

Evaluación integral microbiológica y primera aplicación tecnológica de biocidas preservantes en Yacimiento NOC de la Argentina

Por Marcela Morales Bobes y Marcelo Alcantu (Tecpetrol), Verónica Silva (IFF) y Gabriel Zalazar (Suez)

En este trabajo se realiza un estudio detallado de la problemática MIC (por sus siglas en inglés Microbial Induced Corrosion) mediante técnicas novedosas de monitoreo de la población microbiológica en todo el circuito del agua que se inyecta durante las operaciones de fractura hidráulica de pozos no convencionales. Estas técnicas se utilizaron en las etapas posteriores de flowback y producción.





Fortín de Piedra es un área de 243 km² sobre Vaca Muerta que se encuentra ubicado en la cuenca Neuquina. En 2017, Tecpetrol comenzó el desarrollo masivo del yacimiento, en el que ya lleva invertidos más de USD2.000 millones en la construcción de instalaciones, plantas, ductos, la perforación de pozos horizontales y la aplicación de técnicas, como la estimulación hidráulica. Hoy Fortín de Piedra es considerado un ejemplo para la industria a nivel mundial. Gracias al proyecto, se logró un aumento de los estándares de eficiencia: profundidad, presión, fluido, largo de las ramas horizontales, distanciamiento óptimo entre pozos y entre fracturas, etc. Y particularmente pioneros en la implementación de tecnologías innovadoras para el monitoreo y control de microorganismos.

En los últimos años se han desarrollado y adaptado técnicas de monitoreo y control microbiológico que permiten obtener una comprensión más acertada y completa del impacto de los microorganismos sobre las instalaciones y los pozos productores. Como veremos más adelante, estas técnicas, complementarias entre sí, nos permiten visualizar casi la totalidad de la población, caracterizar sus metabolismos y posibles efectos adversos en el ambiente en el que están presentes. Para el caso, en 2018 se empezó a trabajar sobre esta inquietud de obtener claridad en la información microbiológica relevada de campo, lo que redundará en mejoras en la toma de decisión. Inicialmente se plantearon las siguientes etapas para el estudio:

1. Benchmarking.
2. Relevamiento microbiológico de todas las instalaciones y toma de decisión.
3. Implementación de nuevas tecnologías biocidas.
4. Evaluación y optimización.

En este informe se presentan los resultados de las etapas 2-4, dado que la etapa de benchmarking extendería el informe. Esa etapa consistió en relevar información sobre operaciones similares tanto en la Argentina como en los Estados Unidos donde la operación no convencional ha alcanzado un mayor estado de madurez. Principalmente referido a las modalidades de uso de biocidas; tipo, dosificación, frecuencia y lugar de aplicación.

Desarrollo

Descripción de las técnicas utilizadas

De acuerdo con lo mencionado, se han utilizado técnicas avanzadas para la determinación microbiológica y la evaluación de los sistemas.

El equipo y todos los insumos utilizados para la obtención de muestras, la extracción de ADN, etc., se transportaron al laboratorio de campo de Tecpetrol/Suez y se instalaron temporalmente en el lugar. Se utilizaron frascos estériles para muestreo y se llenaron hasta el máximo posible a fin de minimizar la intrusión de oxígeno. Cada una de las muestras fue evaluada para estimarse la contaminación derivada de organismos planctónicos con el uso de:

1. **Determinación de ATP (adenosine trifosfato)**, conforme protocolo Quench-Gone™ Organic Modified Test Kit-Luminultra). Esta técnica mide actividad celular asociada a microorganismos vivos presentes en la muestra. Los KPI sugeridos por la técnica de manera general se consideran valores bajos cuando son < 100 pg/ml y valores elevados cuando superan los 1000 pg/ml. La zona segura de KPI se determina en combinación con las otras técnicas.
2. **Caldos tradicionales con salinidad ajustada** para evaluar la contaminación por bacterias reductoras de sulfato (BRS) y bacterias productoras de ácido (BPA) con ocho diluciones.
3. Las muestras fueron filtradas con intensidad de extraer ADN para análisis cuantitativos y cualitativos usando biología molecular (qPCR). Como se detalla a continuación:
 - Las muestras extraídas de ADN fueron sometidas a un mayor procesamiento mediante una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (real-time polymerase chain reaction, qPCR) a fin de determinar la abundancia de:
 - (1) **Total de bacterias.** Los números totales de bacterias se determinan mediante la utilización del gen objetivo, ARNr de 16S, que es común en todas las bacterias. La aparición promedio de este gen por célula se estima que es de entre 2 y 4 copias por genoma (3,6) (Klappenbach *et al.*, 2001) yet the rRNA genes can vary from one to as many as 15 copies. Despite the widespread use of 16S rRNA gene sequences for identification of prokaryotes, information on the number and sequence of individual rRNA genes in a genome is not readily accessible. In an attempt to understand the evolutionary implications of rRNA operon redundancy, we have created a phylogenetically arranged report on rRNA gene copy number for a diverse collection of prokaryotic microorganisms.

Each entry (organism). Se utilizan dos conjuntos de cebadores para la determinación del número total de bacterias en las muestras recuperadas (generalmente enumeradas como células/ml). Conjunto de cebadores 1 (Bac8F&Bac338) publicado por (Gittel *et al.*, 2009) y conjunto de cebadores 2 (los nombres de los cebadores no se enumeran, ubicaciones de hibridación del gen 325-343 y 791-766), publicado por (Nadkarni *et al.*, 2002). Los programas de qPCR fueron optimizados a partir de los programas enumerados en las publicaciones originales.

- (2) **Procariotas reductoras de sulfato (organismos que producen H₂S como parte de su metabolismo).** Se aplicó un par de cebadores dirigidos a un gen que codifica la subunidad de una proteína que es parte de la vía de reducción de sulfato y es común entre todos los microorganismos reductores de sulfato. Este gen (el gen de reducción de sulfato [*dissimilatory sulfate reduction*, DSR]) aparece solamente una vez en el genoma de todo microorganismo reductor de sulfato y puede, por lo tanto, ser un método preciso para cuantificar los organismos objetivo. Se utilizó el conjunto de cebadores, DSRp2060F y DSR4R, publicado por (Dar *et al.*, 2007; Foti *et al.*, 2007). El programa de qPCR fue optimizado a partir del programa enumerado en la publicación original.
- (3) **Total de Arqueas (un reino diferente de microorganismos unicelulares autóctonos de la mayoría de los campos de petróleo y ecosistemas asociados al petróleo).** Los números

Acondicionamiento de agua		Agua de río
		Planta de filtrado
		Almacenamiento
Set de fractura		Entrada piletas
		Salida piletas
		Salida PCM con biocida
Flowback		PAD-100
		PAD-101
		PAD-102
		PAD 200
Producción		PAD 201
		PAD 202
		PAD 203
		PAD 204
		PAD 205
		PAD 206
		PAD 207
	CPF	Ingreso Slug catcher
	CPF	Salida Separador Tren 1
	CPF	Salida Separador Tren 3
Plantas de separación	CPF	Ingreso TK agua
	CPF	Salida TK agua
	EPF	Salida EPF
	NOV	Entrada planta de inyección 1
	NOV	Agua de inyección sum 1
	NOV	Entrada planta de inyección 2
	NOV	Agua de inyección sum 2

Tabla 1. Detalle de los puntos de muestreo

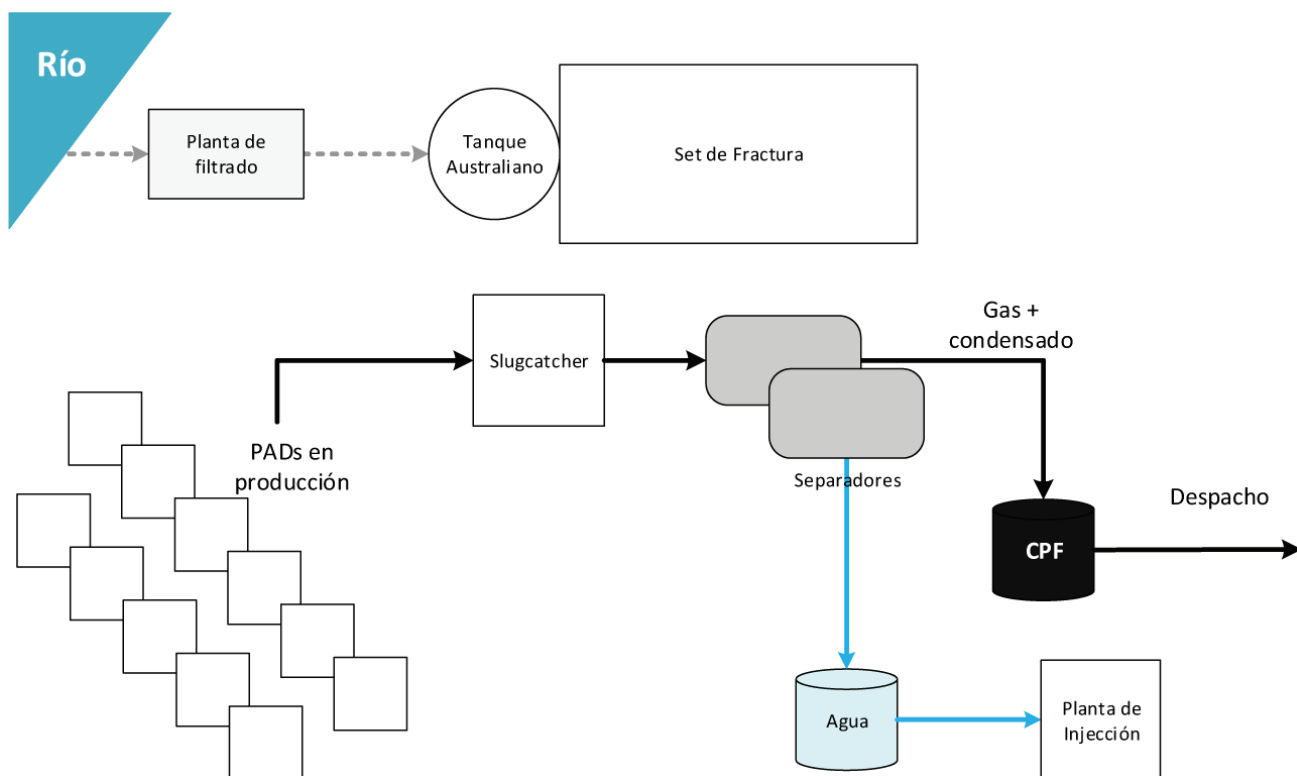


Figura 1. Esquema simplificado operación Fortín de Piedra.

totales de Arqueas en muestras también se determinaron mediante la utilización del gen ARNr de 16S. La aparición promedio de este gen en promedio por célula se estima que es de entre 1 y 2 copias (1,77) por genoma (Gittel *et al.*, 2009). Se aplicó un conjunto de cebadores para la determinación de las Arqueas en las muestras recuperadas, conjunto de cebadores: (Arch806F&Arch958R) publicado por (Gittel *et al.*, 2009). El programa de qPCR fue optimizado por DCM a partir del programa enumerado en la publicación original.

Relevamiento microbiológico de todas las instalaciones y toma de decisión

En este informe se presentarán los resultados de la primera auditoría realizada en enero de 2019. Se identificaron y clasificaron 27 puntos de muestreo que se detallan en la tabla 1 y la figura 1, que cubre:

A continuación, se presentan los resultados de todas las técnicas utilizadas individualmente y al final se encuentra una comparación de todas las técnicas utilizadas y una categorización final del nivel de criticidad de cada punto de acuerdo con este análisis integral.

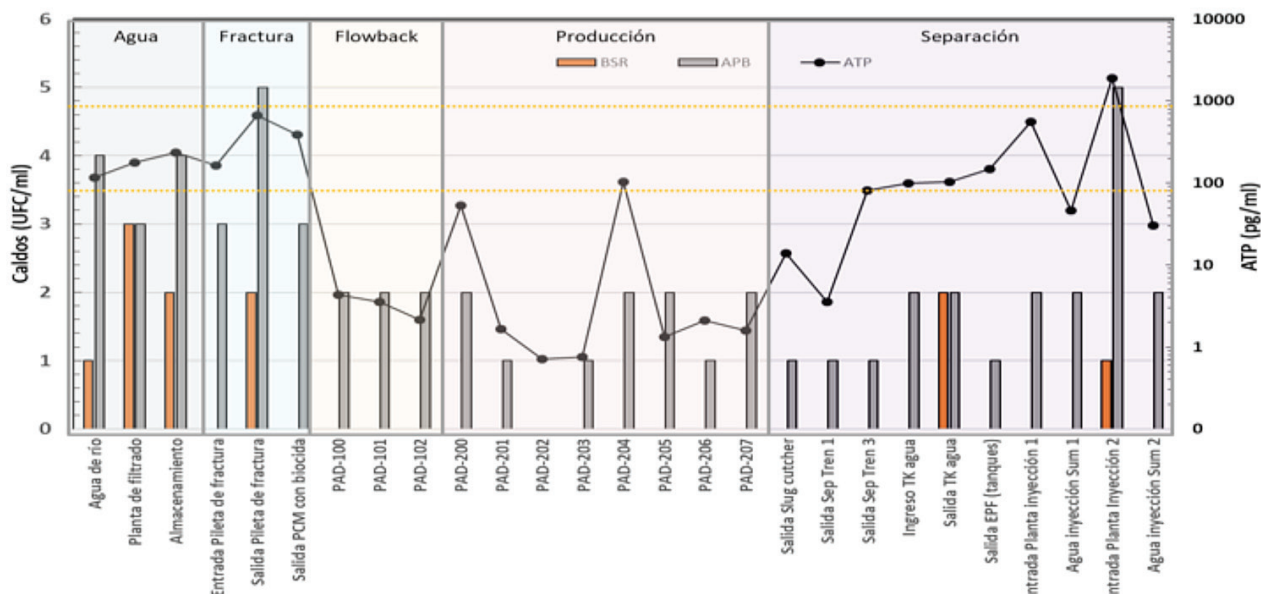


Figura 2. Resultados cuantitativos de microorganismos evaluados mediante ATP (pg ATP/ml) en el eje derecho, caldos BSR y BPA, eje izquierdo.

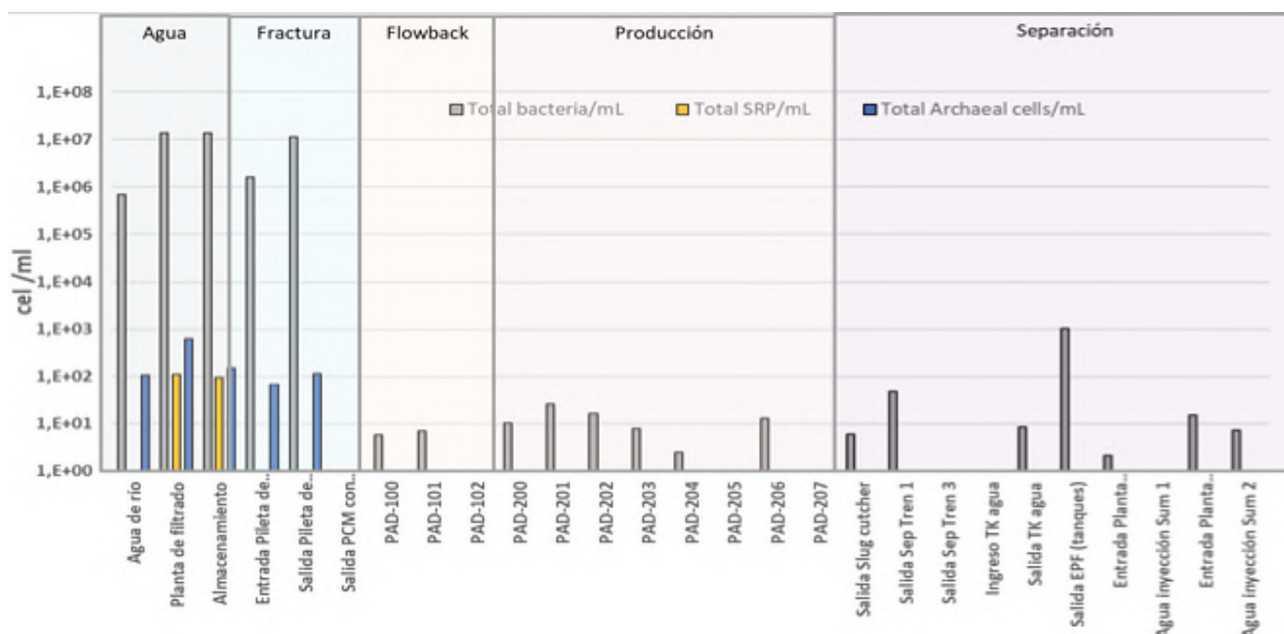


Figura 3. Resultados cuantitativos de microorganismos evaluados mediante qPCR (cell/ml).

En la figura 2 se incluyen los resultados de ATP y caldos de cultivos y en la figura 3 se presentan los resultados de qPCR para bacterias totales, sulfato reductoras procariotas (SRP) y arqueas totales.

En general, se observa una muy buena correlación entre ATP y caldos de cultivo. Es de notar que la problemática principal está asociada a la presencia de BPA, de manera constante por todas las etapas y con mayor relevancia en la zona de agua fresca y fractura.

Los resultados de qPCR son consistentes con los encontrados en caldos. SRP no tiene una presencia relevante más allá de la zona de agua fresca, pero en cantidades controlables. Más adelante con los resultados cualitativos se

complementará este análisis.

Los resultados cualitativos basados en NGS, se presentan en la figura 4 para género de bacterias totales, y en la figura 5, para género de arqueas totales. En concordancia con lo presentado en la figura 3, solo se ha conseguido amplificar resultados para las siguientes cinco muestras: Agua de río, Planta de filtrado, Almacenamiento, Entrada piletas y Salida de inyección, Salida EPF (solo bacterias).

En las figuras se ha mantenido la concordancia de colores/género para los diferentes ambientes de manera de facilitar la interpretación que se detalla en la siguiente sección.

Evaluación final considerando todas las técnicas

Considerando todas las técnicas utilizadas (ATP, caldos

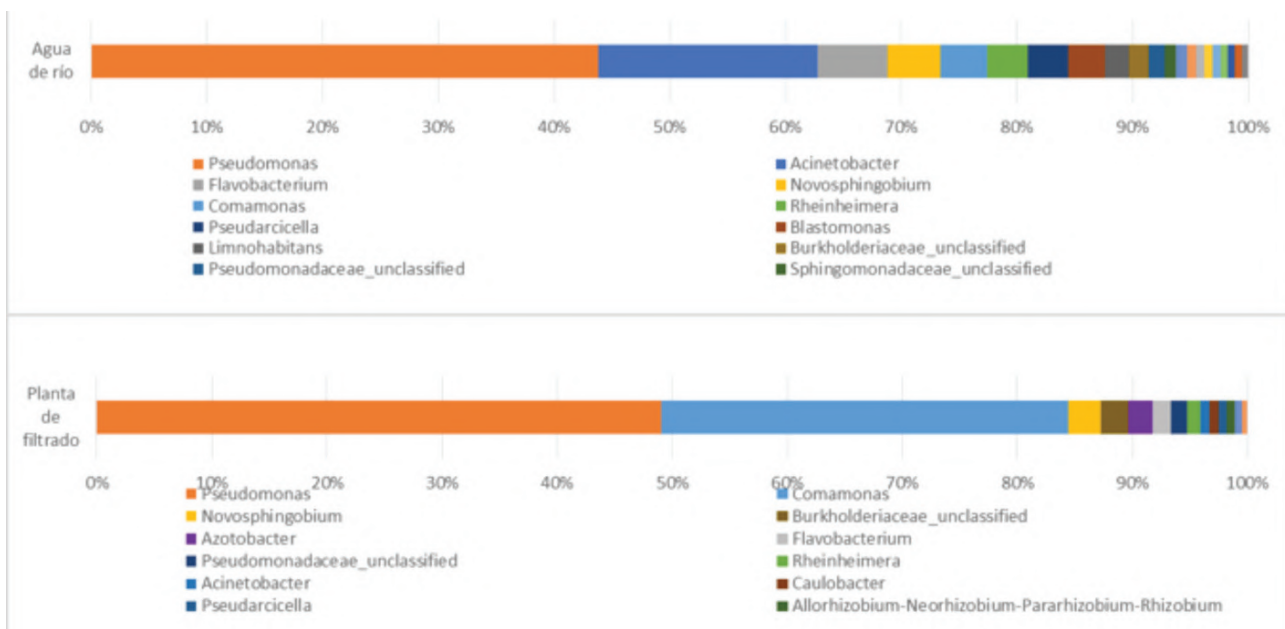




Figura 4. Resultados cualitativos en género de bacterias totales evaluados mediante NGS.

de cultivos, qPCR y NGS) se puede llegar a las siguientes conclusiones para cada una de las zonas estudiadas.

Agua fresca Fracturas Flowback Producción Separación

Zona de toma y agua fresca: esta zona se convierte en crítica principalmente por la elevada cantidad de BPA donde fue comprobado con qPCR/NGS la presencia de *Acineto-*

bacter en aproximadamente 10^5 células/ml desde la succión hasta el almacenamiento y se mantiene inalterado. En los tres puntos se encontró entre un 40-55% de *Pseudomonas* (105-106 células/ml) que tiene mayor tendencia a la formación de biopelícula. Se encontró además un grupo de bacterias cuyo metabolismo utiliza materia orgánica como podrían ser ciertos hidrocarburos.

Asimismo, de la cantidad de arqueas presentes, entre el 14-16% son metanogénicas y en muy poca cantidad, por lo tanto, no reviste gravedad.

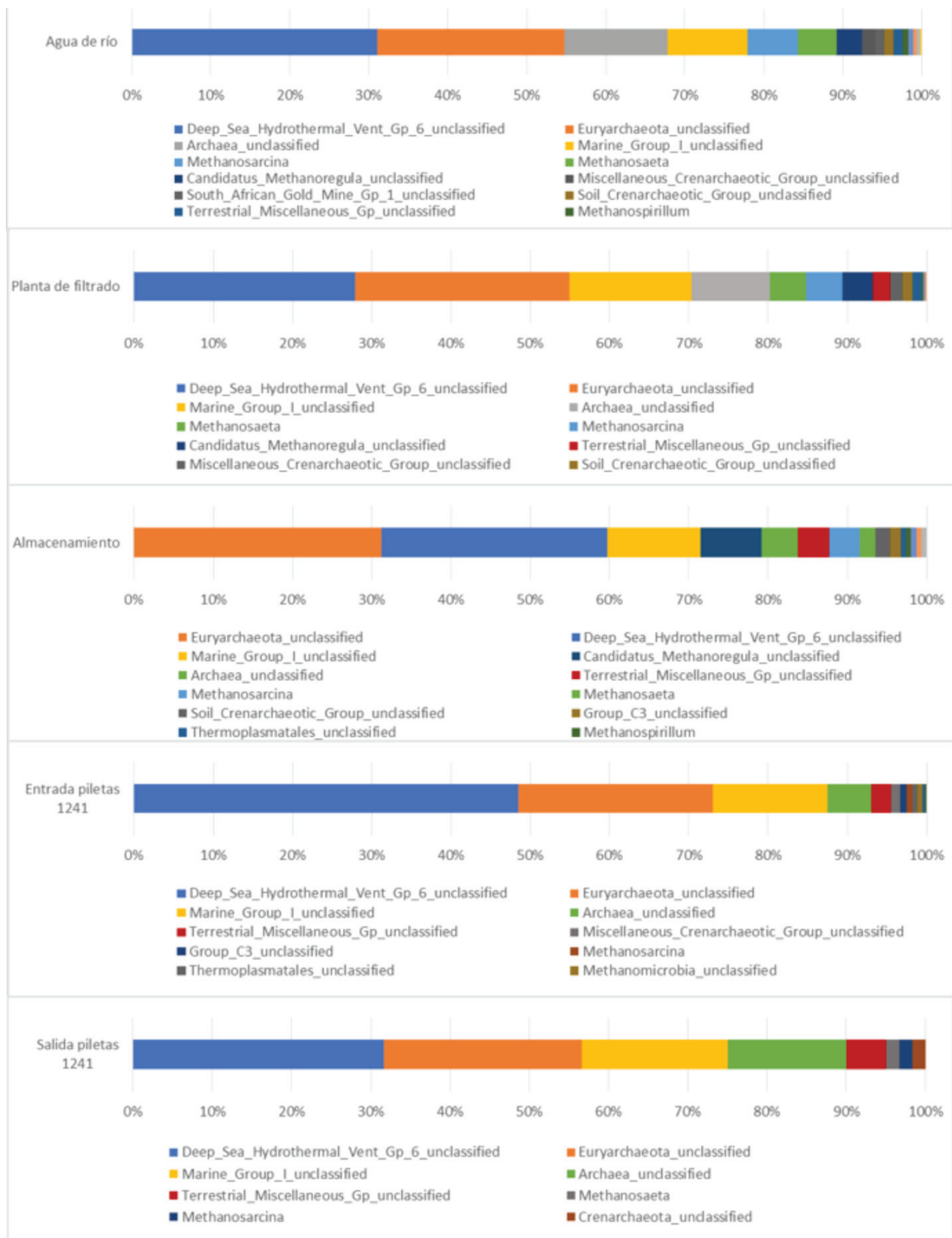


Figura 5. Resultados cualitativos en género de arqueas totales evaluados mediante NGS.

Los resultados obtenidos con caldos BSR y qPCR (SRP) son muy congruentes, se concluye que no hay cantidad relevante de microorganismos sulfato reductores.

Zona de fractura: para la zona del set de fractura, la situación se mantiene crítica entre la entrada y la salida de las piletas por la elevada cantidad de BPA medido con caldos

y validado con qPCR/NGS por la presencia de *Acinetobacter* y *Flavobacterium* en aproximadamente 105 células/ml. En los dos puntos de las piletas se encontró más de un 50% de *Pseudomonas* (106 células/ml) que presentan facilidad a la formación de biopelícula. Se mantienen además las mismas bacterias cuyo metabolismo utiliza materia orgánica, como ciertos hidrocarburos. Por último, de la cantidad de arqueas presentes, entre el 2-3% son metanogénicas y en muy poca cantidad, por lo tanto, nuevamente no reviste gravedad.

Los resultados obtenidos con caldos BSR y qPCR (SRP) nuevamente minimizan la gravedad de sulfato reductoras.

Para la salida de PCM con la acción del biocida, no se logró filtrar la muestra para ADN por la elevada viscosidad de la muestra. Se puede concluir que se logra bajar 2log la cantidad de BPA, por lo que su criticidad es baja.

Zona de producción: considerando todas las técnicas, el agua de flowback obtenida no presenta valores significativos de alta criticidad microbiana. No se evidencia presencia de arqueas ni BSR. Bajos valores de BPA.

En estas muestras, debido a la baja cantidad de ADN presente no se han podido evaluar NGS.

Zona de separación: los puntos analizados de la instalación CPF son finalmente evaluados como de riesgo bajo, dado que todos los parámetros indican baja contaminación.

En la salida de EPF se obtiene una calificación de criticidad media, debido a la presencia de BPA y se destaca la

presencia de un 70% de *Brevibacillus* que es un productor de biosurfactantes.

En la planta de inyección se detecta una alerta en ATP y BPA, que no es correspondida con los valores correspondientes de qPCR.

Implementación de nuevas tecnologías biocidas

Considerando los resultados presentados se optó por utilizar una categoría de biocidas con el objetivo de preservar geles de fractura, controlar microorganismos inyectados en el fluido de fractura a la formación como así también asegurar la protección de los activos. Para ello se utilizó una molécula denominada Tris(hydroxymethyl)nitromethane (THNM) (Figura 6). Esta molécula pertenece a la categoría de condensados de aldehídos con propiedades “preservantes”, debido a su acción lenta respecto de biocidas tradicionales.

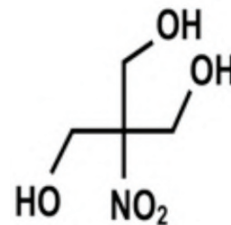


Figura 6. Molécula Tris(hydroxymethyl)nitromethane.

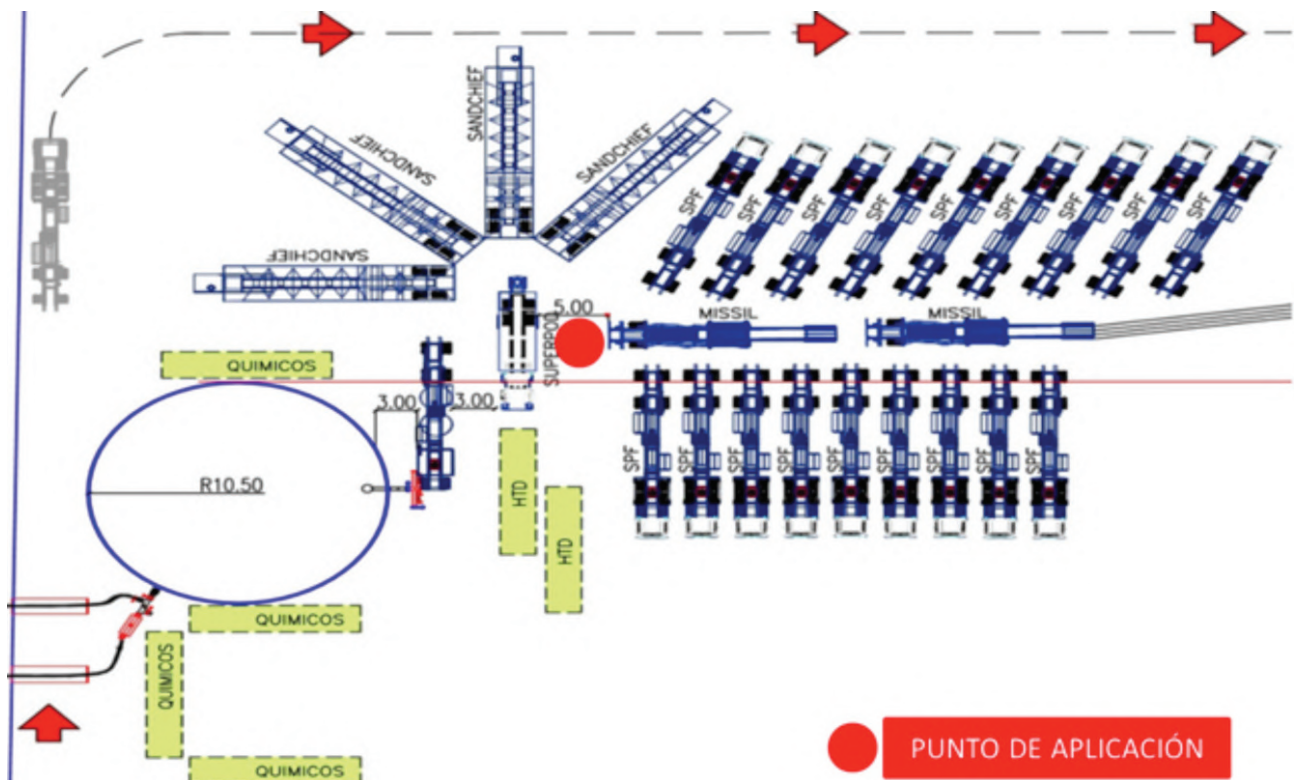


Figura 7. Esquema set de fractura.



En solución acuosa THNM se activa liberando tres moléculas de formaldehído, esta activación ocurre principalmente por encima de los 40-60 °C y/o pH mayor a 9. Condiciones típicas de los fluidos de fractura utilizados por Tecpetrol, que permiten que la mayor parte del biocida alcance la zona de fractura y sea activo en esta zona por un tiempo definido, que puede ir desde días hasta varias semanas según las condiciones de temperatura del reservorio.

Durante las evaluaciones preliminares se han incluido estudios de reología entre el slickwater y THNM y entre fluido de fractura final y THNM a 37,5 - 62,5 - 95 ppm de activo. La concentración de 62,5 ppm es la más adecuada para las condiciones de fractura. Como se observa en la figura 6, el punto de aplicación del biocida es en la mayor

proximidad del blender y aplicado a cada una de las etapas de fractura.

En la tabla 2 se presenta un resumen para cada uno de los pozos respecto a la aplicación del biocida seleccionado. Se realizaron 63 fracturas por cada pozo y se puede observar que el promedio de todas ellas está dentro del rango de tolerancia esperado para la dosificación elegida de 250 ppm de producto comercial que representa los 62,5 ppm de activo THNM.

	Mínimo	Promedio	Máximo
Pozo 1	88	248	313
Pozo 2	200	254	335

Tabla 2. resumen de dosificaciones.

Evaluación y optimización

A continuación, se presentan los resultados obtenidos mediante las mismas técnicas cuantitativas; ATP y caldos de cultivos en figura 8 y qPCR en la figura 9. En las ellas se incorporan los resultados desde el momento de la fractura, se incorporan las primeras semanas de flowback y posteriormente se han tomado muestras de manera mensual o bimensual.

En la figura 8 se puede observar como por el lapso de los casi 20 meses posteriores a la apertura de estos pozos se ven únicamente muy bajos conteo de BPA de manera ocasional y nunca superando los 2 log.

En el caso de ATP los valores se mantienen muy por debajo de la zona segura de 100 pg/ml. En los resultados de figura 9, muchos de los valores muestran ausencia de ADN y, en la gran mayoría, la cantidad de material recolectado no es cuantificable. sumado a los resultados de las figura 8 demuestran el excelente comportamiento de estos pozos posapertura en términos de contaminación microbiológica. Por este motivo no se presentan resultados de NGS en estas zonas.

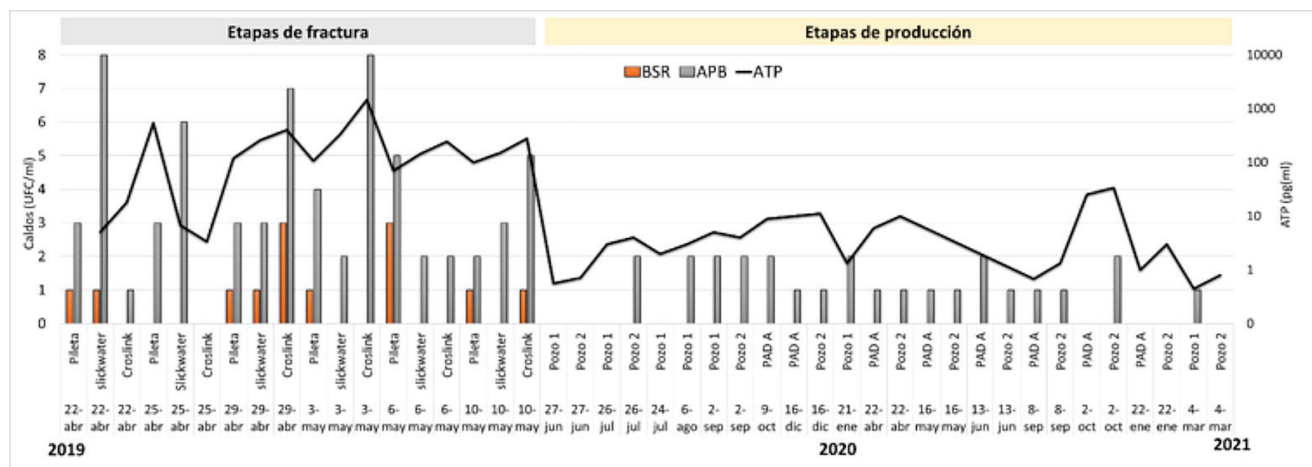


Figura 8. Resultados cuantitativos de microorganismos evaluados mediante ATP (pg ATP/ml) eje derecho, caldos BSR y BPA, eje izquierdo para los pozos evaluados con THNM.

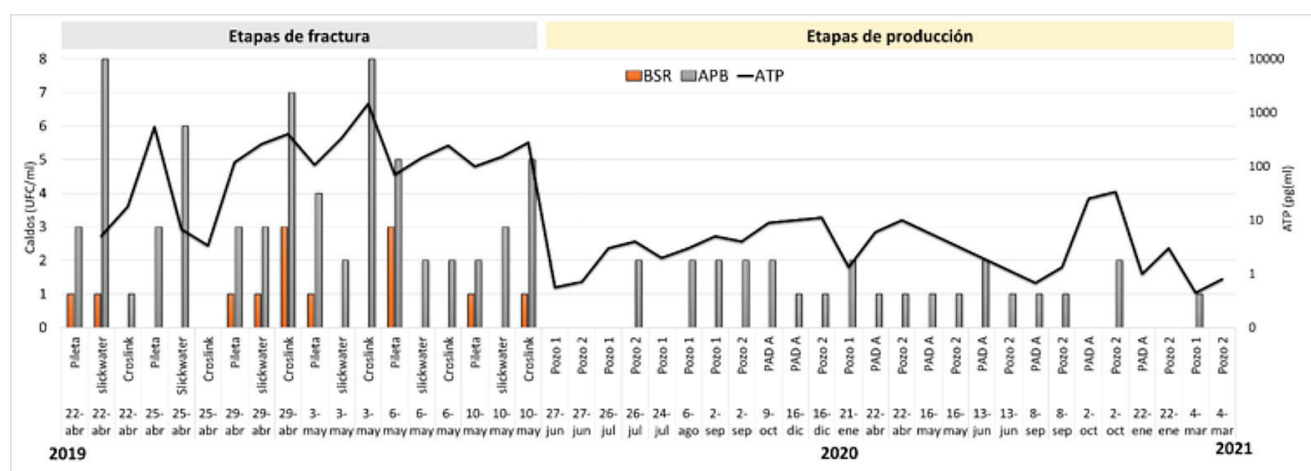


Figura 9. Resultados cuantitativos de microorganismos evaluados mediante qPCR (cel/ml).

No hay evidencia ni presencia de bacterias sulfato reductoras (o tiosulfato reductoras) ni tampoco de arqueas de ningún tipo.

Cuando se introducen biocidas del tipo preservantes como en el caso de THNM se esperar un retraso importante en la aparición de microorganismos que cubra los años de mayor actividad del pozo. Luego de ese período podría haber signos de microorganismos (o no), depende del nivel de control alcanzado en fondo durante la fractura y meses subsiguientes. Como en estos pozos no se puede volver a introducir biocida durante la etapa productiva, este nivel de control queda limitado a la concentración elegida durante la fractura.

Conclusiones

En este proyecto se han considerado cuatro técnicas diferentes para evaluar la situación microbiológica en Fortín de Piedra. De las cinco regiones evaluadas se pueden puntualizar las siguientes conclusiones importantes:

1. La presencia y permanencia de BPA en desde el agua fresca, hacia la fractura y hacia la formación que se evidencia luego con valores bajos de BPA en producción, pero que probablemente han sido introducidos durante las fracturas correspondientes.
2. La presencia de varios géneros de bacterias denominadas "Chemolithoautotrophic", se trata de microbios que utilizan moléculas orgánicas e inorgánicas como fuente de energía para hacer su propio alimento. Algunas bacterias utilizan sulfuro de las rocas para su ciclo de vida. Se puede elaborar la teoría que estos microorganismos puedan sobrevivir asociados al condensado y por eso se encuentran (en menor cantidad) en la salida de EPF.
3. Bacterias sulfato reductoras y arqueas por el momento no revisten gravedad en esta evaluación.

Como medida de optimización y con el fin de mejorar el control de superficie y de fondo de pozo, se utilizó una

molécula denominada Tris(hydroxymethyl)nitromethane (THNM) dosificada en cada una de las etapas de fractura en concentración de 62,5 ppm. Esta molécula pertenece a la categoría de condensados de aldehídos con propiedades "preservantes", debido a su acción lenta respecto de biocidas tradicionales.

Luego de la evaluación del piloto: se evidencia en general que los resultados obtenidos son muy satisfactorios donde todos los parámetros están muy por debajo de los KPIs. Como en la auditoria inicial, se observa la presencia de BPAs en valores bajos y de aparición aleatoria en el tiempo. Luego de este piloto, esta tecnología fue adoptada por Tecpetrol para los pozos subsiguientes.

Referencias

- DAR, S. A. *et al.*, "Analysis of diversity and activity of sulfate-reducing bacterial communities in sulfidogenic bioreactors using 16S rRNA and dsrB genes as molecular markers", *Applied and environmental microbiology*, 73 (2), p. 594-604, jan. 2007.
- FOTI, M. *et al.* "Diversity, Activity, and Abundance of Sulfate-Reducing Bacteria in Saline and Hypersaline Soda Lakes", *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (7), p. 2093 LP-2100, 1 abr. 2007.
- GITTEL, A. *et al.*, "Prokaryotic Community Structure and Sulfate Reducer Activity in Water from High-Temperature Oil Reservoirs with and without Nitrate Treatment", *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (22), p. 7086 LP-7096, 15 nov. 2009.
- KLAPPENBACH, J. A. *et al.*, "rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database", *Nucleic acids research*, 29 (1), p. 181-184, 1 jan. 2001.
- NADKARNI, M. A. *et al.*, "Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set", *Microbiology Institute of Dental Research, Westmead Centre For Oral Health, Westmead Hospital, PO Box 533, Wentworthville*, NSW 2145, Australia, 2002.