

## EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS BIOCIDAS SOBRE BIOFILMS MEDIANTE UN EQUIPO DE MONITOREO EN LÍNEA: APRENDIZAJES Y DESAFÍOS DE UN PILOTO INDUSTRIAL

Francisco L. Massello<sup>1</sup>; M. Leticia Legarto<sup>1</sup>; Gabriel Kunich<sup>1</sup>; M. Mercedes Messina<sup>1</sup>; Mariano Guevara<sup>2</sup>; Jonatan A. Martinez<sup>2</sup>; Andres Bateman<sup>2</sup>; M. Clara Pagliaricci<sup>1</sup>; Isabel N. Vega<sup>1</sup>

<sup>1</sup> YPF Tecnología S.A. (Y-TEC), Berisso, Argentina

<sup>2</sup> YPF S.A., Buenos Aires, Argentina

### Sinopsis

La corrosión influenciada por microorganismos y el *biofouling* comprometen la calidad de la producción y la integridad de los activos en instalaciones upstream de petróleo y gas. Ambos procesos se desencadenan en mayor medida por la formación de biofilms (microorganismos adheridos a superficies en matrices complejas formando barros), siendo los biofilms la mayor amenaza para las instalaciones. Por esta razón, la industria destina gran porcentaje de su OPEX en estrategias de control microbiano: prevención y mitigación, tratamiento, y monitoreo. Sin embargo, la implementación de estas estrategias de control a nivel biofilm es exigua (sino nula), principalmente, por limitaciones metodológicas.

Este estudio describe la experiencia de un piloto industrial en el que se evaluó la eficiencia de tratamientos químicos a nivel biofilm utilizando un equipo de monitoreo en línea novedoso tipo sidestream. El sidestream es un desarrollo ad-hoc que consiste en una plataforma trasladable que sostiene una cañería de una pulgada que alberga 6 cupones removibles de acero al carbono. El equipo se conecta a la operación permitiendo controlar el caudal con que circula el agua de producción, posibilitando la formación de biofilms nativos sobre los cupones. Además, permite la inyección de químicos, dejando tres cupones aguas arriba y tres cupones aguas abajo.

Durante el piloto industrial, el sidestream fue conectado en una planta de tratamiento de crudo de producción terciaria con inyección de polímero en la cuenca del Golfo San Jorge. A lo largo de dos meses de piloto, se evaluaron dos biocidas tailor made en aplicaciones batch. Las aguas del proceso y los biofilms se analizaron por determinación de ATP (LuminUltra, Canadá), qPCR, secuenciación por Nanopore (Oxford, Reino Unido), peso húmedo, y técnicas de microscopía (SEM y CLFM), según correspondiera. Los resultados mostraron una rápida formación de biofilms sobre los cupones del sidestream. Ambos biocidas tuvieron una buena performance tanto a nivel biofilm como plantónico, sin que se observe una variación significativa en la composición de la comunidad microbiana. La presencia inesperada de grandes cantidades de sólidos oleosos depositados dificultó ciertos análisis (principalmente de microscopía), desafiando a optimizar los protocolos de evaluación. Más allá de ello, el sidestream mostró ser una herramienta exitosa para la evaluación de biocidas sobre biofilm nativos en las condiciones de operación, sin la necesidad de consumir grandes cantidades de químicos y con un reducido esfuerzo de muestreo y monitoreo.

## Desarrollo

En este trabajo se evaluó un sistema de monitoreo en línea, *sidestream*, para la formación de biofilms nativos en condiciones operativas. El *sidestream* (Figura 1) consiste en un sistema cañerías de 1 pulgada de diámetro, que se conecta al flujo de la instalación. Dentro del *sidestream* hay 6 cuponeras para el desarrollo de *biofilms* nativos. A mitad del equipo hay un puerto de inyección que permite el agregado de hasta 3 químicos en simultáneo. Tres cuponeras quedan aguas arriba de la inyección de químico (cupones control) y tres cuponeras se ubican aguas abajo del tratamiento químico (testigos). El equipo cuenta con una bomba que permite ajustar la velocidad y el caudal para reproducir las condiciones fluidodinámicas.



Figura 1 – Equipo sidestream, a la izquierda; y cuponera con cupón de acero al carbono insertado, el área de los cupones es de 55 cm<sup>2</sup>.

En este trabajo, el *sidestream* fue instalado durante dos meses en una planta de tratamiento de crudo (PTC) de producción terciaria con inyección de polímero en la cuenca de Golfo San Jorge. En las primeras semanas, se extrajeron los cupones para evaluar la formación de biofilms y su representatividad, encontrándose una gran cantidad de sólidos oleosos (Figura 2). Los depósitos fueron recolectados y se realizaron estudios de biología molecular (extracción de ADN, qPCR y secuenciación del gen 16S ARNr por tecnología de Nanopore (Oxford, Reino Unido)). Estos análisis revelaron que, al cabo de 10 días, ya se obtenía un biofilm significativo y que su composición microbiana era similar a la que se conocía para la locación por estudios de línea base previos.



Figura 2 – Foto de un cupón extraído al cabo de 10 días. Se observa una gran cantidad de sólidos oleosos.

Una vez verificado que el sistema permitía la formación de *biofilms* nativos, se procedió a la evaluación de dos biocidas químicos *tailor-made*.

Las instalaciones de producción terciaria representan un desafío para el tratamiento biocida ya que muchos de los químicos más utilizados en la industria son incompatibles con los polímeros. Esto genera una baja eficiencia antimicrobiana, reducción en la viscosidad, turbidez o espuma (Joullie & Lassen, 2010; Zagitov *et al.*, 2019). Los biocidas evaluados en este piloto industrial fueron diseñados en Y-TEC específicamente para ser compatibles con las operaciones EOR con inyección de polímero. El producto Y-EXP 03 BIO consiste en una adaptación de un producto tradicional, que reduce significativamente su reacción con el polímero. Esto se evidenció analizando la viscosidad de una solución de polímero a lo largo de los días frente a diferentes concentraciones del producto. En el laboratorio, Y-EXP 03 BIO mostró gran eficiencia para el microbioma *target* de la locación (*Stutzerimonas*, *Arcobacter* y *Sulfurospirillum*), alcanzando eficiencias superiores al 90% a 180 ppm y 2 horas de exposición (Figura 3) (*kill test* realizado por determinación de ATP (ASTM D7687-23) (ASTM, 2023)).

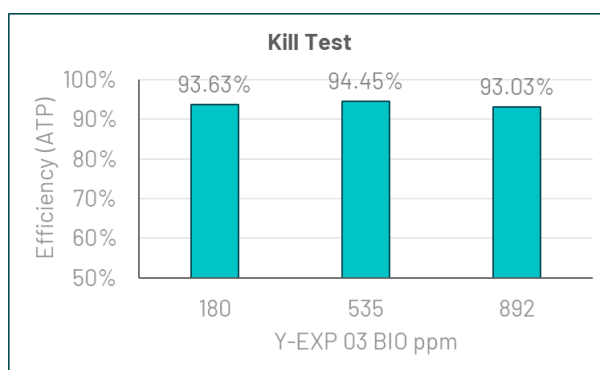


Figura 3 – Eficiencia biocida a nivel plantónico del producto Y-EXP 03 BIO.

Por otro lado, se desarrolló una formulación novedosa, Y-BAQ OD06, que tiene una naturaleza anfipática. Este producto, también mostró una muy alta eficiencia en *kill tests* plantónicos (Figura 4). En lo que respecta a la compatibilidad, el *cloud point* es superior a los 3500 ppm, no genera cambios en la viscosidad, y la generación de espuma y emulsiones a 1000 ppm es insignificante.

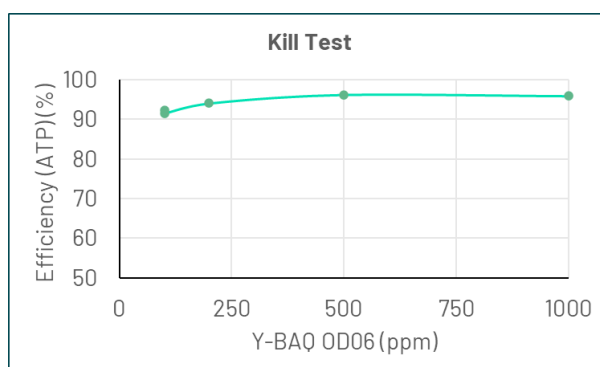


Figura 4 – Eficiencia biocida a nivel plantónico del producto Y-BAQ OD06.

Para evaluar los productos, se realizaron batcheos de 3 horas a lo largo de una semana. Las aguas del proceso y los biofilms formados en los cupones control y testigo se analizaron por determinación de ATP (LuminUltra, Canadá), qPCR, secuenciación por Nanopore (Oxford, Reino Unido), peso húmedo, y técnicas de microscopía (SEM y CLFM), según correspondiera.

La Figura 5 muestra la eficiencia sobre plantónicas y sobre biofilm del producto Y-EXP 03 BIO, determinada por medición de ATP (y calculada como actividad por mL y actividad por cm<sup>2</sup>, respectivamente).

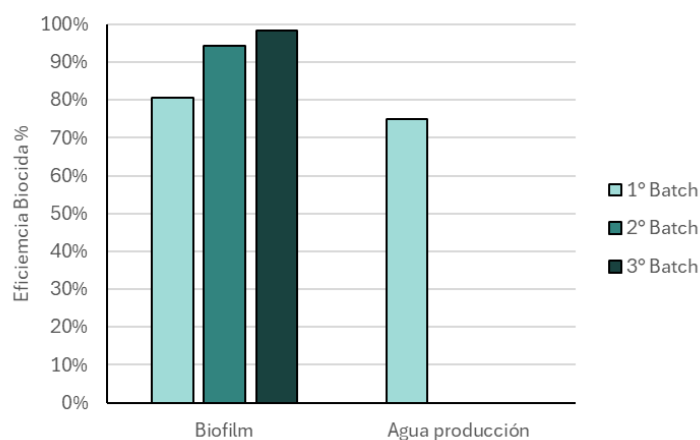


Figura 5 – Eficiencia biocida del producto Y-EXP 03 BIO.

La Figura 6 muestra las eficiencias obtenidas del producto Y-BAQ OD06, tanto para plantónicas como para biofilm, determinadas por medio de medidas de ATP (actividad/mL, actividad/cm<sup>2</sup>). Durante el 3er batch, la concentración aplicada fue un 30% menor a la del primer batch, lo cual explica la caída en la eficiencia.

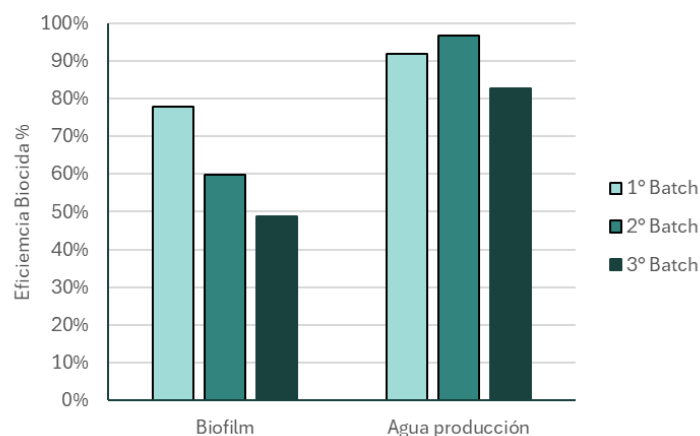


Figura 6 – Eficiencia biocida del producto Y-BAQ OD06.

La Figura 7 muestra una comparativa de la carga microbiana obtenida a través de las diferentes técnicas: qPCR (genes/mL, bacterias totales) y ATP (pgATP/mL, actividad transformada en microorganismos equivalentes, meq/mL). La determinación por qPCR cuenta la cantidad de genes (ADN) en la muestra, por lo que es susceptible a sobreestimar el recuento (ya que no diferencia entre células viables y no viables). Por otro lado, la técnica de ATP determina la concentración de dicha molécula cuya función biológica es transportar energía: la medida representa el estado de actividad celular. Si bien la transformación en microorganismos equivalentes es una aproximación, la determinación de ATP brinda mejor información para evaluar la acción biocida, dada su sensibilidad y rápida respuesta (Kniz *et al.*, 2023).

En este trabajo, la determinación de ATP se realizó *in-situ*, mientras que la determinación por qPCR se realizó en el laboratorio días más tarde, luego del acondicionamiento para la extracción de ADN. A

pesar de estas diferencias fundamentales, las cargas microbianas obtenidas por ambos métodos no fueron sustancialmente diferentes.

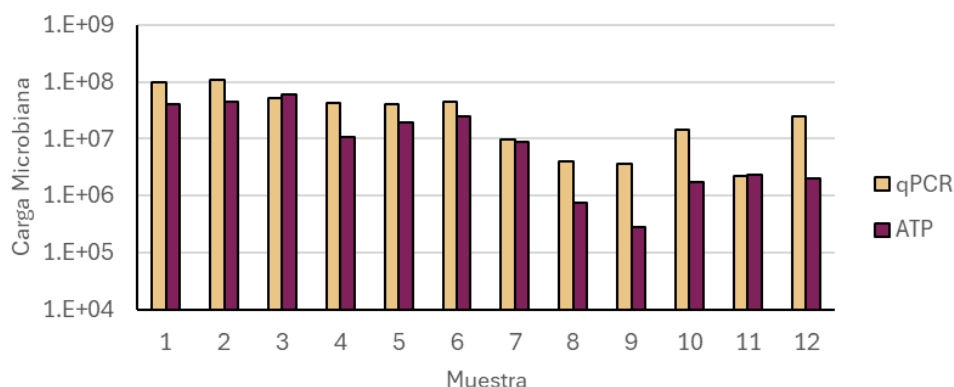


Figura 7 – Comparativa de la carga microbiana por qPCR (bacterias totales/mL) y por ATP (meq/mL).

Durante el piloto de Y-BAQ OD06, se registró el peso de los depósitos raspados a partir de media cara de los cupones. Este registro permitió calcular más tarde la cantidad de células por unidad de área del cupón, similar a la determinación por ATP. La Figura 8 muestra el promedio de la concentración de células para los cupones control y los expuestos al tratamiento con Y-BAQ OD06. Curiosamente, a diferencia de lo analizado por ATP, no se encontraron diferencias entre los tres batcheos (todos presentaron una carga de células por cm<sup>2</sup> similar). La eficiencia del producto a partir de estos datos es de 55%: el producto erradicó la mitad de los microorganismos presentes por unidad de área del cupón. Al analizar estos resultados debe tenerse en cuenta que, como se mencionó previamente, la qPCR tiende a sobreestimar la carga microbiana.

El dominio prevalente fue Bacteria, seguido por Archaea y, luego, Eukarya (representado por hongos). La concentración de genes metanogénicos en los cupones control fue  $(1.76 \pm 0.06) \times 10^6$  genes/cm<sup>2</sup>, mientras que en los cupones expuestos fue de  $(4.8 \pm 0.2) \times 10^5$  genes/cm<sup>2</sup>, esto sugiere una reducción del 70% en la capacidad metanogénica por acción del biocida.

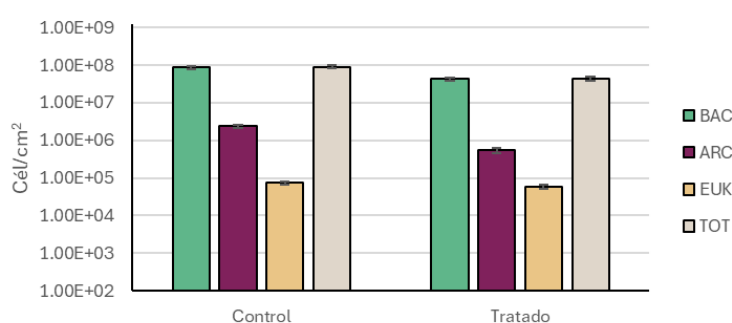


Figura 8 - Concentración de células por unidad de área para cada dominio. En gris la suma total.

Para analizar el biofilm formado sobre los cupones realizaron estudios por microscopía confocal laser de fluorescencia (CLFM), y por microscopía de barrido (SEM) con espectroscopía de energía de dispersión (EDAX).

Para la CLFM se utilizan fluoróforos específicos que se adhieren al ADN de las células viables (Syto 9, fluorescencia verde) o de las células no viables (Ioduro de propidio, fluorescencia roja), permitiendo analizar la relación y el arreglo espacial del biofilm. Estos fluoróforos se preparan sobre una matriz acuosa. Como se mencionó previamente, los depósitos contenían sólidos oleosos, la

naturaleza hidrofóbica de estos depósitos dificultó la penetración de los fluoróforos y, por lo tanto, la tinción. Si bien se lograron obtener algunas imágenes que permitieron construir proyecciones tridimensionales de los biofilms (Figura 1), estas imágenes no fueron suficientemente representativas como para realizar un análisis comparativo respecto al tratamiento. Se realizaron intentos de lavar el depósito con diferentes solventes (ASTM, 2025), sin embargo, el resultado de estos pretratamientos fue la desnaturalización del biofilm, impidiendo un análisis representativo.

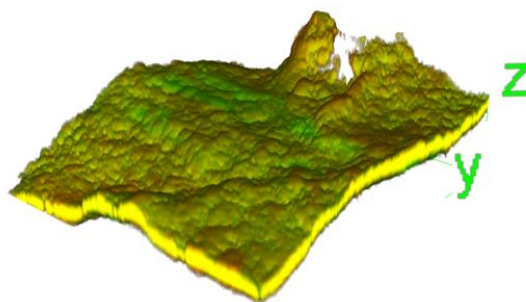


Figura 9 – Proyección del biofilm formado sobre los cupones. En verde se observan las células viables y en rojo las no viables; en amarillo, la yuxtaposición de viables y no viables.

Respecto al análisis por SEM y EDAX se encontró una problemática similar, dada las altas concentraciones de crudo y compuestos volátiles. Los cupones fueron lavados con solvente, antes de ser fijados y deshidratados según el protocolo standard para observación SEM. Las Figura 10 muestra algunas imágenes obtenidas tanto en el cupón control como en el expuesto a tratamiento. En las imágenes se pueden observar bacterias -con forma de bacilo-, fibras de polímero, incrustaciones y otros depósitos de características orgánicas. Se destaca que los microorganismos están inmersos en la matriz orgánica, conformando un depósito de muy alta complejidad (Flemming *et al.*, 2016). El análisis por EDAX (Figura 11) mostró, en forma general, alta proporción de compuestos orgánicos (dominancia de átomos de carbono y oxígeno), presencia de azufre, hierro, cloro y calcio. La alta carga de carbono dificulta la identificación del nitrógeno (asociado al polímero) ya que sus picos de energía se solapan.

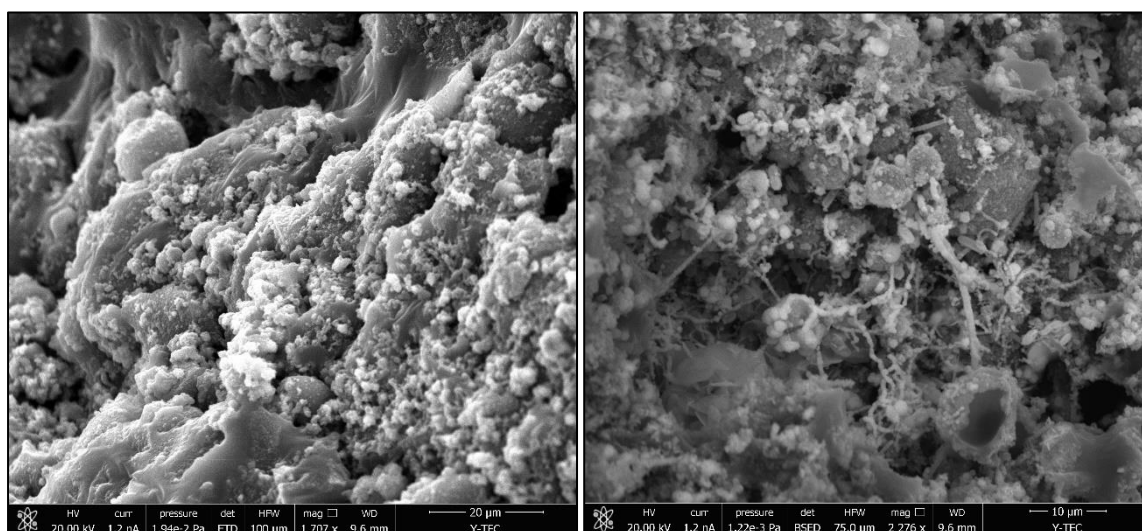


Figura 10 – Imágenes de SEM de los depósitos formados sobre los cupones.

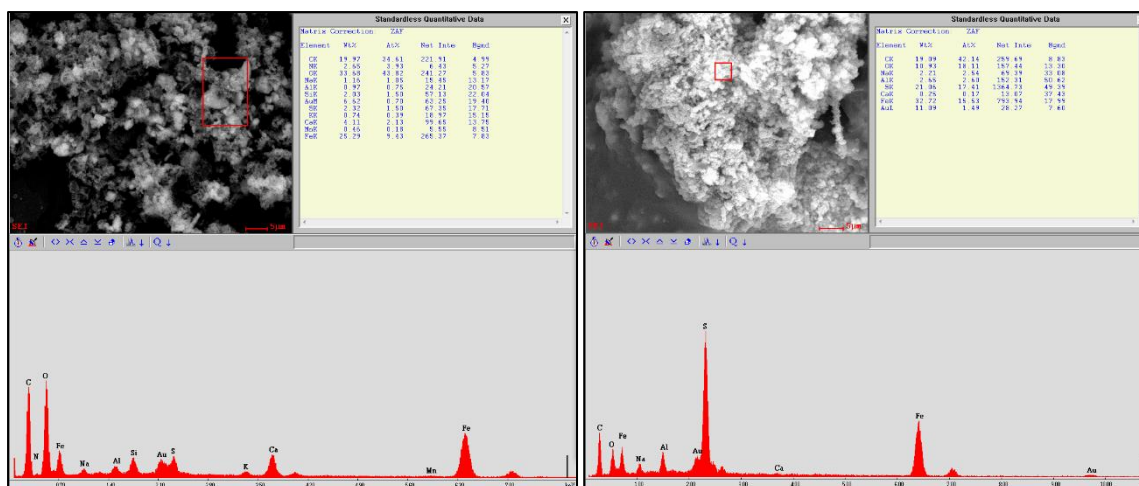


Figura 11 – Análisis EDAX de depósitos con alta presencia de compuestos orgánicos (carbono y oxígeno) y azufre.

## Conclusiones

El Loop (sistema sidestream) demostró ser un equipamiento útil para la formación de biofilms nativos en condiciones reales. Los mismos pueden desarrollarse en ~10 días en las condiciones operativas de la planta al momento de este estudio. Los biofilms obtenidos forman parte de una matriz compleja con alto contenido de sólidos oleosos e incrustaciones, con presencia de hierro, azufre, calcio, sodio y cloro, además de polímero.

Respecto a las pruebas piloto, ambos productos resultaron ser efectivos y apropiados para tratar operaciones con inyección de polímero.

El producto Y-EXP 03 BIO tiene una eficiencia destacable a nivel biofilm, siendo capaz de reducir en más de un 90% la actividad microbiana. Sin embargo, su eficiencia a nivel plantónico (75%) es menor a la esperada, de acuerdo con los resultados previos de laboratorio. El producto es efectivo contra microorganismos target como *Stutzerimonas* y *Sulfurospirillum*, pero no se evidencia efectividad contra el metabolismo metanogénico. No se evidenciaron problemas de incompatibilidad con otros químicos.

El producto Y-BAQ OD06, evaluado en la segunda campaña, presenta una excelente eficiencia a nivel plantónico (alcanzando una reducción de actividad microbiana de 96%), a nivel biofilm la eficiencia máxima de Y-BAQ OD06 es de 78%. Se destaca que el producto tiene la capacidad de erradicar (desprender) el 55% de las células del biofilm, y es efectivo contra el metabolismo metanogénico (70% de disminución). Esto, resaltando que el producto se aplicó en la dosis mínima recomendada según los ensayos de laboratorio. El producto no presenta incompatibilidades con el agua del sistema.

La presencia de crudo, sólidos oleosos y compuestos volátiles en los depósitos de los cupones dificultó la utilización de técnicas de microscopía (CLFM y SEM). Persiste el desafío de buscar técnicas alternativas que permitan analizar efectivamente la estructura de los depósitos y del biofilm en estas condiciones.

El *sidestream* significa una reducción considerable de los costos del piloto industrial: menor volumen de productos requeridos; menor tiempo necesario para obtener resultados a nivel biofilm; logística y planificación más sencilla; mayor libertad para evaluar concentraciones, frecuencias y duración del tratamiento; menor riesgo para el activo.

## Bibliografía

- ASTM International (2023). Standard Test Method for Measurement of Cellular Adenosine Triphosphate in Fuel and Fuel-associated Water With Sample Concentration by Filtration (ASTM D7687-23). <https://www.astm.org>
- ASTM International (2025). Standard Practice for Preparing, Cleaning, and Evaluating Corrosion Test Specimens (ASTM G1-25). <https://www.astm.org>
- Knisz, J., Eckert, R., Gieg, L. M., Koerdt, A., Lee, J. S., Silva, E. R., ... & Wade, S. A. (2023). Microbiologically influenced corrosion—more than just microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 47(5), fuad041.
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563-575.
- Joullié, M. M., & Lassen, K. M. (2010). Evolution of amide bond formation. *Arkivoc*, 8(189-250), 75.
- Zagitov, R., Venkat, P. S., Kothandan, R., Senthur, S., & Ramanathan, S. (2019, April). Challenges in selection and using of production chemicals with CEOR operations during polymer breakthrough phase. In SPE Oil and Gas India Conference and Exhibition? (p. D031S019R002). SPE.

## Breve CV

### Francisco Luis Massello:

Doctor en la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP), Licenciado en Biotecnología y Biología Molecular (UNLP).

Realizó investigaciones doctorales en el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI, CONICET) donde estudió la biorecuperación y biorremediación de metales pesados, y el potencial biotecnológico de microorganismos extremos de regiones volcánicas.

Desde hace 4 años, trabaja en Y-TEC SA donde lidera y participa de proyectos de I+D+i sobre control microbiano en sistemas de agua de la industria del petróleo y gas, diseñando químicos y soluciones innovadoras para proteger la integridad de los activos.

### María Leticia Legarto:

Es Licenciada en Química, egresada de la UNLP en 2006. Tiene una especialización en Ingeniería Ambiental realizada en la UTN FRLP (2007- 2008), donde actualmente se desempeña como profesora titular de la cátedra de Química Orgánica para Ingeniería Química. Forma parte del subcomité EOR del IAPG.

Realizó una especialización en EOR, en la Universidad de Texas en 2011. Ingresó a YPF en 2005 como pasante en petroquímica y a finales de 2007 se incorporó al ex CTA, actualmente YTEC, donde se desarrolló en el área de Analítica hasta 2009. Donde trabajó en proyectos de EOR como Tecnóloga para la misión de químicos innovadores para Petróleo y Gas. Actualmente se encuentra trabajando en la coordinación de Biocidas para la Oil and Gas.

### María Clara Pagliaricci:

Ingeniera Química, UNRC. Especialización en Siderurgia FIUBA. MBA y PMP.

Doctorado en Ciencia y Tecnología, mención Materiales, tesis en Corrosión Inducida por Microorganismos (MIC) en corrección, Instituto Sabato, CNEA-UNSAM.

Ingeniera de Procesos en plantas de revestidos en Ternium (2006-2011).

Jefe de Calidad en Bioteanol Río Cuarto (2012-2014).

Actualmente, Coordinadora del área de Biocidas en la Gerencia de Químicos, Biológicos y Combustibles y Líder Técnico del Consorcio MIC 2 en YPF TECNOLOGIA, YTEC.

**Isabel Natalia Vega:**

Especialización en Producción de Petróleo y Gas - Reservorios. (ITBA, dic 2020)

PhD Química Orgánica-Polímeros, calif. sobresaliente (FCEN-UBA, dic 2007. Beca otorgada en 2003 por el CONICET y Empresa de Servicios San Antonio SA).

Licenciatura en Cs Químicas (FCEN-UBA, mayo 2003)

Desde 2014 en YPF Tecnología SA. es Gerente de Productos Químicos, Biológicos y Combustibles: Portafolio de productos químicos y biológicos innovadores para el O&G, valor 80 MUSD. Desarrollo de combustibles sintéticos alternativos. Eval banco de motores.

Mentora de estudiantes avanzados Programa Fundación YPF (desde 2019 y continúa).

Miembro comité organizador eventos nacionales e internacionales de la SPE (IOR) (2018 al 2022).

Miembro de la subcomisión de EOR en IAPG (2016-2023).