

# Diagnóstico por biología molecular para la mitigación de la biocorrosión en instalaciones de petróleo y gas

Por *Walter A. Vargas, María Clara Pagliaricci, María Juliana González, Carla Montero, Guillermo R. Carfi y Walter Morris* (YPF-Tecnología S.A.)

**La correcta planificación de los programas de mitigación de los efectos de la biocorrosión en las instalaciones de hidrocarburos requiere de un diagnóstico correcto y temprano de las comunidades microbianas que causan la degradación de los materiales. Este trabajo tiene como objetivo presentar el desarrollo de estrategias de diagnóstico innovadoras que permitan una caracterización más precisa y completa del microbioma presente.**

**E**n su mayoría, la producción de petróleo en la Argentina presenta cortes de agua superiores al 20%. Los yacimientos convencionales maduros, 70% de la producción de YPF, utilizan la metodología de recuperación secundaria que requiere la inyección de agua a la formación con el fin de aumentar su productividad. Mientras que, el desarrollo de yacimientos No Convencionales, requiere de la inyección de grandes volúmenes de agua en las operaciones de fractura hidráulica. Luego, al poner estos pozos en producción se genera una corriente de fluido multifásico (gas, petróleo y agua) que es separada y tratada en las instalaciones de superficie: *Early Production Facility* (EPF), Baterías, Plantas de Tratamiento de Crudo (PTC) y Plantas de Inyección de Agua (PIA).

El incremento de fase acuosa circulando por las instalaciones genera un ambiente propicio para el desarrollo de poblaciones microbianas. El crecimiento y la propagación de estas poblaciones traen aparejados graves problemas durante el proceso de explotación:

- Biocorrosión, corrosión inducida por microorganismos (MIC): afecta principalmente a la integridad estructural del equipamiento.

- Disminución en la calidad del crudo: aumento de  $H_2S$  (agriamiento) e incremento de sólidos disueltos (Sulfuros de Hierro, FeS).
- Interrupción del flujo por reducción en la permeabilidad de la formación: altera la eficacia de la inyección de agua para el desplazamiento del petróleo.
- Riesgo a la salud humana: incremento del contenido de  $H_2S$  en las corrientes gaseosas de las instalaciones, como pozos, baterías y plantas de tratamiento.
- Problemas operativos: obstrucciones de cañerías, filtros y ensuciamiento de tanques por acumulación de lodo biológico.

El tratamiento con biocidas es la estrategia de mitigación comúnmente utilizada. La eficiencia y la eficacia de estos tratamientos depende del diagnóstico previo de los microorganismos involucrados para el diseño correcto del agente químico, su concentración y su frecuencia de dosificación.



Actualmente las metodologías más utilizadas implican el desarrollo de cultivos microbianos y la determinación de su potencial biocorrosivo *in vitro*. Estas metodologías son engorrosas y los resultados no son inmediatos. Sin embargo, la biología molecular presenta herramientas que pueden adaptarse al diagnóstico microbiano y brindar respuestas rápidas para el monitoreo continuo. De esta manera se podrían generar herramientas para asistir a la mitigación de la biocorrosión en instalaciones de O&G.<sup>1, 2, 3, 4, 5, 6</sup>

## Desarrollo

El trabajo se realiza a partir de la extracción de muestras de un circuito de producción de yacimientos No Convencionales de petróleo en la Argentina representado en la figura 1. Las muestras corresponden a las siguientes corrientes:

- Agua de captación para la fractura hidráulica (Punto 1).
- Agua proveniente de la formación No Convencional, llamada agua de *flowback*, que ingresa a instalación EPF (Punto 4).

En el momento de muestreo, los puntos analizados no presentaban tratamiento con biocida.

## Metodología

**Obtención y procesamiento de muestras.** Las muestras se recolectaron en las instalaciones y, en el caso de las muestras de fluidos de producción, se separaron por decantación la fase acuosa de la oleosa. Las muestras acuosas



Figura 1. Circuito de agua en yacimientos no convencionales.

se filtraron a través de membranas de nitrocelulosa de 0,22  $\mu\text{m}$  de poro y se preservaron en frío hasta su procesamiento.

**NMP.** Se llevaron a cabo los protocolos para recuento de bacterias aeróbicas totales (BAT) y bacterias sulfato reductoras (BSR), de acuerdo al método estándar NACE TM-194: 2014 "Field Monitoring of Bacterial Growth in Oil and Gas Systems". La salinidad de los caldos de cultivo utilizados se determinó a partir de las mediciones realizadas de conductividad.

**Método DAPI.** DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol) es un agente intercalante que cuando interactúa con el ADN de doble hebra emite fluorescencia con un máximo

de emisión a 461 nm. Para realizar la tinción, primero es necesario realizar la fijación de los microorganismos de la muestra. La fijación se logra mediante la adición de 70 µL de solución de formaldehído 37% p/V sobre una alícuota de 1,5 ml de muestra líquida, 4 h a 4 °C. Luego, se diluye el contenido en aproximadamente 15 ml de agua acidificada estéril con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 2) para mantener en solución posibles interferencias de sales y facilitar la filtración. Posteriormente, las muestras fijadas son filtradas por membranas GTTP 0,25 de 0,22 µm de diámetro de poro. La tinción con el colorante DAPI de los microorganismos fijados se lleva a cabo sobre una porción de las membranas fijadas.

**Método FISH.** Este método permite la cuantificación de diversos grupos filogenéticos mediante la utilización de oligonucleótidos de ADN de aproximadamente 18 a 20 pb (pares de bases) marcadas con moléculas fluorescentes llamadas sondas, que hibridan específicamente con una región complementaria del ARN 16S del ribosoma procariota. En este trabajo se utilizaron las sondas EUB338 específica para el dominio Bacteria y la sonda ARC915 específica para el dominio Arqueas, ambas marcadas con el fluorocromo CY3 cuyo pico de emisión se encuentra aproximadamente en 565 nm y se visualiza con un filtro rojo. Para realizar la hibridación con las sondas, las muestras deben ser fijadas y filtradas como se detalló en el método DAPI.

**Extracción de ADN.** En esta etapa se utilizó el kit de extracción de ADN PowerSoil DNA isolation kit siguiendo las instrucciones del fabricante. Además, para encontrar la forma más eficiente de ruptura celular se introdujeron tres variables al protocolo para favorecer la lisis y liberación del contenido celular: mecánicos (vortex), físico (temperatura), químicos (detergentes). Sin embargo, no se observaron diferencias tanto en la cantidad como en la calidad del ADN extraído. Por lo tanto, para proceder con el desarrollo técnico se realizó la ruptura mediante el tratamiento térmico, ya que es menos agresivo para las muestras de ADN.

**Concentración e integridad del ADN extraído.** Las concentraciones de ADN fueron determinadas mediante absorbancia a 260 nm, y utilizando el Quant-iT™ PicoGreen® DNA Assay Kit (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones detalladas por el fabricante. La integridad del ADN se determinó luego de electroforesis en geles de agarosa posterior a la tinción con agentes intercalantes.

**Metagenómica.** Esta metodología de Biología Molecular permite el estudio de la totalidad de los genes de un ambiente. En este estudio se realizó un análisis metagenómico con un amplicon, en el cual se amplifica y se prepara la muestra para generar una biblioteca solamente del gen de interés. En este caso, el gen de interés es el gen 16S rARN que permite la identificación de microorganismos procariontes: bacterias y arqueas. En la figura 2 se detallan las etapas del proceso necesario para la obtención del análisis. Para la secuenciación se usan métodos de nueva generación (NGS) Illumina y Pirosecuenciación.

Se realizó la preparación de las muestras de amplicones para establecer la secuencia las regiones variables V4-V5 del gen 16S rARN a partir del ADN genómico extraído. En la "1er PCR" se preparan las bibliotecas a partir de 10 ng de ADN, en las siguientes condiciones: 3 min a 95 °C, 20 ciclos (95 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 30 s), 5 min de 75 °C y conservación a 4 °C. Posteriormente, usando los pares de primers V3 y V4 el tamaño esperado del amplicon es aproximadamente 550

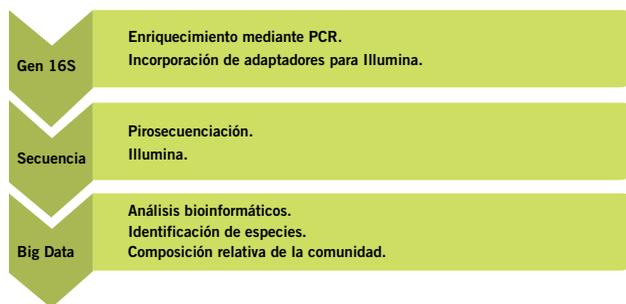


Figura 2. Etapas análisis metagenómica.

pb. Luego de la purificación de los productos, una segunda ronda ("2da PCR") de amplificación permite identificar cada muestra mediante la adición de una secuencia diferente, "index". Las condiciones de la "2da PCR" son las siguientes: 3 min a 95 °C, 6 ciclos (95 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 30 s), 5 min de 75 °C y conservación a 4 °C. Una vez generadas las bibliotecas, la concentración de ADN fue determinada con el Quant-iT™ PicoGreen® DNA Assay Kit (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones detalladas por el fabricante (*high range curve – half area plate*). Para verificar la calidad del pool se corrió 1µL en el 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) utilizando el High Sensitivity DNA Kit.

**Ensayo qPCR.** La técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa (qPCR) es utilizada para cuantificar bacterias en muestras ambientales y se ha utilizado en muchos estudios de corrosión inducida por microorganismos (MIC).<sup>7, 8</sup> En esta técnica se usan marcadores generales, taxonómicos y funcionales. En este caso, para el gen 16S rARN en Bacterias y Arquea se utiliza el marcador *dsrAB*.

## Resultados y discusión

A continuación se exponen los resultados obtenidos de los ensayos realizados.

### a. Parámetros físico químicos

En la tabla 1 se visualiza las determinaciones de pH, conductividad y temperatura *in situ* de las muestras analizadas. La formación no convencional genera una corriente acuosa, llamada agua de *flowback*, con elevada salinidad y reducido pH respecto al agua dulce utilizada para la operación de fractura.

Muestra	Conductividad (µS/cm)	TDS (ppm)	pH	T °C <i>in situ</i>
Captación de agua	473	303	8,26	14
Agua de <i>flowback</i>	120.900	77376	5,46	22,3

Tabla 1. Parámetros físico químicos de las muestras estudiadas.

### b. Recuento microbiano por técnicas de cultivo, NMP

En la tabla 2 se presentan los resultados de los recuentos por NMP para BAT y BSR en la muestra del agua de *flowback*.

Los recuentos obtenidos no informan un crecimiento microbiano considerable de bacterias aeróbicas y bacterias sulfato reductoras en el agua de producción, *flowback*.

Muestra	Bacteria/ml	
	BAT 7 días a 37 °C	BSR 28 días a 37 °C
Agua de <i>flowback</i>	1 x 10 <sup>2</sup>	<1, Negativo

Tabla 2. Recuentos de bacterias aeróbicas totales (BAT) y sulfato reductoras (BSR) por NMP.

### c. Recuento microbiano por microscopia de Epifluorescencia, método DAPI y FISH

La presencia de microorganismos en las muestras de agua tomadas en las instalaciones de producción fue analizada mediante las metodologías de tinción por DAPI y FISH. El recuento total de bacterias obtenido luego de la tinción con DAPI permitió determinar una concentración de 7 x 10<sup>8</sup> células/ml microbianas en el agua de *flowback*. La figura 3 representa el análisis microscópico realizado. Los resultados de la metodología de FISH indicaron que entre un 90% y un 100% de los microorganismos presentes en la muestra corresponden a bacterias por la hibridación con la sonda EUB 338, mientras que la sonda ARQ 915 no mostró hibridaciones significativas para el dominio Arquea.



Figura 3. Imagen de Microscopio de Epifluorescencia de muestra de ensayo DAPI para células totales. Luego de la tinción, los filtros fueron visualizados al microscopio con una magnificación de 100X.

### d. Identificación del microbioma presente en las muestras a partir del ADN extraído

Para la puesta a punto de las metodologías basadas en biología molecular, se procedió a la optimización del método de extracción de ADN de acuerdo con lo descrito en la metodología. Se determinó que lo más eficiente es la utilización del kit de extracción con un paso previo de ruptura celular calentando 10 min a 70 °C. En la tabla 3 se describen las concentraciones de ADN extraído a partir de las muestras correspondientes al punto de captación de agua y al agua de *flowback*. Los resultados demuestran un incremento considerable en el contenido de ADN de las muestras a la salida del pozo (agua de *flowback*) con respecto al agua de captación utilizada en la fractura hidráulica.

Muestra	Concentración
	ADN [ng/ml]
Captación de agua	100
Agua de <i>flowback</i>	1400

Tabla 3. Resultados de concentración de ADN por métodos espectrofotométricos.

Esto indica que la formación estimula la proliferación bacteriana, o bien, se produce el arrastre de microorganismos nativos de la formación.

Por otra parte, se analizó la integridad del ADN extraído mediante la visualización en geles de agarosa para determinar la calidad del ADN y la factibilidad de su utilización en las determinaciones metagenómicas posteriores. Las imágenes presentadas en la figura 4 demuestran la elevada integridad del ADN evidenciada por la presencia de una banda de alto peso molecular similar al del cromosoma bacteriano.

### e. Análisis metagenómico de las muestras

Una vez confirmada la calidad y la integridad del ADN obtenido se procedió al estudio metagenómico de la población microbiana. Mediante las reacciones de PCR consecutivas se generaron las bibliotecas finales conteniendo fragmentos de ADN de doble hebra de aproximadamente 630 pb correspondiéndose al producto de amplificación de la región variable del gen 16S rARN.

Los resultados obtenidos se resumen en las tablas 4 y 5. Allí se detalla la información taxonómica relativa de los microorganismos identificados por el análisis del metagenoma de las muestras de ADN procesadas luego de la pirosecuenciación. Se consideran relevantes aquellos microorganismos con un porcentaje relativo superior al 2%. En las figuras 5 y 6 se grafica la diversidad taxonómica porcentual de cada muestra.

Los resultados obtenidos demuestran una diferencia sustancial en la composición del microbioma presente en ambas muestras. La población de microorganismos detectados en la muestra de la captación de agua está dominada principalmente por microorganismos de agua dulce y aeróbicos (Tabla 4). Mientras que el análisis taxonómico de los microorganismos presentes en las muestras de agua de *flowback* reveló que el 94,8% de la población se corresponde con una única especie bacteria correspondiente al género *Halanaerobium* sp. (Tabla 5). Este género de bacterias presenta características fisiológicas muy particulares como ser halotolerantes, hipertermófilas, anaeróbicas, tiosulfato reductoras (BTSR) y degradadoras de goma guar.<sup>9</sup>

El análisis comparativo de las comunidades bacterianas presentes en ambas muestras demuestra un cambio drástico en la diversidad microbiana entre ambos entornos ecológicos. De esta manera, se deduce que el incremento de la con-

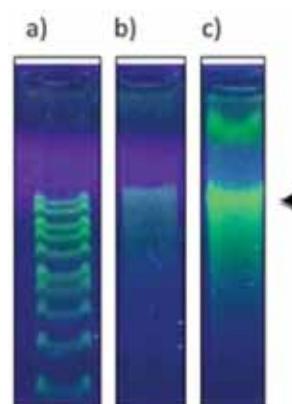


Figura 4. Resultado de evaluación de integridad de ADN en electroforesis en gel de agarosa.

a) Marcador de peso molecular b) Captación de agua c) Agua de *flowback*. La flecha indica la posición de la banda correspondiente al ADN genómico.

Taxonomía	% en agua Captación	Descripción
k_Bacteria; p_Proteobacteria; c_Betaproteobacteria; o_Burkholderiales; f_Comamonadaceae; g_Limnohabitans	32,18%	Bacteria Gram (-). Betaproteobacteria, abundante en agua dulce y pH neutro, componente típico del plancton en agua de lagos. Es sensible a la salinidad y acidez.
k_Bacteria; p_Bacteroidetes; c_Flavobacteriia; o_Flavobacteriales; f_Flavobacteriaceae; g_Flavobacterium	21,76%	Bacteria Gram (-). Aerobio, típicos en agua dulce y salada
k_Bacteria; p_Bacteroidetes; c_Cytophagia; o_Cytophagales; f_Cytophagaceae; g_Arcicella	12,95%	Bacteria Gram (-). Aeróbica, no motiles y polimórficas.
k_Bacteria; p_Actinobacteria; c_Actinobacteria;		Bacterias planctónicas de agua fresca.
o_Actinomycetales; f_Microbacteriaceae; g_Rhodoluna laticola	12,88%	Por su tamaño difícil distinguir por tinción de Gram.
k_Bacteria; p_Actinobacteria; c_Actinobacteria; o_Actinomycetales; f_ACK-M1; g_Micrococccineae	6,22%	Bacteria Gram (+). Bacterias que viven en el suelo.
k_Bacteria; p_Bacteroidetes; c_Flavobacteriia; o_Flavobacteriales; f_Cryomorphaceae; g_Fluviicola	2,06%	Bacteria Gram (-). Aeróbica, presente en agua fresca y no puede crecer en ambientes con mucho sodio.

Tabla 4. Resultados del análisis metagenómico del agua de captación.

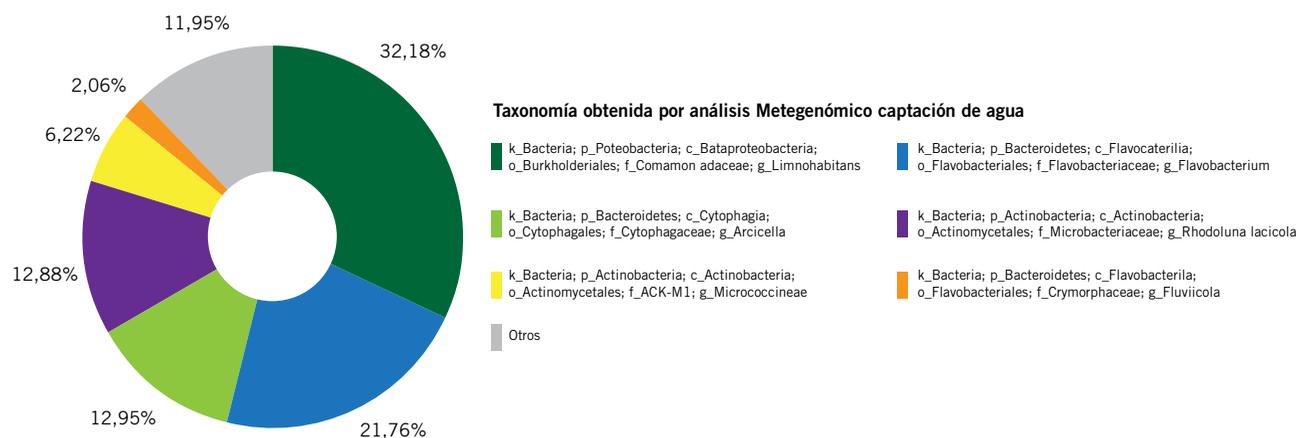


Figura 5. Diversidad taxonómica porcentual en la muestra de agua de captación.

centración de ADN en la muestra de agua de *flowback* se debe al arrastre de las especies microbianas autóctonas de la formación, ya que no se evidencia la sobrevida de las bacterias provenientes de la fuente de agua dulce, agua de captación.

De acuerdo con lo descrito por Liang *et al.* (2016), la ecología microbológica del agua de producción del Shale de Barnett (yacimiento de producción No Convencional en Estados Unidos) está compuesta principalmente por

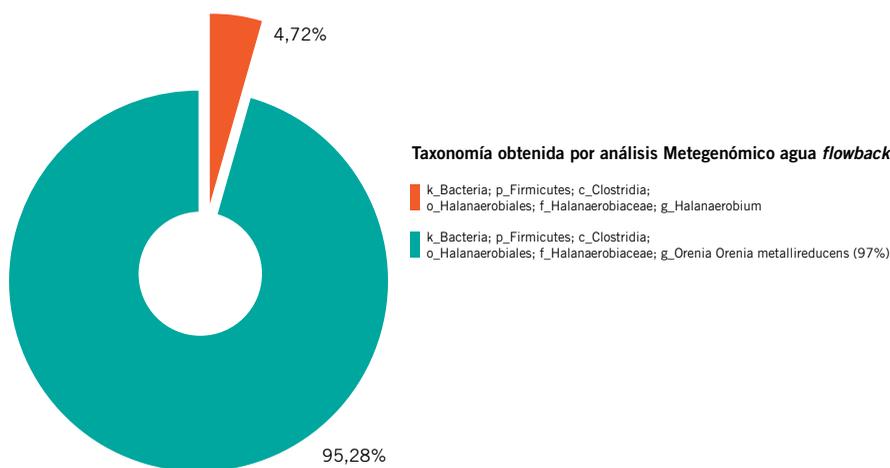


Figura 6. Diversidad taxonómica porcentual en la muestra de agua de *flowback*.

*Halanaerobium sp.*, bacteria halófilas y sulfidogénicas del orden Halanaerobiales que se desarrollan en condiciones de alta salinidad y en presencia de compuestos de azufre ( $S_2O_3^{-2}$ ,  $SO_4^{-2}$ , HS<sup>-</sup>). Los estudios de caracterización de este género, realizados en dicho trabajo, demuestran que esta bacteria puede degradar la goma guar, polisacárido utilizado en el fluido de fractura, para producir sulfuros y acetato en condiciones de alta salinidad, cuando dispone de tiosulfato como receptor de electrones. Las BTSR catalizan la corrosión de acero al carbono de instalaciones de producción de petróleo como ha sido demostrado por Magot *et al.* (1997) y Liang *et al.* (2014). Además, en el artículo de Liang *et al.*, se realiza una evaluación de la eficiencia de biocidas para mitigar la cepa *Halanaerobium sp.* DL-01, donde se demuestra que las estrategias de mitigación de MIC basadas en compuestos de amina cuaternaria (QAC) son más efectivas que las de glutaraldehído y THPS.

#### f. Desarrollo de protocolo de qPCR para determinación de porcentaje de bacterias y arqueas totales

Se realizó una extracción de ADN genómico de un cultivo de bacterias de la cepa *E. coli* BL21 (utilizada como cepa de referencia para bacterias) y de la cepa *H. volcanii* (utilizada como referencia de arquea) de acuerdo al protocolo de Tavares *et al.* (2004). Para definir los límites de detección del método y construir las curvas de cuantificación se evaluaron 5 diluciones desde 10 ng a 10 fg del ADN bacteriano utilizado como molde. El valor de Ct (*Cycle threshold*) obtenido en cada corrida fue relativizado a un estándar interno colocado en todas las determinaciones. Las curvas de cuantificación se realizaron por duplicado graficando el valor promedio de Ct para cada concentra-

ción del gen seleccionado *versus* el logaritmo del número de bacterias presentes en cada dilución muestra (teniendo en cuenta una concentración de  $6 \times 10^8$  bacterias por  $\mu g$  de ADN genómico).

La estimación realizada contempla como supuestos que todas las bacterias presentes en la muestra poseen una sola copia del gen seleccionado para la cuantificación y que sus genomas son todos haploides.

## Conclusiones

La estrategia metodológica desarrollada se evaluó en campo mediante el estudio de un circuito de una instalación de O&G de producción No Convencional, contrastándola con los resultados de procedimientos tradicionales de recuento por dilución seriada (NMP). Del análisis comparativo de los resultados se destaca la alta sensibilidad y robustez de los métodos de biología molecular empleados, en particular la de los ensayos metagenómicos. Por lo expuesto, se confirma que la información obtenida por los métodos de biología molecular supera al diagnóstico mediante técnicas tradicionales de cultivo, NMP.

A partir del análisis global de los resultados podemos inferir que la formación productiva de petróleo No Convencional genera corrientes acuosas con elevada salinidad y reducido pH. Además, desde el punto de vista microbiológico, el microbioma del agua de *flowback* presenta una mayor concentración de ADN respecto al agua de captación, pudiendo extrapolar dicha característica a una mayor concentración de biomasa que se corrobora con un recuento elevado de células totales por método DAPI.

Los resultados del análisis metagenómico permiten ca-

Taxonómia	Agua de <i>flowback</i>	Descripción
k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Halanaerobiales; f_Halanaerobiaceae; g_Halanaerobium	94,8%	Bacteria Gram (-). Sulfidogen, Tiosulfato reductora (BTSR). Esta especie puede degradar la goma guar utilizada en los fluidos de fractura, para producir acetatos y sulfuros en medios de 10% NaCl y 37°C. Para mitigar los efectos de la generación de acetato y sulfuros. El biocida más eficiente es la amina cuaternaria en comparación con el glutaraldehído y el THPS. Los metabolitos generados (acetato y sulfuros) presentes en el FBW al retornar a la superficie generan corrosión por picado en las instalaciones. <sup>7</sup>
k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Halanaerobiales; f_Halobacteroidaceae;	4,70%	Bacteria Gram (+). Bacteria Tiosulfato Reductora, 97% similar a <i>Orenia sp.</i> , recientemente caracterizada. (Dong <i>et al.</i> 2016)

Tabla 5. Resultados del análisis metagenómico del agua de *flowback*.

racterizar la población microbiana presente en la instalación y su composición relativa. En el agua de *flowback* el microbioma es menos diverso respecto al agua de captación con una presencia mayoritaria (94,8%) del género *Halanaerobium* sp. Este género incluye especies anaeróbicas y tiosulfato reductoras que no serían detectadas mediante las determinaciones de recuento por NMP diseñadas para BAT y BSR. En este caso particular, es imperante diseñar un método eficaz para la detección y el monitoreo de este género bacteriano. Dicha importancia radica en la criticidad de estos microorganismos para la integridad de las instalaciones, ya que son capaces de producir sulfuros de hierro y H<sub>2</sub>S (a partir de tiosulfato) acompañado por la generación de ácidos que catalizan la corrosión de los componentes de acero al carbono.<sup>9</sup>

La calidad de la información generada permite:

- Diseñar una estrategia de mitigación apropiada seleccionando un biocida adecuado para las especies críticas identificadas.
- Diseñar estrategias de monitoreo mediante qPCR para seguimiento de las poblaciones microbianas críticas incluyendo bacterias totales, arqueas, BSR y BTSR. ■

### Agradecimientos

Agradecemos a Negocio No Convencional Loma Campana, YPF, en especial a Oscar Arias, Fernando Belich, Luis Babusi y Marina Arana por el apoyo y colaboración en la realización de este estudio; a Sede y Laboratorio móvil de Porpant Y-TEC Neuquén; a Martín Feuerschvenger y Simón Marco por facilitarnos las instalaciones y su colaboración en los ensayos de campo; Programas Tecnológicos de Y-TEC: Programa de Integridad de Instalaciones y Programa de Biotecnología Industrial.

### Referencias

1. K. Sørensen, T.L. Skovhus, J. Larsen, "Techniques for enumerating microorganisms in oilfields," in International Symposium on Applied Microbiology and Molecular Biology in Oilfield Systems (ISMOS-2), C. Whitby, T.L. Skovhus, eds. (New York, NY: Springer, 2009).
2. API RP 38: "Recommended practice for biological analysis of subsurface injection waters third edition (r 1982)".
3. NACE TM 212 (2012): "Detection, Testing, and Evaluation of Microbiologically Influenced Corrosion on Internal Surfaces of Pipelines".
4. NACE TM 194 (2014): "Field Monitoring of Bacterial Growth in Oil and Gas Systems".
5. Skovhus-Caffrey-Hubert Eds. "Applications of Molecular Microbiological Methods". Caister Academic Press, 2014.
6. NACE Publicación n°5738 (2015): "Secuenciación de microbiomas en campos de petróleo-Puede el Metagenoma ayudar a combatir MIC?".
7. NACE Publicación n° 5493 (2005): "Application of Quantitative, Real-Time PCR in Monitoring Microbiologically-Influenced Corrosion (MIC) in Gas Pipelines".
8. NACE Publicación n° 10252 (2010): "Consortia of MIC bacteria and archaea causing pitting corrosion in top side oil production facilities".
9. R. Liang (2016): "Metabolic Capability of a Predominant *Halanaerobium* sp. in Hydraulically Fractured Gas Wells and Its Implication in Pipeline Corrosion". Front. Microbiol., 22 June 2016, | <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00988>