или побочных продуктов их жизнедеятельности. Био-ПАВ повышают эмульгирования углеводородов, имеют способность сольбилизовать углеводородные загрязнители и повышают их доступность для разрушения микроорганизмами. Эти соединения могут быть также использованы при повышении добычи нефти.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В некоторых вариантах осуществления, в данном изобретении предложен микроорганизм, а также вещества, такие как био-ПАВ, растворители и/или ферменты, полученные от этих микроорганизмов, и ферментационный бульон, в котором они получены. В заявленном изобретении также предложены способы применения этих микроорганизмов и побочных продуктов их жизнедеятельности при улучшенной добыче нефти.

В частности, в настоящем изобретении предложены рентабельные, экологически чистые подходы к повышению добычи нефти. Преимущественно, эти способы могут быть осуществлены в широком диапазоне температур, в том числе от 20° С до 70° С и выше.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены материалы и способы для улучшения добычи нефти путем обработки нефтедобывающего участка, например, нефтеносного пласта или нефтяной скважины, микроорганизмами и/или побочными продуктами их жизнедеятельности. В одном варианте осуществления, настоящее изобретение может быть полезным для повышения добычи нефти из нефтяной скважины с помощью, например, стимуляции потока нефти из скважины во время растворения осадений внутри пласта.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение использует побочные продукты жизнедеятельности дрожжей, такие, как, например, био-ПАВ. Био-ПАВ полезны в нефтяной и газовой промышленности из-за их способности повышать добычу нефти. Био-ПАВ могут изменять свойства нефти и обмен между нефтью, водой

и пористой средой, в которой нефть и газ изначально находятся, тем самым увеличивая подвижность и, следовательно, добычу нефти. Таким образом, композиции и способы по настоящему изобретению могут увеличить добычу сырой нефти и природного газа из нефтегазосодержащих пластов, резко снижая как поверхностное, так и межфазное натяжение между веществами внутри пластов и изменяя смачиваемость пластов.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложены продукты ферментации дрожжей для повышения добычи нефти из нефтеносного пласта. В одном варианте осуществления продукт ферментации дрожжей получают путем культивирования био-ПАВ продуцирующих дрожжей с использованием процессов, варьирующихся от малого до крупного масштаба. Процесс культивирования может представлять собой, например, глубинное культивирование, твердофазную ферментацию (SSF) и/или их комбинацию. В одном варианте осуществления дрожжевые продукты выращивают с использованием упрощенной методики ферментации дрожжей, что сокращает время культивирования на 50 % и снижает добавление источника углерода.

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

Продукт ферментации дрожжей также может быть получен путем культивирования дрожжей, продуцирующих био-ПАВ, *Starmerella bombicola*. Ферментационный бульон после 5 дней культивирования при 25 °C может содержать суспензию дрожжевых клеток и, например, 150 г/л или более гликолипидных био-ПАВ.

Продукт дрожжевой ферментации может содержать ферментационный бульон, отделенный от дрожжевых клеток. В одном варианте осуществления био-ПАВ или другие побочные продукты жизнедеятельности в бульоне дополнительно отделяют от бульона и очищают.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении используют штаммы бактерий и их побочные продукты. Эти побочные продукты могут включать, например, метаболиты, полимеры, био-ПАВ, ферменты, органические кислоты и растворители. В некоторых вариантах осуществления бактерии являются штаммами *Bacillus*, которые активно растут в условиях высокого содержания соли, таких как те,

которые часто встречаются на участке добычи нефти. В некоторых вариантах осуществления бактерии являются штаммами *Bacillus* сверхпродуцентами ПАВ, что означает, что такие штаммы характеризуются повышенной продукцией био-ПАВ по сравнению со штаммами *Bacillus* дикого типа. В определенных вариантах осуществления штаммы *Bacillus* характеризуются увеличенным продуцированием фермента.

В одном варианте осуществления микроорганизмы являются штаммы *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* и/или *Bacillus amyloliquefaciens*. В предпочтительных вариантах осуществления бактерии представлены в виде спор.

В некоторых вариантах осуществления штаммы *Bacillus subtilis* способны активно расти в условиях низкого содержания кислорода, что способствует росту в микроаэрофильных и анаэробных условиях. В анаэробных условиях могут быть добавлены нитратные соли, чтобы заменить кислород в качестве акцептора электронов для поддержания микроаэрофильного и/или анаэробного дыхания.

В одном варианте осуществления штаммы *Bacillus subtilis* являются собой, например, штаммы *B. subtilis* var. *locuses* B1 и B2, которые являются эффективными продуцентами амфифильного липопептидного сурфактина.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен способ улучшения добычи нефти путем применения одного или нескольких микроорганизмов, способных продуцировать полезные побочные биохимические продукты, к нефтедобывающему участку, например, нефтеносному пласту и/или нефтяной скважине. Способ необязательно включает добавление питательных веществ и/или других агентов к участку. В некоторых вариантах осуществления микроорганизмы выбраны из штаммов *Bacillus*, включая штаммы *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* и *Bacillus amyloliquefaciens*, но не ограничиваясь ими. В предпочтительных вариантах осуществления бактерии представлены в виде спор.

Способ может также включать добавление продукта ферментации дрожжей, такого как ферментационный бульон, полученного в результате культивирования, например, *Starmerella bombicola* или *Wickerhamomyces anomalus*. В одном варианте осуществления, дрожжевые клетки могут быть удалены из продукта ферментации дрожжей и применяется только бульон, содержащий био-ПАВ и другие экссудаты клеток. В одном варианте осуществления продукт ферментации дрожжей содержит био-ПАВ, которые были отделены от ферментационного бульона и очищены.

Способ также может включать применение микроорганизмов и/или побочных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов с одним или несколькими щелочными соединениями. Щелочное соединение может представлять собой, например, гидроксид аммония.

В некоторых вариантах осуществления способ также может включать применение микроорганизмов и/или побочных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов с одним или несколькими полимерными соединениями. Полимерные соединения могут быть выбраны из биополимеров, таких как, например, гидрогели, полисахариды, ксантановая камедь, гуаровая камедь и полимеры целлюлозы.

В некоторых вариантах осуществления способ также может включать применение микроорганизмов и/или побочных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов с одним или несколькими небиологическими ПАВ. ПАВ могут быть, например, анионными, катионными, неионогенными или цвиттерионными.

В одном варианте осуществления, микроорганизмы и/или побочные продукты жизнедеятельности микроорганизмов могут быть применены с одним или более хелатирующими агентами для снижения, например, растворения, осадений, которые накопились внутри нефтеносного пласта. Этими хелатирующими агентами могут быть, например, лимонная кислота, ЭДТА, цитрат натрия и/или их комбинации.

В одном варианте осуществления, микроорганизмы могут расти и развиваться *in situ* внутри нефтеносного пласта или нефтяной скважины, и продуцировать в них био-ПАВ. Следовательно, высокая концентрация био-ПАВ и микроорганизмов, продуцирующих био-ПАВ, на участке обработки (например, в нефтяной скважине) может быть достигнута легко и непрерывно.

В некоторых вариантах осуществления продукты на основе микроорганизмов и способы по настоящему изобретению дополнительно могут быть использованы для удаления парафина, разжижения твердых асфальтенов и биоремедиации загрязненных углеводородами вод, почв и других участков. Для таких применений способы могут дополнительно включать добавление растворителей, таких как изопропиловый спирт или этанол, с микроорганизмами и/или побочными продуктами жизнедеятельности микроорганизмов.

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

относится к способам получения растворителей, ферментов или других белков путем культивирования штамма микроорганизма по настоящему изобретению в условиях, подходящих для роста, получения растворителей, ферментов или экспрессии белка; и очистки растворителя, фермента или другого белка.

Продукты на основе микроорганизмов по настоящему изобретению могут использоваться в различных уникальных условиях благодаря, например, способности эффективно доставлять: свежий ферментационный бульон с активными метаболитами; смесь клеток и ферментационный бульон; композиции с высокой плотностью клеток; продукты на основе микроорганизмов не требующие времени на их получение; и продукты на основе микроорганизмов в отдаленные места.

Преимущественно, настоящее изобретение может быть использовано без выделения больших количеств неорганических соединений в окружающую среду. Кроме того, в заявленных 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 экологически чистой обработки.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В некоторых вариантах осуществления, в данном изобретении предложен микроорганизм, а также вещества, такие как био-ПАВ, растворители и/или ферменты, полученные от этих микроорганизмов, и ферментационный бульон, в котором они получены. В заявленном изобретении также предложены способы применения этих микроорганизмов и побочных продуктов их жизнедеятельности при улучшенной добыче нефти.

В частности, в настоящем изобретении предложены рентабельные, экологически чистые подходы к повышению добычи нефти. Преимущественно, эти способы могут быть осуществлены в широком диапазоне температур, в том числе от 20° С до 70° С и выше.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены материалы и способы для улучшения добычи нефти путем обработки нефтесодобывающего участка микроорганизмами и/или побочными продуктами их жизнедеятельности. В одном варианте осуществления, настоящее изобретение может быть полезным для повышения добычи нефти из нефтеносного пласта или нефтяной

скважины с помощью, например, стимуляции потока нефти из пласта или скважины во время растворения осадений в них.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение использует побочные продукты жизнедеятельности дрожжей, такие, как, например, био-ПАВ. Био-ПАВ полезны в нефтяной и газовой промышленности из-за их способности повышать добычу нефти. Био-ПАВ могут изменять свойства нефти и обмен между нефтью, водой и пористой средой, в которой нефть и газ изначально находятся, тем самым увеличивая подвижность и, следовательно, добычу нефти. Таким образом, композиции и способы по настоящему изобретению могут увеличить добычу сырой нефти и природного газа из нефтегазосодержащих пластов, резко снижая как поверхностное, так и межфазное натяжение между веществами внутри пластов и изменяя смачиваемость пластов.

В конкретных вариантах осуществления способы и композиции, описанные в настоящем документе, используют микроорганизмы для повышения добычи нефти. Микроорганизмы могут улучшить количество и качество масла, добываемое из нефтяных пластов, в том числе тех, которые считаются «зрелыми». Кроме того, микроорганизмы могут удалять токсичные вещества из участков добычи нефти.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены материалы и способы для улучшения добычи нефти путем обработки нефтедобывающего участка микроорганизмами и/или побочными продуктами их жизнедеятельности. В одном варианте осуществления, настоящее изобретение может быть полезным для повышения добычи нефти из нефтеносного пласта или нефтяной скважины с помощью, например, стимуляции потока нефти из скважины или пласта.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен способ улучшения добычи нефти путем применения одного или нескольких микроорганизмов, способных продуцировать полезные побочные биохимические продукты, к нефтедобывающему участку, например, нефтеносному пласту и/или нефтяной скважине. Способ необязательно включает добавление питательных веществ и/или других агентов к участку. В некоторых вариантах осуществления микроорганизмы выбраны из штаммов *Bacillus*, включая штаммы *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* и *Bacillus amyloliquefaciens*, но не ограничиваясь ими. В предпочтительных вариантах осуществления бактерии представлены в виде спор.

В некоторых вариантах осуществления бактерии являются штаммами *Bacillus*, которые активно растут в условиях высокого содержания соли, таких как те, которые часто встречаются на участке добычи нефти. В некоторых вариантах осуществления

бактерии являются штаммами *Bacillus* сверхпродуцентами ПАВ, что означает, что такие штаммы характеризуются повышенной продукцией био-ПАВ по сравнению со штаммами *Bacillus* дикого типа. В определенных вариантах осуществления штаммы *Bacillus* характеризуются увеличенным продуцированием фермента.

Способ может также включать добавление продуктов ферментации дрожжей, таких как ферментационный бульон, полученный в результате культивирования дрожжей, продуцирующих биохимические вещества, например, *Starmerella bombicola* или *Wickerhamomyces anomalus*. В одном варианте осуществления продукт ферментации дрожжей содержит очищенные био-ПАВ, продуцированные этими дрожжами.

Способ также может включать применение микроорганизмов с одним или несколькими щелочными соединениями, полимерами, ПАВ и/или хелатирующими агентами.

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 (например, био-ПАВ), компоненты клеточной мембраны, экспрессированные белки и/или другие клеточные компоненты. Микроорганизмы могут быть целыми или лизированными. Клетки могут отсутствовать, или клетки могут присутствовать, например, в концентрации 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , или 1×10^{11} или более клеток или пропагул на миллилитр композиции. Используемый в данном документе термин пропегула означает любую часть микроорганизма, из которой может развиваться новый и/или зрелый организм, включая клетки, конидии, цисты, споры (например, репродуктивные споры, эндоспоры и экзоспоры), 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, такие как гормоны растений, и/или агенты, которые облегчают отслеживание микроорганизмов и/или композиции в среде, в которой они применяются. Продукт на основе микроорганизмов может также содержать смеси композиций на основе микроорганизмов. Продукт на основе микроорганизмов может также содержать один или несколько компонентов композиции на основе микроорганизмов, которые были обработаны каким-либо образом, таким как фильтрация, центрифугирование, лизирование, сушка, очистка и тому подобное, но не ограничиваясь ими.

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

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

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

существовать в виде, например, биологически чистой культуры или в виде спор (или других форм штамма) в сочетании с носителем. Очищенный или выделенный полинуклеотид (рибонуклеиновая кислота (РНК) или дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК)) не содержит генов или последовательностей, которые фланкируют его в своем естественном состоянии. Очищенный или выделенный полипептид не содержит аминокислот или последовательностей, которые его фланкируют в своем естественном состоянии.

В определенных вариантах осуществления очищенные соединения составляют по меньшей мере 60 мас. % (сухой вес) представляющего интерес соединения. Предпочтительно препарат составляет, по меньшей мере, 75 мас. %, более предпочтительно, по меньшей мере, 90 мас. % и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 99 мас. % представляющего интерес соединения. Например, очищенное соединение представляет собой соединение, которое составляет по меньшей мере 90 мас. %, 91 мас. %, 92 мас. %, 93 мас. %, 94 мас. %, 95 мас. %, 98 мас. %, 99 мас. % или 100 мас. % желаемого соединения по массе. Чистота измеряется любым подходящим стандартным методом, например, колоночной хроматографией, тонкослойной хроматографией или высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ).

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

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

Представленные в данном документе диапазоны считаются условным обозначением для всех значений в указанном диапазоне. Например, под диапазоном от 1 до 50 понимают любое значение, комбинацию значений или поддиапазон из группы, включающей 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49

или 50, а также все промежуточные десятичные значения между вышеупомянутыми целыми числами, такие как, например, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и 1,9. Что касается поддиапазонов, специально предусмотрены «охваченные поддиапазоны», которые находятся в пределах любой конечной точки диапазона. Например, охваченный поддиапазон примерного диапазона от 1 до 50 может содержать от 1 до 10, от 1 до 20, от 1 до 30 и от 1 до 40 в одном направлении, или от 50 до 40, от 50 до 30, от 50 до 20 и от 50 до 10 в другом направлении.

Под термином «уменьшает» подразумевают отрицательное изменение, составляющее, по меньшей мере, 1 %, 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 % или 100 %.

Под термином «референтный» подразумевают стандартное или контрольное условие.

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

Используемый в данном документе термин «биопленка» представляет собой сложный агрегат микроорганизмов, таких как бактерии, в котором клетки склеены друг с другом. 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 «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 «добыча нефти» относится к любым и всем операциям, связанным с добычей углеводородов, таких как сырая нефть или природный газ, из пласта, его последующей переработкой и использованием потребителями. Добыча нефти может включать бурение, откачку, добычу, перекачивание, обработку, переработку, транспортировку и хранение углеводородов, но не ограничивается ими.

Термин «нефтедобывающий участок» относится к любой среде или структуре, будь они природного или техногенного происхождения, в которых происходит один или несколько процессов добычи углеводородов, нефти и/или природного газа,

включая подземные пласты, нефти нефтегазосодержащие пласты, скважины и стволы скважин, но не ограничиваясь ими.

Используемый в данном документе термин «осаждения» относится к накоплениям, образованным, например, отложений осажденных минеральных солей, которые могут возникнуть в результате, например, изменения в давлении, составе и/или температуре сырой нефти. Осаждения могут быть результатом осадков, например, сульфата бария, карбоната кальция, сульфата стронция, сульфата кальция, хлорида натрия, диоксида кремния, сульфида железа, оксидов железа, карбоната железа, силикатов, фосфатов и оксидов, или любым из ряда соединений, которые являются нерастворимыми или слабо растворимыми в воде.

Используемые в данном документе термин «улучшение добычи нефти» включает повышение добычи нефти и углеводородов, а также означает увеличение количества добытых углеводородов и/или увеличение скорости, с которой их добывают, например, путем стимулирования потока нефти из скважины.

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.

Изложение перечня химических групп в любом определении переменной в данном документе включает определения этой переменной как любой отдельной

группы или комбинации указанных в перечне групп. Изложение варианта осуществления для переменной или аспекта в данном документе включает этот вариант осуществления в качестве любого отдельного варианта осуществления или в сочетании с любыми другими вариантами осуществления или их частями.

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

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

Побочные продукты жизнедеятельности микроорганизмов в соответствии с заявленным изобретением

В предпочтительных вариантах осуществления композиция предназначена для улучшения и/или повышения добычи нефти из участка добычи нефти, причем композиция содержит один или более микроорганизмов и/или побочные продукты их жизнедеятельности. В конкретных вариантах осуществления микроорганизмы способны продуцировать один или несколько био-ПАВ и используются для этого.

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

Все био-ПАВ 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 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 антибактериальных, 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 для разных применений. Указанные применения включают повышение добычи сырой нефти, снижение вязкости нефти, удаление парафина из стержней, трубопроводов, хвостовиков и насосов, предотвращение коррозии нефтяного оборудования, жидкости для гидроразрыва, снижение концентрации H_2S в добытой сырой нефти, а также очистка резервуаров, отводной линии и трубопроводов, но не ограничиваются ими.

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

Био-ПАВ, полученные в соответствии с заявленным изобретением, могут быть использованы для других целей, не связанных с добычей нефти, включая, например, очистку трубопроводов, реакторов и других механизмов или поверхностей.

Био-ПАВ включают гликолипиды (GL) с низкой молекулярной массой, липопептиды (LP), флаволипиды (FL), 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.

В одном варианте осуществления микробные био-ПАВ, согласно настоящему изобретению, включают гликолипиды, такие как рамнолипиды (RLP), софоролипиды (SLP), трегалозные липиды или липиды маннозилеритрита (MEL).

В одном варианте осуществления микробный био-ПАВ является липопептидом, таким как, например, сурфактин или итурин А.

Био-ПАВ микроорганизмов вырабатываются различными микроорганизмами, такими как бактерии, грибы и дрожжи. Иллюстративные микроорганизмы, продуцирующие био-ПАВ, включают виды *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. putida*, *P.*

florescens, *P. fragi*, *P. syringae*); *Pseudozyma* (*P. aphidis*); *Flavobacterium* spp.; *Pichia* spp. (*P. anomala*, *P. lynferdii*, *P. guilliermondii*, *P. sydowiorum*), *Bacillus* spp. (*B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumillus*, *B. cereus*, *B. licheniformis*); *Wickerhamomyces* spp. (*W. anomalus*), *Starmerella* spp. (*S. bombicola*), *Candida* spp. (*C. albicans*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *C. lipolytica*, *C. torulopsis*); *Rhodococcus* spp.; *Arthrobacter* spp.; *Campylobacter* spp.; *Cornybacterium* spp. и так далее. Био-ПАВ могут быть получены известными в данной области техники способами ферментации.

Культивирование микроорганизмов в соответствии с заявленным изобретением

В заявленном изобретении используют способы культивирования микроорганизмов и продуцирования микробных метаболитов и/или других побочных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов. Настоящее изобретение дополнительно использует процессы культивирования, которые подходят для культивирования микроорганизмов и получения метаболитов микроорганизмов в желаемом масштабе. Системы культивирования микроорганизмов обычно используют глубинное культивирование культур; тем не менее, поверхностные культуры и гибридные системы также могут быть использованы. Используемый в данном документе термин «культивирование» относится к выращиванию клеток в контролируемых условиях. Культивирование может быть аэробным или анаэробным.

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

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

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

В одном варианте осуществления способ включает дополнение культивирования источником азота. Источником азота может быть, например, нитрат калия, нитрат аммония, сульфат аммония, фосфат аммония, аммиак, мочевины 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, пропанол, бутанол, пентанол, гексанол, изобутанол и/или глицерин; жиры и масла, такие как соевое масло, масло рисовых отрубей, оливковое масло, масло канолы, кокосовое 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. Антимикробные агенты или антибиотики могут использоваться 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 °С, предпочтительно от 15 до 60 °С, более предпочтительно от 25 до 50 °С. 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 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 клеток или плотности указанного метаболита в бульоне). В указанном периодическом режиме культивирования совершенно новая партия начинается после получения первой партии.

В другом варианте осуществления только часть продукта ферментации удаляется одновременно. В этом варианте осуществления биомасса с жизнеспособными 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 потребления энергии. Представляющие интерес микроорганизмы можно культивировать в малом или крупном масштабе на месте и использовать, даже все еще смешанными с питательной средой. Аналогичным образом, микробные метаболиты могут также продуцироваться в больших количествах в нужном месте.

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

Микроорганизмами, используемые в соответствии с системами и способами по настоящему изобретению, могут быть, например, бактерии, дрожжи и/или грибы. Эти микроорганизмы могут быть природными или генетически модифицированными микроорганизмами. Например, микроорганизмы могут быть трансформированы специфическими генами для проявления специфических характеристик. Микроорганизмы также могут быть мутантами желаемого штамма. Используемый в данном документе термин «мутант» означает штамм, генетический вариант или подтип эталонного микроорганизма, причем мутант имеет одну или несколько генетических вариаций (например, точечную мутацию, миссенс-мутацию, нонсенс-мутацию, делецию, дупликацию, мутацию со сдвигом рамки или экспансию повторов) по сравнению с эталонным микроорганизмом. Процедуры получения мутантов хорошо

известны в области микробиологии. Например, УФ мутагенез и нитрозогуанидин широко используются для этой цели.

В одном варианте осуществления микроорганизмы представляют собой бактерии, включая грамположительные и грамотрицательные бактерии. Бактерии могут быть бактериями, образующими эндоспоры или экзоспоры. Бактерии могут быть, например *Agrobacterium radiobacter*, *Alcanivora borkumensis*, *Azobacter* (*A. vinelandii*, *A. chroococcum*), *Azospirillum brasiliensis*, *Bacillus* (например, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. firmus*, *B. laterosporus*, *B. megaterium*, *B. amyloliquefaciens*), *Clostridium* (*C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*, *C. acetobutyricum*, *Clostridium* NIPER 7 и *C. beijerinckii*), *Lactobacillus fermentum*, *Norcardia sp.*, *Pseudomonas* (*P. chlororaphis subsp. aureofaciens* (Kluyver), *P. aeruginosa*), *Rhizobium*, *Rhodospirillum rubrum*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Ralstonia eulropha*, *Serratia marcescens* и/или *Tsukamurella sp.*

В предпочтительных вариантах осуществления микроорганизм представляет собой штамм *Bacillus*, выбранный из видов *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* и *B. licheniformis*. Еще более предпочтительно, штамм *Bacillus* в форме спор.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении используют штаммы *Bacillus subtilis* с повышенной продукцией био-ПАВ по сравнению с диким типом *Bacillus subtilis*, а также по сравнению с другими микроорганизмами, используемыми при добыче нефти. В определенных вариантах осуществления штаммы *Bacillus subtilis* увеличивают производство биополимерного растворителя и/или фермента. Такие *Bacillus subtilis* были названы членами серии В, включая В1, В2 и В3, но не ограничиваясь ими.

В одном варианте осуществления микроорганизм представляет собой *B. subtilis var. locuses* В1 или В2, которые являются эффективными продуцентами, например, сурфактина и других био-ПАВ, а также биополимеров. В данное описание включена международная публикация WO 2017/044953 А1 в качестве ссылки в той степени, в которой она соответствует раскрытию данной заявки.

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

Вегетативные клетки штамма *Bacillus subtilis* В1 являются палочками, которые имеют ширину от 0,7 до 0,9 мкм, длину от 1,6 до 3,3 мкм и находятся по отдельности. Он подвижен, грамположительный и продуцирует биополимеры на питательном агаре

и картофельном агаре с декстрозой. Он также продуцирует эллипсоидальные споры централизованно или парацентрализованно в ненабухших спорангиях. Размер зрелых спор составляет 0,8 до 1,0 мкм в ширину и 1,6 до 1,9 мкм в длину. После 16 часов при 40° С на чашке с питательным агаром колонии на агаре имеют кремовый/бежевый цвет, рельефные, слизистые, круглые, сплошные, гладкие, блестящие и от 3,0 до 7,0 мм в диаметре. Он является факультативный аэробом с диапазоном температур роста от 25-55° С, с оптимальной температурой роста при 35° С. Он гидролизует крахмал, дает положительный результат в пробе Фогеса-Проскауера, может использовать цитрат и может расти при 15 % NaCl.

В определенных вариантах осуществления штаммы *Bacillus subtilis* являются солеустойчивыми. Солеустойчивость может быть по отношению к любой одной или нескольким солям. Например, соль может быть одновалентной солью, такой как соль натрия или калия, например, NaCl или KCl, или двухвалентной солью, такой как соль магния или кальция, например, MgCl₂ или CaCl₂, или трехвалентной солью. Учитывая географическое положение участков, подлежащих обработке, в композиции или участке присутствуют соли цинка, железа, брома или лития. В предпочтительных вариантах осуществления, бактерии, описанные в данном документе, являются толерантными к NaCl, а также другим вышеуказанным солям, и, следовательно, широко используемые для добычи нефти.

В некоторых вариантах осуществления штаммы *Bacillus subtilis* способны активно расти в условиях низкого содержания кислорода. В некоторых вариантах осуществления штамм *Bacillus subtilis* выращивают в микроаэрофильных и анаэробных условиях. В микроаэрофильных и/или анаэробных условиях в качестве акцептора электронов можно добавлять соли нитратов для поддержки анаэробного дыхания.

Штамм серии В *Bacillus subtilis* продуцирует больше био-ПАВ по сравнению с эталонными штаммами *Bacillus subtilis*. Кроме того, штаммы *Bacillus subtilis* выживают в условиях высокого содержания соли и анаэробных условиях лучше, чем другие известные штаммы. Штаммы также способны расти в анаэробных условиях. Штаммы *Bacillus subtilis* серии В также могут быть использованы для продуцирования ферментов, которые разрушают или метаболизируют нефть, или другие нефтепродукты.

В одном варианте осуществления заявленные способы могут использовать продукты ферментации дрожжей или грибов. Виды дрожжей и грибов, пригодные для использования согласно настоящему изобретению, включают, например, *Candida*,

Saccharomyces (*S. cerevisiae*, *S. boulardii sequela*, *S. torula*), *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Wickerhamomyces* (например, *W. anomalus*), *Starmerella* (например, *S. bombicola*), *Rhodotorula* (например, *R. glutinous* и *R. graminus*), *Mycorrhiza*, *Mortierella*, *Phycomyces*, *Blakeslea*, *Thraustochytrium*, *Phythium*, *Entomophthora*, *Aureobasidium pullulans*, *Pseudozyma aphidis*, *Aspergillus* и/или *Rhizopus spp.*

В одном варианте осуществления дрожжи являются дрожжами-киллерами. Используемый в данном документе термин «дрожжи-киллеры» означает штамм дрожжей, характеризующийся секрецией токсических белков или гликопротеинов, против которого сам штамм является невосприимчивым. Экзотоксины, выделяемые дрожжами-киллерами, способны убивать другие штаммы дрожжей, грибов или бактерий. Например, микроорганизмы, с которыми можно бороться дрожжами-киллерами, включают *Fusarium* и другие нитчатые грибы. Такие дрожжи могут включать, *Wickerhamomyces* (например, *W. anomalus*), *Pichia* (например, *P. anomala*, *P. guilliermondii*, *P. occidentalis*, *P. kudriavzevii*), *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, (например, *H. uvarum*), *Ustilago* (например, *U. maydis*), *Debaryomyces hansenii*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Torulopsis*, *Williopsis*, *Zygosaccharomyces* (например, *Z. bailii*), и другие, но не ограничиваются ими.

В одном варианте осуществления продукт ферментации дрожжей может быть получен путем культивирования дрожжей, продуцирующих биохимические вещества, таких как, например, *Pichia anomala* (*Wickerhamomyces anomalus*). *Wickerhamomyces anomalus* часто ассоциируют с производством пищевых и зерновых продуктов, и он является эффективным продуцентом различных растворителей, ферментов, токсинов, а также гликолипидных био-ПАВ, таких как SLP. Ферментационный бульон после 7 дней культивирования при 25-30 °С может содержать суспензию дрожжевых клеток и, например, 4 г/л или более гликолипидных био-ПАВ.

В одном варианте осуществления продукт ферментации дрожжей также может быть получен путем культивирования дрожжей, продуцирующих био-ПАВ, *Starmerella bombicola*. Этот вид является эффективным продуцентом гликолипидов био-ПАВ, таких как SLP. Ферментационный бульон после 5 дней культивирования при 25 °С может содержать суспензию дрожжевых клеток и, например, 150 г/л или более гликолипидных био-ПАВ.

В одном варианте осуществления продукт дрожжевой ферментации может содержать ферментационный бульон, отделенный от дрожжевых клеток. В одном

варианте осуществления био-ПАВ или другие побочные продукты жизнедеятельности в бульоне дополнительно отделяют от бульона и очищают.

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

Приготовление продуктов на основе микроорганизмов

Одним из продуктов на основе микроорганизмов по настоящему изобретению является просто ферментационный бульон, содержащий микроорганизм и/или метаболиты микроорганизмов, продуцируемые микроорганизмом, и/или любые остаточные питательные вещества. Продукт ферментации может быть использован непосредственно без экстракции или очистки. При желании экстракция и очистка могут быть легко достигнуты с использованием стандартных методов или методик экстракции, известных специалистам в данной области.

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

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

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.

В других вариантах осуществления композиция (микроорганизмы, бульон или микроорганизмы и бульон) может быть помещена 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 помещена композиция на основе микроорганизмов, могут иметь объем, например, от 1 до 1000 галлонов или более. В определенных вариантах осуществления контейнеры имеют объем 2 галлона, 5 галлонов, 25 галлонов или больше.

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

Например, до 50 мас. % или более добавок могут быть добавлены, по мере необходимости, для конкретных применений, таких как, например, изменение уровней летучих органических соединений, увеличение проникновения смеси, уменьшение вязкости смеси, в качестве соединителей для нерастворимых растворителей в смеси и для обеспечения растворителей. Все добавки должны иметь температуру воспламенения более 100° F, предпочтительно более 150° F и более предпочтительно 195° F термokatалитического сгорания для достижения конечной температуры воспламенения продукта более 200° F.

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.

В заявленном изобретении используют процессы культивирования, которые варьируют от небольших (например, лабораторная установка) до крупных (например, промышленная установка) масштабов. Указанные процессы культивирования включают глубинное культивирование/ферментацию, твердофазную ферментацию (SSF) и их комбинацию, но не ограничиваются ими.

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

Преимущественно заявленные продукты на основе микроорганизмов 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. 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 производится локально, на месте или вблизи места применения, не прибегая к процессам стабилизации микроорганизмов, консервации, хранения и транспортировки обычного получения микроорганизмов, может быть получена гораздо более высокая плотность живых микроорганизмов. Таким образом, для применения на месте требуется меньший объем продукта на основе микроорганизмов. Кроме того, это делает возможным применения микроорганизмов с более высокой плотностью, где это необходимо для достижения желаемой эффективности.

Преимущественно, это позволяет использовать уменьшенный биореактор (например, меньший резервуар для ферментации и меньшие запасы исходного

материала, питательных веществ, агентов для регулирования рН и пеногасителей, и т. д.), что делает систему эффективной и облегчает портативность продукта. Локальное получение продукта на основе микроорганизмов также способствует включению в продукт ростового бульона, таким образом, устраняя потребность в стабилизации клеток или отделения их от культурального 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 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, споры, мицелий, конидии или другие пропагулы микроорганизмов 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.

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.

Установки для выращивания микроорганизмов обеспечивают универсальность производства за счет способности адаптировать продукты на основе микроорганизмов для улучшения синергии с географическими точками назначения. Преимущественно, в предпочтительных вариантах осуществления системы по настоящему изобретению используют возможности природных микроорганизмов и их побочных продуктов их метаболизма для улучшения добычи нефти. Местные микроорганизмы могут быть идентифицированы на основании, например, солеустойчивости или способности расти при высоких температурах.

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

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.

Методы повышения добычи нефти

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены материалы и способы для улучшения добычи нефти путем обработки нефтесодержащего участка, например, нефтеносного пласта или нефтяной скважины, микроорганизмами и/или побочными продуктами их жизнедеятельности. В одном варианте осуществления, настоящее изобретение может быть полезным для повышения добычи нефти из нефтяной скважины с помощью, например, стимуляции потока нефти из скважины во время растворения осадений внутри пласта.

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, обсадную колонну, в межтрубное пространство между трубопроводом и обсадной колонной, насосы, резервуары и т.д., связанные с нефтесодержащими участками и нефтеносными пластами.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен способ улучшения добычи нефти путем применения одного или нескольких микроорганизмов, способных продуцировать полезные побочные биохимические продукты, к нефтесодержащему участку, например, нефтеносному пласту и/или нефтяной скважине. Способ необязательно включает добавление питательных веществ и/или других агентов к участку. В предпочтительных вариантах осуществления микроорганизм представляет собой виды бактерий, продуцирующих био-ПАВ.

В некоторых вариантах осуществления, микроорганизмы выбраны из штаммов *Bacillus*, включая штаммы *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* и *Bacillus amyloliquefaciens*, но не ограничиваясь ими. В предпочтительных вариантах осуществления бактерии представлены в виде спор.

В одном варианте осуществления способ дополнительно включает добавление питательных веществ и/или усилителей роста стимуляции роста и развития микроорганизмов. Например, могут быть добавлены питательные вещества, такие как источники углерода, азота, магния, фосфора и белка. Также могут быть добавлены усилители роста, такие как L-аланин и марганец.

Способ может также включать добавление продукта ферментации дрожжей, такого как ферментационный бульон, полученного в результате культивирования, например, *Starmerella bombicola* или *Wickerhamomyces anomalus*. В одном варианте осуществления дрожжи представляют собой дрожжи, продуцирующие био-ПАВ. В одном варианте осуществления ферментационный бульон содержит побочные продукты жизнедеятельности дрожжей, такие как, например, гликолипидные био-ПАВ и другие метаболиты.

В одном варианте осуществления, дрожжевые клетки могут быть удалены из продукта ферментации дрожжей и применяется только бульон, содержащий био-ПАВ и другие метаболиты. В одном варианте осуществления продукт ферментации дрожжей содержит био-ПАВ, которые были отделены от ферментационного бульона и очищены.

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

Способ также может включать применение микроорганизмов и/или побочных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов с одним или несколькими щелочными соединениями. Щелочное соединение может представлять собой, например, гидроксид аммония.

В некоторых вариантах осуществления способ также может включать применение микроорганизмов и/или побочных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов с одним или несколькими полимерными соединениями. Полимерные

соединения могут быть выбраны из биополимеров, таких как, например, гидрогели, полисахариды, ксантановая камедь, гуаровая камедь и полимеры целлюлозы.

В некоторых вариантах осуществления способ также может включать применение микроорганизмов и/или побочных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов с одним или несколькими небактериальными ПАВ. ПАВ могут быть, например, анионными, катионными, неионогенными или цвиттерионными.

В одном варианте осуществления, микроорганизмы и/или побочные продукты жизнедеятельности микроорганизмов могут быть применены с одним или более хелатирующими агентами для снижения, например, растворения, осадений, которые накопились внутри нефтеносного пласта. Этими хелатирующими агентами могут быть, например, лимонная кислота, ЭДТА и/или цитрат натрия.

В некоторых вариантах осуществления продукты на основе микроорганизмов и способы по настоящему изобретению дополнительно могут быть использованы для удаления парафина, разжижения твердых асфальтенов и биоремедиации загрязненных углеводородами вод, почв и других участков.

В одном варианте осуществления продукты на основе микроорганизмов применяются к рабочей скважине, включая окружающий пласт. В этом варианте осуществления продукт можно наливать или вводить в обсадную колонну (задние линии) скважины и обеспечивать возможность его смешивания с уже присутствующей жидкостью в скважине. Когда присутствует достаточное количество жидкости, композицию можно при желании циркулировать, например, с помощью насоса в течение 24-72 часов, предпочтительно 48-72 часов. Перед циркуляцией композиции можно дать опуститься, например, в течение 8-24 часов. Время опускания, время циркуляции и дозировка зависят от глубины и размера скважины. Базовая начальная доза может составлять 20 галлонов композиции и, по меньшей мере, приблизительно 5 галлонов композиции на скважину на периодической основе, например, раз в две недели, ежемесячно, раз в два месяца, но не ограничиваясь этим.

В одном варианте осуществления, микроорганизмы могут расти и развиваться *in situ* и продуцировать био-ПАВ на нефтедобывающем участке. Следовательно, высокая концентрация био-ПАВ и микроорганизмов, продуцирующих био-ПАВ, на участке обработки (например, в нефтяной скважине) может быть достигнута легко и непрерывно.

В одном варианте осуществления желательно вводить композицию через отверстия в обсадной колонне в окружающий нефтеносный пласт. Композиция может

нагнетаться в окружающий пласт под действием давления или, если композиции позволить опуститься на дно обсадной колонны, композиция может просочиться в пласт без дополнительного давления. Композиция проникает в пласт, растворяя закупорки в пласте, чтобы обеспечить более эффективную добычу нефти и газа.

В дополнительных вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению может применяться непосредственно к оборудованию. Например, перед размещением стержней и обсадных колонн в газовых и/или нефтяных скважинах эти части могут быть опрысканы или пропитаны композицией. Части также могут быть погружены в резервуары, заполненные композицией.

Композицию можно вводить с помощью нагнетательных насосов в газовые или нефтяные скважины на шельфе для повышения добычи нефти. Для обработки трубопровода, от 1-500 галлонов до 1000 баррелей, например, 10000 баррелей или более композиции можно применить к композиции со скоростью введения, например, от 1 до 20 галлонов в минуту, или от 1 до 20 баррелей в минуту.

Заявленная обработка может быть эффективной в ряде различных геологических пластов. Например, заявленное изобретения может быть полезно в пластах так глубоко, как примерно 7000 футов или глубже, и таких поверхностных, как примерно 1500 футов или меньше. Кроме того, изобретение может быть полезным в пластах, имеющих диапазон пористости и/или проницаемости, например, от примерно 0,1 % до примерно 20 % или более. Изобретение также может быть полезным в пластах, имеющих широкий диапазон температур, pH и солености.

В одном варианте осуществления повышение добычи нефти достигают за счет селективного закупоривания, в котором поток жидкости через пласт сдвинут из зон высокой проницаемости пласта к зонам умеренной или низкой проницаемости. Эффективность вытеснения может быть увеличена, например, введением с силой воды, чтобы пройти через ранее обойденные нефтяные зоны пласта. Изменения в структуре потока могут быть достигнуты за счет увеличения клеточной массы микроорганизмов внутри пласта, например, путем введения микроорганизмов вместе с питательными веществами. Введенные питательные вещества и микроорганизмы, предпочтительно текут в зоны высокой проницаемости пласта и в результате роста клеток, биомасса селективно закупоривает указанные зоны в большей степени, чем зоны с умеренной или низкой проницаемостью. В одном варианте осуществления, микроорганизмы вводят в споровой форме, и они развиваются, будучи внутри пласта.

Способ повышения добычи нефти с помощью способа заводнения с применением щелочей, ПАВ и полимеров (АСП)

В одном варианте осуществления предложены способы для повышения добычи нефти, в которых продукт на основе микроорганизма согласно заявленному изобретению, применяют к участку добычи нефти в комбинации с одним или более щелочными соединениями, полимерами, ПАВ или их комбинациями.

При заводнении с применением ПАВ за счет снижения межфазного натяжения на границе раздела между нефтью и вытесняющей водой, а также межфазного натяжения между нефтью и породой на границе раздела, остаточная нефть может быть вытеснена и извлечена.

В заводнении с применением щелочей, реакция щелочных соединений с органическими кислотами в нефти формирует на месте природные ПАВ, которые понижают водно-нефтяное межфазное натяжение.

В дополнении к заводнению с применением ПАВ и щелочей, используют полимеры для увеличения вязкости вытесняющей воды, чтобы улучшить эффективность вытеснения нефти.

Заводнение АСП представляет собой процесс, в котором вводят комбинацию щелочи, ПАВ и полимера. АСП включает введение раствора, содержащего полимер, щелочь и ПАВ в обедненное или созревшее нефтяное месторождение с целью достижения оптимальной химического состава при больших объемах введения для минимальной стоимости. Смесь щелочь-ПАВ образует эмульсию с нефтью, которая затем вытесняется из пласта с использованием стимула полимером. Заводнение АСП улучшает эффективность микроскопического вытеснения за счет снижения межфазного натяжения (IFT) между водой и нефтью путем добавления к воде ПАВ, во время подбора подвижности нефти и воды путем добавления полимера. Щелочь также добавляют в воду для снижения адсорбции ПАВ в порах стен и для контроля местной солености, чтобы обеспечить минимальное IFT и изменить смачиваемость породы.

Применение микроорганизмов с ПАВ в добыче нефти

В некоторых вариантах осуществления способы добычи нефти, описанные в данном документе, используют один или несколько микроорганизмов и/или побочных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов (например, био-ПАВ), в сочетании с другими композициями. В одном варианте осуществления другие композиции являются небиологическими ПАВ.

Молекула ПАВ (поверхностно-активный агент) имеет две функциональные группы, а именно гидрофильную (водорастворимую) или полярную группу и гидрофобную (маслорастворимую) или неполярную группу. Гидрофобная группа, как правило, представляет собой длинную углеводородную цепь (C8-C18), которая может быть разветвленной или нет, в то время как гидрофильная группа образована остатками, такими как карбоксилаты, сульфаты, сульфонаты (анионные), спирты, полиоксиэтилированные цепи (неионные) и четвертичные аммониевые соли (катионные).

ПАВ работают при заводнении АСП для снижения межфазного натяжения (IFT) между захваченной нефтью и насыщенным соляным раствором, чтобы помочь в мобилизации и обеспечить формирование нефтяных валов. Снижение IFT снижает капиллярные силы и позволяет нефтяному валу течь более свободно, без возобновления захвата. Выбор соответствующего ПАВ для целей повышения добычи нефти основан на способности снижать IFT между сырой нефтью и соевым раствором, термической стабильности, устойчивости к солености и жесткости солевого раствора, растворимости в соевом растворе, параметров фазового поведения, испытания адсорбции при статических и динамических условиях и исследованиях вытеснения в условиях пласта.

ПАВ в соответствии с заявленными способами включают: анионные ПАВ, лаурил сульфат аммония, лаурилсульфат натрия (также называемый SDS, додецилсульфат натрия), алкилэфирсульфаты лаурет сульфата натрия (также известные как эфир лауретсульфат натрия (SLES)), мирет сульфат натрия; докузаты, диоктилсульфосукцинат натрия, перфтороктансульфонат (PFOS), перфторбутансульфонат, линейные алкилбензолсульфонаты (LAB), алкиларилэфир фосфаты, алкилэфир фосфат; карбоксилаты, алкилкарбоксилаты (мыла), стеарат натрия, лаурилсаркозинат натрия, фторсодержащие ПАВ на основе карбоксилата, перфторнонаноат, перфтороктаноат; катионные ПАВ, pH-зависимые первичные, вторичные или третичные амины, октенидин дигидрохлорид, четвертичные аммониевые катионы с постоянным зарядом, алкилтриметиламмониевые соли, цетилтриметиламмония бромид (СТАВ) (также известен как гексадецилтриметиламмония бромид), цетилтриметиламмония хлорид (СТАС), цетилпиридиний хлорид (СРС), бензалкония хлорид (ВАС), бензетония хлорид (ВЗТ), 5-бromo-5-нитро-1,3-диоксан, диметилдиоктадециламмония хлорид, цетримония бромид, диоктадецилдиметиламмония бромид (DODAB); цвиттерсионные

(амфотерные) ПАВ, султаины CHAPS (3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-1-пропансульфонат), кокамидопропил гидроксисултаин, бетаины, кокамидопропил бетаин, фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин, сфингомиелины, этоксилат, длинноцепочечные спирты, жирные спирты, цетиловый спирт, стеариловый спирт, цетостеариловый спирт, олеиловый спирт, эфиры полиоксиэтиленгликольалкила (Brij): $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10-16}-(\text{O}-\text{C}_2\text{H}_4)_{1-25}-\text{OH}$ (октаэтиленгликоль монододециловый эфир, пентаэтиленгликоль монододециловый эфир), эфиры полиоксипропиленгликольалкила: $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10-16}-(\text{O}-\text{C}_3\text{H}_6)_{1-25}-\text{OH}$, эфиры глюкозидалкила: $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10-16}-(\text{O}-\text{глюкозид})_{1-3}-\text{OH}$ (децил глюкозид, лаурил глюкозид, октил глюкозид), эфиры полиоксиэтиленгликольоктилфенола: $\text{C}_8\text{H}_{17}-(\text{C}_6\text{H}_4)-(\text{O}-\text{C}_2\text{H}_4)_{1-25}-\text{OH}$ (тритон X-100), эфиры полиоксиэтиленгликольалкилфенола: $\text{C}_9\text{H}_{19}-(\text{C}_6\text{H}_4)-(\text{O}-\text{C}_2\text{H}_4)_{1-25}-\text{OH}$ (ноноксинол-9), эфиры глицериналкила (глицериллаурат), эфиры полиоксиэтиленгликольсорбитаналкила (полисорбат), эфиры сорбитаналкила (спаны), кокамидмоноэтаноламид, кокамиддиэтаноламид, додецилдиметиламиноксид, сополимеры полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля (полоксамеры) и полиэтокселированный талловый амин (POEA), но не ограничиваются ими.

Анионные ПАВ содержат анионные функциональные группы в головной части их молекул, такие как сульфат, сульфонат, фосфат и карбоксилаты. Известные алкилсульфаты включают аммоний лаурилсульфат, лаурилсульфат натрия (также называемый SDS, додецилсульфат натрия) и связанные с алкилэфирсульфатами лаурет сульфата натрия, также известные как эфир лауретсульфат натрия (SLES) и мирет сульфат натрия. Карбоксилаты являются наиболее распространенными ПАВ и включают алкильные карбоксилаты (мыла), такие как стеарат натрия.

ПАВ с катионными группами в головной части молекулы включают: pH-зависимые первичные, вторичные, или третичные амины; октенидин дигидрохлорид, четвертичные аммониевые катионы с постоянным зарядом, такие как алкилтриметиламмониевые соли: цетилтриметиламмония бромид (СТАВ) также известен как гексадецилтриметиламмония бромид, цетилтриметиламмония хлорид (СТАС), цетилпиридиний хлорид (СРС), бензалкония хлорид (ВАС), бензетония хлорид (ВЗТ), 5-бromo-5-нитро-1,3-диоксан, диметилдиоктадециламмония хлорид, цетримония бромид и диоктадецилдиметиламмония бромид (DODAB).

Цвиттер-ионные (амфотерные) ПАВ имеют как катионные и анионные центры, прикрепленные к одной и той же молекуле. В основе катионной части находятся

первичные, вторичные или третичные амины или четвертичные аммониевые катионы. Анионная часть может быть более разнообразной и включать сульфонаты. Наиболее распространенные биологические цвиттерсионные ПАВ содержат фосфат-анион с амином или аммонием, такой как фосфатидилсерин фосфолипиды, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин и сфингомиелины.

ПАВ с незаряженной гидрофильной частью, например, этоксилатом, не является ионным. Многие длинноцепочечных спиртов обладают некоторыми свойствами ПАВ.

Применение микроорганизмов с полимерами в добыче нефти

В настоящем изобретении предложены способы повышения добычи нефти с использованием одного или нескольких микроорганизмов и/или побочных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов в сочетании с одним или более полимерными соединениями. Полимерные соединения, используемые для добычи нефти в комбинации с микроорганизмами по настоящему изобретению, включают: гидрогели, акриловую кислоту, акриламид, полиакриламид (РАМ), гидролизованный полиакриламид (НРАМ), полисахарид, ксантановую камедь, гуаровую камедь и полимер целлюлозы, но не ограничиваются ими. В предпочтительных вариантах осуществления полимер представляет собой биополимер, выбранный из, например, гидрогелей, ксантановой камеди, гуаровой камеди, полимеров целлюлозы, полисахаридов и др.

Ассоциативный водорастворимый полимер представляет собой относительно новый класс полимеров, который недавно был предложен для применения к месторождениям нефти. Эти полимеры состоят из гидрофильной длинноцепочечной основной цепи, с небольшим количеством гидрофобных групп локализованных либо случайным образом вдоль цепи, либо на концах цепи. Когда эти полимеры растворяются в воде, гидрофобные группы агрегируют для минимизации воздействия воды на них. Введенные группы ассоциируют из-за внутримолекулярных гидрофобных взаимодействий и межмолекулярных гидрофобных взаимодействий. Функциональные группы этого полимера менее чувствительны к солености соляного раствора по сравнению с полиакриламидом, вязкость которого резко падает с увеличением солености.

Заводнение с применением полимера может включать добавление полимера к воде заводнения, чтобы уменьшить ее подвижность. Полимеры повышают вязкость

водной фазы, а также уменьшают проницаемость воды из-за механического задерживания, вследствие этого приводя к более благоприятному соотношению подвижности. При более вязкой фазе, собранный нефтяной вал может быть более легко перемещен через пласт в конечном счете в действующую скважину.

Полимеры в соответствии с этими вариантами осуществления также могут быть удалены и/или разрушены с использованием композиции на основе микроорганизмов по настоящему изобретению, как только в их функции в скважине больше нет нужды.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен способ улучшения добычи углеводородов из скважины с гидроразрывом пласта путем применения к буровому участку композиции на основе микроорганизма, содержащей один или несколько штаммов микроорганизмов. В некоторых вариантах осуществления полимеры накапливались внутри скважины после того, как они выполнили свою необходимую функцию внутри скважины.

Микроорганизмы из композиции на основе микроорганизмов и/или побочные продукты их жизнедеятельности могут быстро расщеплять полимеры, такие как полимолочная кислота (PLA); таким образом, способ улучшает способность к добыче углеводородных ресурсов за счет уменьшения накопления PLA и других смол внутри трещин и стволах скважин с гидроразрывом пласта, как только их полезность исчерпана. Способ необязательно включает добавление питательных веществ и/или других агентов на участок для того, чтобы стимулировать рост микроорганизмов. Способ дополнительно может включать добавление ферментов, разрушающих полимер, на участок для того, чтобы повысить разрушение полимера.

В одном варианте осуществления, в заявленном изобретении предложены способы извлечения полимерных веществ, которые остаются в скважинах, включая скважины с гидроразрывом пласта после того, как их полезность была исчерпана. Например, био-ПАВ, полученные способами и микроорганизмами по настоящему изобретению, могут снижать межфазное натяжение жидкостей, используемых для поднятия полимерных веществ, таких как ПАМ-гелевые средства уменьшения трения. В другом варианте осуществления, био-ПАВ могут быть использованы для расщепления ПАМ геля до поднятия.

Применение микроорганизмов с щелочными соединениями в добыче нефти

В настоящем изобретении предложены способы повышения добычи нефти с использованием одного или нескольких микроорганизмов и/или побочных продуктов

жизнедеятельности микроорганизмов в сочетании с одним или более щелочными соединениями. Щелочные соединения, используемые для добычи нефти в комбинации с микроорганизмами по настоящему изобретению, включают гидроксид аммония, но не ограничиваются им.

Щелочь является основной, ионной солью щелочного элемента-металла или щелочноземельного элемента-металла. Применение щелочи в заводнении с применением химического вещества предлагает несколько преимуществ, включая стимулирование эмульгирования сырой нефти, увеличение ионной силы водной фазы, ведущей к регуляции фазового поведения, введенного ПАВ, и понижение IFT до сверхнизких значений в присутствии ПАВ.

Щелочь может также снизить расходы за счет ограничения количества ПАВ, необходимого в двух способах. В первом, щелочь снижает адсорбцию ПАВ за счет увеличения плотности отрицательного заряда поверхности породы, что делает его преимущественно смоченным водой. Во втором, щелочь вступает в реакцию с кислотами в сырой нефти с получением мыла на месте, которое, в свою очередь расширяет оптимальный диапазон солености. Образованное мыло создает фазу микроэмульсии, которая может сосуществовать с нефтью и водой, таким образом, расширяя трехфазную область (или область сверхнизкого IFT).

Выбор щелочи зависит от типа пласта, типа глины и двухвалентных катионов. Обычные щелочные агенты включают гидроксид натрия (NaOH или каустическую соду), карбонат натрия (Na_2CO_3 или кальцинированная сода), бикарбонат натрия (NaHCO_3) и метаборат натрия (NaBO_2). Растворы гидроксида натрия, как сообщалось, сильно взаимодействует с песчаником при повышенной температуре (185°F), что приводит к потере веса песчаника и увеличению пористости. Расход щелочи в результате растворения NaOH из силикатных минералов может быть значительным и приносящим убыток фактором во время применения в промышленных условиях. Анионные ПАВ показали значительно меньшую адсорбцию в присутствии Na_2CO_3 по сравнению с NaOH . Гидроксид не является ионом, определяющим потенциал для карбонатных поверхностей. Кальций и другие двухвалентные катионы могут вызывать осаждение щелочей, таких как Na_2CO_3 , если не используется слабый соляной раствор. Это является ограничением для Na_2CO_3 . Сообщалось об использовании NaBO_2 в качестве замены Na_2CO_3 . Указанная щелочь дает значения pH примерно 11 при концентрации щелочи 1 масс. % и образует мыло с сырой нефтью с высоким содержанием сероводорода. Еще одним важным преимуществом видов NaBO_2

(метабората натрия) является их устойчивость к двухвалентным катионам. В карбонатных пластах метаборат натрия используется вместо других щелочей. Если пласт содержит глины, NaHCO_3 является предпочтительным. Na_2CO_3 является наиболее часто используемой щелочью, поскольку он является недорогим и лучше транспортирует в пористой среде.

Предпочтительными нефтяными пластами для заводнения с применением щелочей являются песчаные пласты, а не карбонатные пласты, которые содержат ангидрит (сульфат кальция) (CaSO_4) или гипс (дигидрат сульфата кальция) ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), которые могут расходовать большое количество щелочных химических веществ. Кроме того, в карбонатных пластах осаждение карбоната кальция (CaCO_3) или гидроксида кальция ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) происходит при добавлении Na_2CO_3 или NaOH . Карбонатные пласты также содержат соляной раствор с более высокой концентрацией двухвалентных соединений и могут вызвать осаждение. Чтобы преодолеть эту проблему, используют предложенные NaHCO_3 и сульфат натрия (Na_2SO_4). NaHCO_3 имеет значительно более низкую концентрацию ионов карбоната, и дополнительные сульфат-ионы могут уменьшить концентрацию ионов кальция в растворе. Эти химические вещества также расходуются на глины, минералы или диоксид кремния, и чем выше температура пласта, тем выше расход щелочи. Другая распространенная проблема во время заводнения с применением щелочей - это образование осадков в действующих скважинах. Во время заводнения с применением щелочей последовательность введения, как правило, включает: (1) промывание для улучшения состояния пласта перед введением начальной водяной пробки, (2) начальная водяная пробка (щелочные химические вещества), (3) полимер в качестве буферного водополимерного раствора для вытеснения начальной водяной пробки. Заводнение с применением щелочей может быть модифицировано как способы AP (с применением щелочей и полимеров), AS (с применением щелочей и ПАВ), и с применением щелочей, ПАВ и полимеров (АСП). Мыло, полученное реакцией между кислотными компонентами сырой нефти и закачанной щелочью, является основным механизмом добычи нефти при заводнении с применением щелочей.

Применение микроорганизмов с хелатирующими агентами

В некоторых вариантах осуществления микроорганизмы и/или побочные продукты их жизнедеятельности можно применять с хелатором или хелатирующим агентом. Предпочтительно, использование хелатирующих агентов помогает в

повышении добычи нефти путем растворения осадений в пласте. Осаждения могут блокировать поры и другие пути потока нефтеносного пласта, таким образом, замедляя и/или блокируя поток нефти из пласта.

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, например, 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), тиаминтетрагидрофурурилдисульфид (TTFD), пеницилламин, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), ацетат натрия, цитрат натрия и лимонная кислота, но не ограничиваются ими.

В предпочтительных вариантах осуществления хелатирующий агент представляет собой цитрат натрия, лимонную кислоту, ЭДТА или их комбинацию.

ПРИМЕРЫ

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

ПРИМЕР 1 - ПОЛУЧЕНИЕ *BACILLUS SUBTILIS*

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
KH_2PO_4	0,5
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,1
KCl	0,1
MgSO_4	0,5

CaCl ₂	0,05
Мочевина	2,5
NH ₄ 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 20-30 % (концентрация кислорода в воздухе принимается за 100 %). Продолжительность культивирования составляет 24-36 часов, или пока, по крайней мере, 95 % бактерий достигают стадии спорообразования. Конечная концентрация бактериальной культуры не менее 1×10^9 КОЕ/мл. Количество культуры, произведенной за один цикл ферментации, позволяет получить более 2000 баррелей конечного состава для обработки, содержащего 10^6 КОЕ указанного штамма *Bacillus*.

ПРИМЕР 2 - ФЕРМЕНТАЦИЯ *STARMERELLA BOMBICOLA* ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИО-ПАВ

Ферментер является автоклавируемой емкостью из нержавеющей стали, сконструированный специально для культивирования дрожжей и производства био-ПАВ. Ферментер оснащен микрораспылителем и турбинной мешалкой, а также датчиками растворенного кислорода, рН, температуры и пены. Он имеет встроенную контрольную станцию с цветным сенсорным интерфейсом, встроенные насосы для повышенного перемешивания бульона, регуляторы расхода газа и регуляторы рН/растворенного кислорода и уровня пены. Рабочий объем 550-галлонного реактора составляет 500 галлонов.

Питательная среда содержит источники углерода, белка, азота и ненасыщенных масляных или жирных кислот. Однодневный культура *Starmarella bombicola* (60-70 л) используется для инокуляции реактора. Начальное значение рН культуры составляет 5,0-6,0 до роста микроорганизмов и рН начинает снижаться. Продолжительность культивирования и отбор готового продукта продолжается в течение 5 дней при 25° С и рН стабилизируют на уровне 3,5. Конечное содержание софоролипидов может достигать по меньшей мере 40 % от рабочего объема за цикл или 150 г/л, или выше.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ увеличения количества нефти, извлекаемого из нефтеносного пласта, отличающийся тем, что способ включает применение к пласту бактерий, продуцирующих био-ПАВ, и/или побочных продуктов их жизнедеятельности и питательных веществ для роста микроорганизмов.
2. Способ по п. 1, в котором бактерии представляет собой штамм *Bacillus* в форме спор.
3. Способ по п. 2, в котором штамм *Bacillus* выбран из видов *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* и *B. licheniformis*.
4. Способ по п. 2, в котором штамм *Bacillus* представляет собой штаммы *B. subtilis* В1, В2 или В3.
5. Способ по п. 1, в котором побочный продукт жизнедеятельности представляет собой био-ПАВ, выбранный из сурфактина и итурина А.
6. Способ по п. 1, в котором микроорганизм растет в пласте и производит в нем био-ПАВ.
7. Способ по п. 1, дополнительно включающий введение одного или более щелочных соединений в пласт.
8. Способ по п. 7, в котором щелочное соединение представляет собой гидроксид аммония.
9. Способ по п. 1, дополнительно включающий введение одного или более полимерных соединений в пласт.
10. Способ по п. 9, в котором один или более полимерных соединений выбраны из ксантановой камеди, гуаровой камеди, гидрогелей, полисахарида и полимеров целлюлозы.

11. Способ по п. 1, дополнительно включающий введение одного или более небιологических ПАВ в пласт.

12. Способ по п. 11, в котором один или более ПАВ выбран из анионных ПАВ, лаурил сульфат аммония, лаурилсульфат натрия, алкилэфирсульфаты лаурет сульфата натрия, мирет сульфат натрия; докузатов, диоктилсульфосукцинат натрия, перфтороктансульфонат (PFOS), перфторбутансульфонат, линейных алкилбензолсульфонатов (LAB), алкиларилэфир фосфатов, алкилэфир фосфата; карбоксилатов, алкилкарбоксилатов (мыл), стеарат натрия, лаурилсаркозинат натрия, фторсодержащих ПАВ на основе карбоксилата, перфторнонаноата, перфтороктаноата; катионных ПАВ, рН-зависимых первичных, вторичных или третичных аминов, октенидин дигидрохлорида, четвертичных аммониевых катионов с постоянным зарядом, алкилтриметиламмониевых солей, ацетилтриметиламмония бромид (СТАВ) (также известного как гексадецилтриметиламмония бромид), цетилтриметиламмония хлорида (СТАС), цетилпиридиния хлорида (СРС), бензалкония хлорида (ВАС), бензетония хлорида (ВZТ), 5-бromo-5-нитро-1,3-диоксана, диметилдиоктадециламмония хлорида, цетримония бромида, диоктадецилдиметиламмония бромида (DODAB); цвиттерионных (амфотерных) ПАВ, султаинов СНAPS (3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-1-пропансульфоната), кокамидопропила гидроксисултаина, бетаинов, кокамидопропила бетаина, фосфатидилсерина, фосфатидилэтанолamina, фосфатидилхолина, сфингомиелинов, этоксилата, длинноцепочечных спиртов, жирных спиртов, цетилового спирта, стеарилового спирта, цетостеарилового спирта, олеилового спирта, эфиров полиоксиэтиленгликольалкила (Brij): $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10-16}-(\text{O}-\text{C}_2\text{H}_4)_{1-25}-\text{OH}$ (октаэтиленгликоль монододецилового эфира, пентаэтиленгликоль монододецилового эфира), эфиров полиоксипропиленгликольалкила: $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10-16}-(\text{O}-\text{C}_3\text{H}_6)_{1-25}-\text{OH}$, эфиров гликозидалкила: $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10-16}-(\text{O}-\text{глюкозид})_{1-3}-\text{OH}$ (децил глюкозида, лаурил глюкозида, октил глюкозида), эфиров полиоксиэтиленгликольоктилфенола: $\text{C}_8\text{H}_{17}-(\text{C}_6\text{H}_4)-(\text{O}-\text{C}_2\text{H}_4)_{1-25}-\text{OH}$ (тритона X-100), эфиров полиоксиэтиленгликольалкилфенола: $\text{C}_9\text{H}_{19}-(\text{C}_6\text{H}_4)-(\text{O}-\text{C}_2\text{H}_4)_{1-25}-\text{OH}$ (ноноксинол-9), эфиров глицериналкила (глицериллаурат), эфиров полиоксиэтиленгликольсорбитаналкила (полисорбатв), эфиров сорбитаналкила (спанов), кокамидмоноэтанолamида, кокамиддиэтанолamида,

додецилдиметиламинооксида, сополимеров полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля (полоксамеров) и полиэтоксилированного таллового амина (РОЕА) и любого другого соединения, которое может уменьшить поверхностное натяжение раствора и их комбинаций.

13. Способ по п. 1, дополнительно включающий добавление продукта ферментации дрожжей, который содержит бульон, полученный в результате ферментации одним или несколькими видами дрожжей.

14. Способ по п. 13, в котором виды дрожжей выбраны из *Wickerhamomyces anomalus* и *Starmerella bombicola*.

15. Способ по п. 13, в котором бульон продукта ферментации дрожжей содержит гликолипидные био-ПАВ.

16. Способ по п. 15, в котором био-ПАВ являются софоролипидами.

17. Способ по п. 13, в котором продукт ферментации дрожжей представляет собой очищенный гликолипидный био-ПАВ.

18. Способ по п. 17, в которой био-ПАВ представляет собой софоролипид.

19. Способ по п. 1, в котором один или более хелатирующих агентов добавляют в пласт.

20. Способ по п. 19, в котором хелатирующие агенты выбраны из лимонной кислоты, цитрата натрия и ЭДТА.

21. Способ по п. 20, в котором способ повышает добычу нефти при одновременном растворении отложений осадений, присутствующих в пласте.