



**Universidad Nacional del Comahue**  
**Facultad de Ciencias del Ambiente y Salud**  
**Licenciatura en Saneamiento y Protección Ambiental**

**“BIOCIDA DE BAJO IMPACTO AMBIENTAL: EVALUACIÓN DE BIOCIDAS  
PARA EL CONTROL DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS”.**

**Autor:** Demel, María Estefanía

**Director:** Pezzullo, Desirée

**Co- director:** Lavalle, Andrea

**Lugar de trabajo:** Laboratorios Champion Technologies- Centenario, Neuquén

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE LICENCIADA EN  
SANEAMIENTO Y PROTECCIÓN AMBIENTAL.

SEPTIEMBRE 2016

## **Agradecimientos:**

Quisiera agradecer especialmente a mi familia y amigos, que me han apoyado incondicionalmente a lo largo de este camino. Gracias a mi esposo e hijos, gracias a mis padres y hermanos, porque fueron aquellas personas que me empujaron para que continuara en aquellos momentos difíciles. Gracias por hacer posible este logro.

Luego no quisiera dejar de nombrar a aquellas personas que han participado en el desarrollo de este trabajo, los cuales fueron una pieza fundamental para la investigación, ellos son: Pezzullo, Desirée; Lavallo, Andrea; Echevoy, Claudio; Aroca, Ricardo; Lillo, Esteban; Guerrero, Mauro y el equipo de trabajo de Champion Technologies.

Muchísimas gracias a todos.

# Índice

---

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1. MICROBIOLOGÍA DEL TRATAMIENTO DE AGUA</b> .....	<b>4</b>
2.1.1 <i>Clasificación de los microorganismos encontrados en los sistemas de distribución de aguas de los Yacimientos Petrolíferos</i> .....	4
<b>2.2. PROCESO DE BIOENSUCIAMIENTO</b> .....	<b>7</b>
2.2.1. <i>Corrosión microbiológica</i> .....	10
<b>2.3 BACTERIAS CAUSANTES DE PROBLEMAS EN LA INDUSTRIA PETROLERA</b> .....	<b>12</b>
2.3.1. <i>Bacterias Sulfato Reductoras (BRS)</i> .....	14
2.3.1.1 Tipos de Bacterias Sulfato Reductoras.....	16
2.3.1.2. Factores ambientales.....	18
2.3.2. <i>Bacterias que oxidan y precipitan el hierro (BPOM)</i> .....	21
2.3.3. <i>Bacterias Formadoras de Limo</i> .....	22
2.3.4. <i>Bacterias que reducen metales (aerobias) MRB</i> .....	22
<b>2.4. PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIANA</b> .....	<b>23</b>
2.4.1. <i>Control Químico de microorganismos</i> .....	23
2.4.2. <i>Clasificación y mecanismos de acción de biocidas</i> .....	24
<b>3. METODOLOGÍA</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1. DESCRIPCIÓN DEL LUGAR</b> .....	<b>26</b>
<b>3.2. SELECCIÓN DE PUNTOS DE MUESTREO</b> .....	<b>29</b>
<b>3.3. TOMA DE MUESTRA</b> .....	<b>34</b>
3.3.1. <i>Primer etapa</i> .....	35
3.3.1.1. Recuento de Bacterias Sulfato Reductoras.....	35
3.3.1.2. Parámetros Físico-Químicos.....	38
3.3.2. <i>Segunda Etapa</i> .....	41
3.3.2.1. Selección de biocidas.....	41
3.3.2.2. Time Kill test.....	42
<b>3.4. ANALISIS DE DATOS</b> .....	<b>43</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....	<b>45</b>
<b>4.1. PRIMER ETAPA</b> .....	<b>45</b>
4.1.1. <i>Recuento de Bacterias Sulfato Reductoras</i> .....	45
4.1.2. <i>Parámetros físico - químicos</i> .....	47
<b>4.2. SEGUNDA ETAPA</b> .....	<b>49</b>
4.2.1. <i>Time kill test</i> .....	49
4.2.2. <i>Análisis de la varianza</i> .....	56
<b>5. CONCLUSIÓN</b> .....	<b>62</b>
<b>6. ANEXOS</b> .....	<b>64</b>
ANEXO I.....	64
ANEXO II.....	68
ANEXO III.....	74
ANEXO IV.....	79
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>81</b>

## Índice de Figuras

---

Figura 1: Diagrama generalizado de una típica célula bacteriana.....	5
Figura 2: Micrografías Eucarióticas; a) Algas verde colonial Volvox; b) Hongos, estructura productora de esporas en un hongo filamentoso típico; c) Protozoos.....	7
Figura 3: Etapas del proceso de Bioensuciamiento.....	8
Figura 4: a) Bacterias planctónicas que viajan en el sistema (aumento 10x); b) Bacterias sésiles adheridas a la superficie (aumento 10x). .....	9
Figura 5: Bioensuciamiento en cañerías de acero al carbono. ....	10
Figura 6: Corrosión microbiológica. a) Área atacada cubierta por un revestimiento de producto corrosivo; b) El acero tiene una superficie moteada; c) Apariencia típica de picadura iniciada por bacterias.....	12
Figura 7: Sistema de agua con altos recuentos de BSR y elevados tenores de ácido sulfhídrico (SH <sub>2</sub> ).....	14
Figura 8: Transformaciones químicas atribuidas a las bacterias reductoras de sulfato. ....	15
Figura 9: a) Bacterias Sulfato Reductoras con su típica forma de coma o vírgula (SEM) 10000X. b) Bacteria Sulfato Reductoras (SEM) 15000X. ....	18
Figura 10: Área de estudio seleccionado delimitada en color rojo. ....	27
Figura 11: Diagrama de flujo del agua de producción de Lindero Atravesado.....	29
Figura 12: Puntos rojos observados en el mapa, indican los puntos de muestreo seleccionados.....	30
Figura 13: a) Vista frontal del sitio de muestreo; b) Vista lateral del sitio de muestreo; c) Imagen aérea del sitio de muestreo. ....	31
Figura 14: a) Vista frontal del sitio de muestreo; b) Vista lateral del sitio de muestreo; c) Imagen aérea del sitio de muestreo. ....	32
Figura 15: Las diferentes imágenes muestran el sitio de muestreo desde diferentes ángulos.....	33
Figura 16: En las diferentes imágenes se puede observar el punto de muestreo y su ubicación en el sitio. ....	34
Figura 17: Preparación de los caldos BRS.....	36
Figura 18: Muestras de agua representativa de cada punto de muestreo.....	37
Figura 19: Digital Titration para medir salinidad. ....	39

Figura 20: a) Pistola láser para medir temperatura; b) pH-metro digital para medir pH. .....	39
Figura 21: a) Kit utilizado para medir oxígeno; b) Ampollas utilizadas para medición.	40
Figura 22: a) Equipo utilizado para medición ácido sulfhídrico; b) Toma de muestra en campo.....	41
Figura 23: Lectura de caldos de punto compresor B: 4 caldos positivos. ....	45
Figura 24: Lectura de caldos de punto compresor C: 5 caldos positivos. ....	46
Figura 25: Lectura de caldos de Gasolinoducto: 5 caldos positivos. ....	46
Figura 26: Lectura de caldos de Tanque 3: 5 caldos positivos. ....	47
Figura 27: Vista de frente de la inoculación de los caldos BRS para el Punto compresor B. ....	50
Figura 28: Vista inferior de los caldos de BRS reaccionados luego de 21 días para el Punto compresor B.....	51
Figura 29: Vista de frente de la inoculación de los caldos BRS para el Punto compresor C.....	52
Figura 30: Vista inferior de los caldos de BRS reaccionados luego de 21 días para el Punto compresor C. ....	52
Figura 31: Vista de frente de la inoculación de los caldos BRS para el Gasolinoducto. .....	53
Figura 32: Vista inferior de los caldos de BRS reaccionados luego de 21 días para el Gasolinoducto. ....	53
Figura 33: Vista de frente de la inoculación de los caldos BRS para el Tanque 3. ....	54
Figura 34: Vista inferior de los caldos de BRS reaccionados luego de 21 días para el Tanque 3.....	54
Figura 35: Ejemplo de viales positivos.....	68
Figura 36: Lectura: 1 caldo positivo (10 BRS/ml).....	69
Figura 37: El 4 vial presenta turbidez, pero no debido a la presencia de BRS. Lectura 2 caldos positivos (102 BRS/ml).....	69
Figura 38: Lectura: 3 caldos positivos (103 BRS/ml).....	70
Figura 39: Lectura: 3 caldos positivos (103 BRS/ml).....	70
Figura 40: Lectura: 2 caldos positivos (102 BRS/ml).....	71
Figura 41: Lectura: 3 caldos positivos (103 BRS/ml).....	71

Figura 42: Lectura: 4 caldos positivos (104 BRS/ml). .....	71
Figura 43: Ejemplo de caldos oxidados luego de la inoculación. Lectura: No considerar. Repetir muestreo. ....	72
Figura 44: Caldos dudosos antes de la agitación (arriba) y después de la agitación (abajo). ....	72
Figura 45: Lectura (izquierda): 3 caldos positivos (103 BRS/ml); Lectura (derecha): 2 caldos positivos (102 BRS/ml).....	73
Figura 46: Gráfico de Residuales versus Predichos para la variable de respuesta.....	79
Figura 47: Gráfico de probabilidad normal .....	80

## Índice de Tablas

---

Tabla I: Familias de Bacterias Sulfato Reductoras. ....	17
Tabla II: Clasificación de biocidas. ....	25
Tabla III: Lectura de resultados de Técnica de Extensión- Dilución para enumerar Bacterias Sulfato Reductoras en agua de campo. ....	38
Tabla IV: Biocidas seleccionados para el ensayo Time Kill Test.....	42
Tabla V: Valores de parámetros Físicos – Químicos de agua de producción. ....	47
Tabla VI: Resultado de análisis de datos.....	56
Tabla VII: Análisis de comparación de medias de Tukey. ....	57
Tabla VIII: Respuesta media por dosis según el tipo de Biocida.....	57
Tabla IX: Respuesta media por Biocida según dosis. ....	58
Tabla X: Inoculación de caldos BRS- Punto Compresor B.....	74
Tabla XI: Inoculación de caldos BRS- Punto Compresor C .....	75
Tabla XII: Inoculación de caldos BRS- Gasolinoducto .....	76
Tabla XIII: Inoculación de caldos BRS- Tanque 3.....	77
Tabla XIV: Resultados del Time Kill Test.....	78
Tabla XV: Prueba de homogeneidad de varianzas (Levene) para el Factor Biocida ....	79
Tabla XVI: Prueba de homogeneidad de varianzas (Levene) para el Factor Dosis .....	80
Tabla XVII: Prueba de homogeneidad de varianzas (Levene) para el Bloque.....	80

## RESUMEN

---

Históricamente, el control de Bacterias Sulfato Reductoras en la industria del petróleo y gas se ha logrado con una amplia variedad de biocidas. Estos se han ido acotando en el mercado debido a que sus características ambientales y su eliminación en las aguas cada vez son más preocupantes. Por lo cual ha surgido una gran presión regulatoria sobre el uso de los mismos.

Para el desarrollo de este trabajo se han seleccionado cuidadosamente los biocidas comerciales: Bactron L-1032, Bactron L-95, Bactron L-54, Bactron L-133, y sus respectivas dosis de aplicación: 0, 10, 30, 50, 100 ppm, con el fin de encontrar a través de un ensayo Time Kill Test, una combinación dosis-biocida mínima que sea efectiva para el control de Bacterias Sulfato Reductoras en la Industria del petróleo y gas. Dichos ensayos permitirían minimizar el uso de los mismos y el impacto que estos y las Bacterias Sulfato Reductoras pueden ocasionar sobre el ambiente.

De los biocidas ensayados, el Bactron L-1032 logró a una dosis de 30 ppm, el mayor rendimiento en lo que respecta al control microbiológico en el Yacimiento Lindero Atravesado, Neuquén.

Si se requiere eliminar este producto como residuo, existen métodos fácilmente disponibles y eficaces para degradar químicamente los compuestos y de esta forma minimizar aún más los efectos ambientales adversos potenciales. A su vez resulta ser un producto accesible a la comercialización y no posee restricciones legales de uso.

**Palabras clave:** Biocidas, Dosis, Bacterias Sulfato Reductoras, Time Kill Test.



## ABSTRACT

---

Control of sulfate-reducing bacteria in the oil and gas industry has been historically achieved with a wide variety of biocides. The use of them has been restricted in the market because of their environmental characteristics and the elimination in the waters. Both problems are becoming increasingly worrying. Therefore, there has been a great pressure on the regulation on the use of biocides in field.

In this work commercial biocides: Bactron L-1032, Bactron L-95, Bactron L-54, Bactron L-133, have been carefully selected as well as the application doses: 0, 10, 30, 50, 100 ppm. Trial Time Kill test were applied in order to find the minimum dose of biocide that is effective for controlling sulfate-reducing bacteria in water samples taken from the oil and gas industry. Such assays allow minimizing the concentration to be used and the impact that sulfate-reducing bacteria can cause on the industrial systems where they live.

Among the biocides tested, Bactron L-1032 at 30 ppm, achieved the highest yield with respect to microbiological control in samples taken in Yacimiento Lindero Atravesado, Neuquén.

If the removal of biocide as waste product is required, effective chemical methods are available and further minimize potential adverse effects on environment. Additionally, it is an affordable product in the market and it has no legal restrictions on use.

**Keywords:** Biocides, dose, sulfate-reducing bacteria, Time Kill Test.

## 1. INTRODUCCIÓN

---

La Industria Hidrocarburífera es considerada uno de los puntales de la actividad económica en la provincia de Neuquén. A su vez es también considerada una de las actividades más riesgosas para la zona, junto con la ganadería, debido a que generan disturbios de carácter antropogénico en el ambiente. Por lo que es de vital importancia minimizar el riesgo que imprime cada tarea que se desarrolla en torno a esta, ya que no solo afecta al interés de la industria, sino que también lo hace al ecosistema (Martínez Carretero, 2013).

Uno de los problemas frecuentes que sufre la industria Hidrocarburífera es la contaminación microbiana (Williams & Cooper, 2014), donde organismos tales como algas, protozoos, hongos y fundamentalmente bacterias causan taponamientos e intervienen en procesos corrosivos atacando y degradando materiales. A veces la sola presencia física de células microbianas es suficiente para causar daño, pero en general, el deterioro es causado por la excreción de productos metabólicos intermediarios y finales, tales como las exoenzimas (Sand, 1997).

Los procesos de adherencia microbiana comienzan inmediatamente después de la inmersión de una superficie metálica en un medio acuoso natural o industrial y conducen a la formación de biopelículas (Guiamet & Gómez de Saravia, 2003). Las biopelículas contienen aproximadamente 95% de agua en una matriz de sustancias exopolisacáridas (EPS), en la cual las células y los detritus orgánicos están suspendidos. La presencia de estas biopelículas explicaría las alteraciones físicas, químicas y biológicas que ocurren en la interfase metal/solución anteriores al inicio del ataque localizado o inhibición de la corrosión (Guiamet & Gómez de Saravia, 2003).

La adherencia de microorganismos a la superficie afecta una amplia variedad de sistemas industriales y operacionales, tales como sistemas de enfriamiento de agua, sistemas de inyección de agua, industrias termoeléctricas e industrias del petróleo (Guiamet & Gómez de Saravia, 2003). En la base de la biopelícula, pueden darse condiciones ambientales de bajo potencial redox, creando zonas de concentración diferencial de oxígeno que favorecen el desarrollo de las

Bacterias Sulfato Reductoras, ocasionando como resultado serios problemas de corrosión metálica (Beech & Gaylarde, 1999).

Los hábitats en los cuales las Bacterias Sulfato Reductoras poseen una elevada actividad metabólica, tiene como consecuencia la producción de ácido sulfhídrico, lo que se pone en evidencia con el ennegrecimiento del agua y producción de sedimentos debido a la precipitación de sulfuro de hierro (Patton, 1986). El taponamiento en las cañerías puede ser debido al bioensuciamiento, a la generación de productos de la corrosión, como ácido sulfhídrico o a la precipitación del hierro soluble del agua (Patton, 1986).

Históricamente el control microbiano en la industria del petróleo y gas se ha logrado con la aplicación de biocidas, los cuales son productos químicos tóxicos para los microorganismos. A lo largo del tiempo se ha ido descartando el uso de ciertos productos por la afectación que estos tenían, tanto al hombre como al ambiente. Por lo tanto, el conocimiento de las características generales y sobre todo la ecotoxicidad y la identificación de riesgos de los biocidas industriales son fundamentales para su uso seguro y para la protección de los requisitos regulatorios ambientales. De igual modo es importante considerar la cantidad de biocida que puede ser dosificado por un producto específico para una determinada aplicación (Figuroa de Gil, et al., 2012).

Para evaluar el impacto potencial que tiene un biocida en el ambiente, se requiere de diferentes aspectos, como ser; el riesgo relativo del biocida en el ambiente, en función de la toxicidad inherente de un compuesto y su escenario de exposición durante su uso, el mecanismo de acción de cada biocida, la regulación legislativa. A su vez ofrecerá una revisión de la ecotoxicología de biocidas industriales utilizados en la industria del petróleo y el gas, actualmente (Williams & Cooper, 2014).

## Objetivos

### General

- Seleccionar un biocida sustentable para controlar el crecimiento de las Bacterias Sulfato Reductoras, a fin de minimizar el impacto en el ambiente.

### Específicos:

- Indagar de qué manera las Bacterias Sulfato Reductoras afectan el sistema en el que se desarrollan.
- Investigar la afectación que tiene cada biocida seleccionado en el ambiente.
- Evaluar a través de un Diseño en Bloques Completos al Azar con un arreglo factorial de tratamientos, la dosis mínima adecuada que sería recomendable inyectar en el tratamiento, para evitar problemas de corrosión en la instalación de las cañerías y formación.

## 2. MARCO TEÓRICO

---

### 2.1. MICROBIOLOGÍA DEL TRATAMIENTO DE AGUA

Se pueden realizar diversas afirmaciones acerca del agua y su relevancia en nuestras vidas, sus cualidades son muchas, sin embargo, la manipulación periódica de grandes cantidades de agua de diferentes composiciones presenta enormes problemas para las industrias que las utilizan en sus procesos (Madigan et al., 2003).

La mayoría de los problemas de manipulación de agua en los Yacimientos petrolíferos surge del hecho de que el agua es un solvente universal, ya tiene la capacidad de disolver prácticamente todas las sustancias inorgánicas y el crecimiento microbiológico se desarrolla con facilidad (Patton, 1986).

La naturaleza del microorganismo en particular y las características de su crecimiento y metabolismo determinan el carácter perjudicial o beneficioso de su influencia en determinado sistema o proceso industrial (Videla & Salvarezza, 1984). Los microorganismos son capaces de realizar sus procesos vitales de crecimiento, generación de energía y reproducción, independientemente de otras células (Madigan et al., 2003).

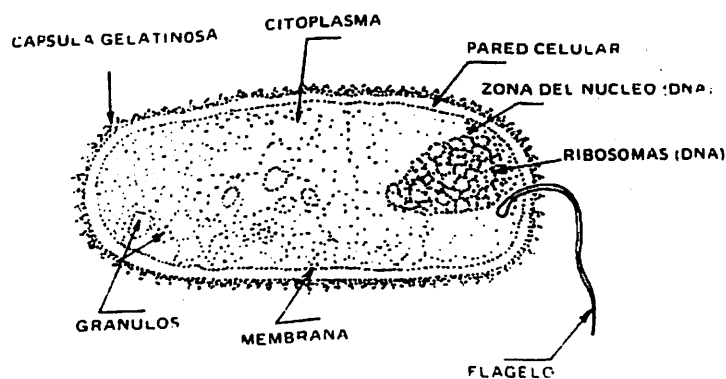
Es por lo antes mencionado que es de suma importancia conocer el comportamiento de los microorganismos en los diferentes ambientes y en particular en el agua ya que su presencia puede causar serios problemas en las diferentes industrias que hacen uso de este recurso para sus procesos. Tales microorganismos son simplemente otra fuente de taponamiento de sólidos o condiciones que terminan en corrosión (Patton, 1986).

#### 2.1.1 Clasificación de los microorganismos encontrados en los sistemas de distribución de aguas de los Yacimientos Petrolíferos.

##### a) Bacterias

La bacteria comprende la clase amplia de microorganismos de nuestro mayor interés para la manipulación del agua (Patton, 1986).

Las células bacterianas tienen una estructura pequeña, posee una pared celular que cumple la función de darle forma. Dentro de ella se encuentra una membrana fina semipermeable que rodea los contenidos de la célula bacteriana y controla selectivamente el paso de las sustancias entre la célula y su ambiente externo (Patton, 1986). La mayoría de las especies son especies bacterianas móviles, esto significa que las bacterias se propulsan por sí mismas a través del agua por medio de uno o más flagelos. Un diagrama generalizado de las bacterias se muestra en la figura 1 (Videla & Salvarezza, 1984).



Fuente: Videla & Salvarezza, 1984

**Figura 1:** Diagrama generalizado de una típica célula bacteriana.

Las bacterias pueden vivir en grupos o colonias unidas a superficies sólidas o suspendidas en agua, las que están adheridas a superficies sólidas son llamadas sésiles y las que están suspendidas en agua se las llama planctónicas. La mayoría de las bacterias son sésiles. Se ha publicado que, en un sistema típico de agua para uso industrial, hay de 1.000 a 10.000 veces más bacterias adheridas a superficies que libres en el agua. También se ha demostrado que durante el crecimiento de las bacterias sésiles se produce una sustancia viscosa, denominado exopolisacárido, también llamado glucocalix. Dentro de las capas del glucocalix, puede existir una comunidad entera de bacterias (Videla & Salvarezza, 1984).

Si la producción de los exopolisacáridos continúa, resulta en la formación de una biopelícula o biofilm que rodea y cubre la bacteria. Se estima que un biofilm puede contener entre 200-250 células y 1mm en grosor (Videla &

Salvarezza, 1984).

La generación del biofilm en una superficie metálica favorece los procesos de corrosión, mejor llamados biocorrosión debido a la participación de bacterias en el proceso. Dado que; al ser tan pequeñas pueden penetrar suturas presentes en las cañerías utilizadas en la actividad hidrocarburífera, muy fácilmente; las que son móviles pueden migrar hacia condiciones favorables o alejarse de las desfavorables, respecto de nutrientes o materiales tóxicos respectivamente; si bien los nutrientes orgánicos pueden hallarse en concentraciones muy bajas, las distintas superficies los adsorben creando áreas concentradas (Beech & Gaylarde, 1999).

#### *b) Eucariontes*

Este grupo de microorganismos incluye hongos, algas y protozoos.

##### Hongos

Son microorganismos multicelulares, no fotosintéticos y heterótrofos y unos pocos son parásitos o patógenos. Algunas especies ocasionan daños a las plantas y a los animales, mientras otras se utilizan en la industria para sintetizar productos químicos o elaborar alimentos (Patton, 1986).

Los hongos crecen en condiciones ambientales que no toleran las bacterias, principalmente poca humedad, y condiciones ácidas, el pH de 5,6 sería su pH óptimo (intervalo de 2 a 9); requieren menos nitrógeno que las bacterias para el crecimiento, en general la mitad, y casi siempre se encuentran en ambientes aerobios (Madigan et al., 2003).

Los hongos generalmente crecen mejor en sistemas aeróbicos y se cree que causan pocos problemas en la mayoría de los sistemas de inyección de agua (Madigan et al., 2003).

##### Algas

Se encuentran en muchos ambientes: aguas, suelos, rocas, hielo y árboles. Las algas son indeseables en los abastecimientos de agua para producción; algunas especies dan origen a problemas de olor y sabor del agua y todas

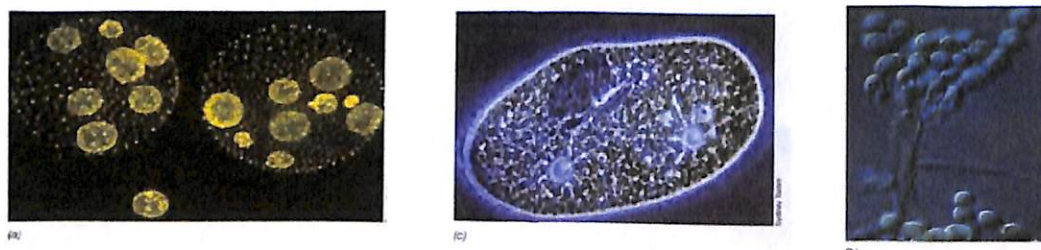
reducen la utilidad de los filtros. Así mismo reducen la calidad del agua cuando presentan crecimientos masivos (Videla & Salvarezza, 1984).

Para el crecimiento de las algas es necesario disponer de nutrientes, tales como nitrógeno y fósforo y trazas de cobre, hierro, molibdeno entre otros minerales. El control del crecimiento de las algas se logra mejor midiendo los nutrientes de las aguas (Madigan et al., 2003).

### Protozoos

Los protozoos son la más simple de forma de vida animal. Se los encuentra tanto en agua dulce como salada y necesitan oxígeno para vivir. En los sistemas de inyección de agua se los encuentra en tanques abiertos o en fosas. También se los encuentra en filtros cuando se airea el agua. Generalmente, el control de otras poblaciones macrobióticas es suficiente para controlar la población de protozoos (Madigan et al, 2003).

En la figura 2 se pueden observar diferentes tipos de microorganismos Eucarióticos.



Fuente: Registro fotográfico laboratorios MAG, 2016.

**Figura 2:** Micrografías Eucarióticas; a) Algas verde colonial Volvox; b) Hongos, estructura productora de esporas en un hongo filamentoso típico; c) Protozoos.

## 2.2. PROCESO DE BIOENSUCIAMIENTO

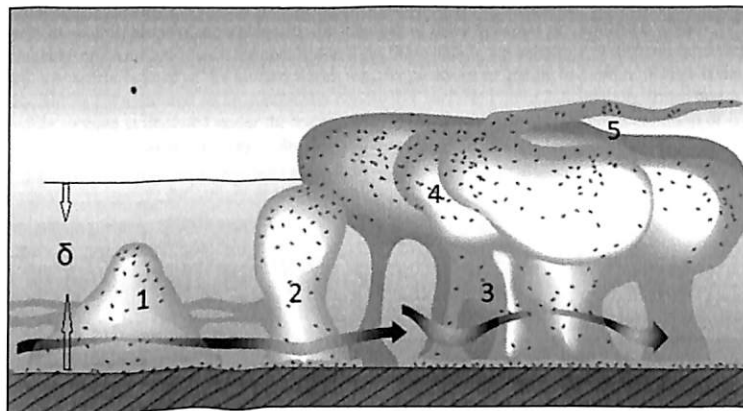
La adherencia bacteriana es un proceso en el cual las bacterias pueden fijarse tenazmente y a menudo con exquisita especificidad a diversas superficies mediante la formación de biopelículas (Costerton & Lashen, 1984).

La formación de las biopelículas conduce a la creación de hábitats especializados, los cuales se encuentran constituidos básicamente por agua, bacterias heterotróficas y aerobias y sustancias exopoliméricas secretadas por



las bacterias mismas. Todos estos constituyentes forman parte de una masa de fibras enmarañadas de polisacáridos que se extienden desde la superficie bacteriana y forma un compacto glucocalix (Costerton & Lashen, 1984).

Dicho mecanismo bacteriano es el denominado bioensuciamiento o biofouling (figura 3), el mismo es de carácter indeseable en todo el sistema industrial (Costerton & Lashen, 1984).



Fuente: Videla & Salvarezza, 1984

**Figura 3:** Etapas del proceso de bioensuciamiento.

Tal como se observa en la figura 3, el bioensuciamiento se inicia con el transporte de moléculas orgánicas y células microbianas las cuales se adhieren a la superficie sólida (ver etapa 1 en la figura 3). En esta primera etapa la adsorción de moléculas orgánicas acondiciona la superficie metálica facilitando la posterior adherencia de las células microbianas (Videla & Salvarezza, 1984).

Cuando las condiciones están dadas, especialmente bajas velocidades las bacterias platónicas aterrizan y se adhieren a la superficie, convirtiéndose en bacterias sésiles, de esta forma se inicia la formación de colonias (ver figura 4). Estos procesos ocurren dentro de la capa límite ( $\delta$ ) de flujo laminar (Videla & Salvarezza, 1984).

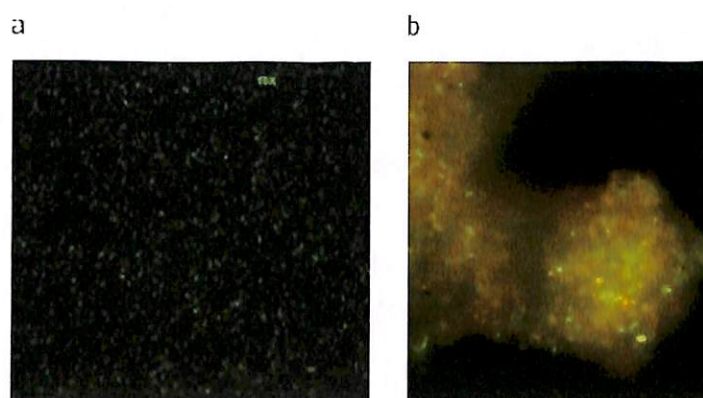
Las etapas 2 y 3 de la figura 3, se puede describir como es el proceso de crecimiento de la biopelícula. En el que el metabolismo de las células adheridas (etapa 2) produce y exuda un material polimérico, llamado exopolímero, a la vez que las células se reproducen generando un mayor

número de estas dentro de la película, también se incrementa el material orgánico y los metabolitos asociados a esas células. Obteniendo de este modo, una biopelícula mayor a la inicial, en la cual conviven más de un tipo de bacteria (etapa 3) (Videla & Salvarezza, 1984).

Cuando la acumulación de material debido a los procesos de transporte, adherencia y crecimiento supera la capa límite  $\delta$  (ver etapa 4 de la figura 3), comienza el proceso de desprendimiento de ciertas partes de esa biopelícula, debido al el efecto de corte de flujo líquido (ver etapa 5 de la figura 3) (Videla & Salvarezza, 1984).

Como resultado final de este proceso de bioensuciamiento que se inició con la primera adherencia de bacterias a una superficie, obtenemos una compleja colonia de bacterias en el lugar de la primera deposición, tal cual se puede observar en la figura 5 (Videla & Salvarezza, 1984).

En general las bacterias aeróbicas pueden convertirse en las primeras colonizadoras, sin embargo, en el fondo de las biopelículas las bacterias aeróbicas son usualmente reemplazadas por bacterias anaeróbicas porque el oxígeno se ha sido consumido (Videla & Salvarezza, 1984).



Fuente: Registro fotográfico laboratorios MAG, 2016.

**Figura 4:** a) Bacterias plantónicas que viajan en el sistema (aumento 10x); b) Bacterias sésiles adheridas a la superficie (aumento 10x).



Fuente: Registro fotográfico laboratorios MAG, 2016

**Figura 5:** Bioensuciamiento en cañerías de acero al carbono.

Los procesos de adherencia son el requisito previo necesario para las relaciones simbióticas entre micro y macroorganismos que se presentan en los procesos de bioensuciamiento. El estudio y comprensión de estos procesos ayudará a prevenir o reducir el bioensuciamiento de tuberías de intercambiadores de calor, evitar taponamiento de filtros y mal funcionamiento de manómetros, así como evitar pérdidas de energía derivadas de la disminución en la eficiencia. La presencia de este bioensuciamiento alberga el problema potencial de la corrosión microbiana (Videla & Salvarezza, 1984).

### **2.2.1. Corrosión microbiana**

La corrosión microbiana o biocorrosión está directamente vinculada con la electroquímica. En todos los casos se encuentra una zona anódica donde se produce un proceso de oxidación que conduce a la disolución del metal (corrosión), mientras transcurre simultáneamente la reducción de algún componente del medio a través de la correspondiente acción catódica. Los microorganismos participan de este proceso en forma activa sin modificar la naturaleza electroquímica del fenómeno (Videla & Salvarezza, 1984).

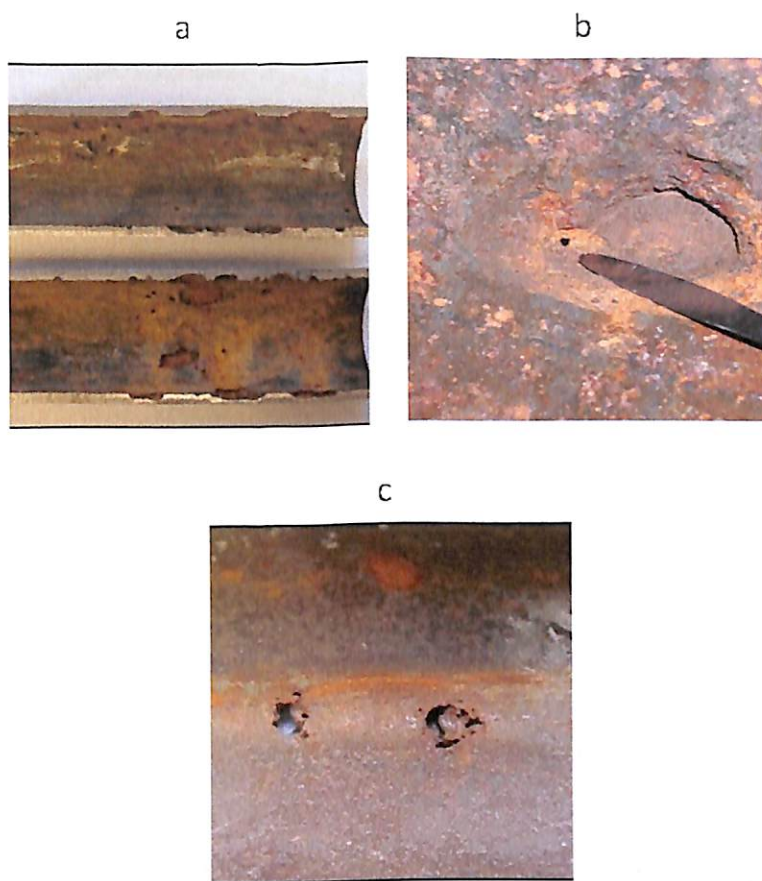
La colonización de los microorganismos en una superficie produce una compleja biomasa que contiene microorganismos, producto de la lisis celular y la corrosión. Los procesos de bioensuciamiento antes descritos y los de biocorrosión ocurren rápida y simultáneamente luego de exponer el metal al

medio ambiente (Videla & Salvarezza, 1984).

Los elementos a considerar en el estudio de los procesos de adherencia bacteriana son básicamente de naturaleza biológica e inorgánica. Los inorgánicos pueden separarse en dos fases, sólida y líquida. Los tres elementos, biota, metal y solución interactúan y el producto final es el fenómeno de bioensuciamiento y biocorrosión (Videla & Salvarezza, 1984).

Estos procesos dinámicos de formación y renovación de películas de bioensuciamiento (biofilm) afecta a numerosos sistemas acuáticos naturales, sistemas de distribución de agua y de tratamientos de efluentes, intercambiadores de calor, consumo de combustibles, y aún a la salud humana. En todos los casos, su presencia es perjudicial ya que impide la transferencia de calor a través de la interfase, aumenta la resistencia por fricción al flujo líquido e incrementa la velocidad de corrosión en la superficie, siendo la resultante la pérdida de energía en el sistema (Patton, 1986).

La biocorrosión de los metales en ambientes naturales será función de las características propias del metal y de factores ambientales como la temperatura, velocidad y composición química del agua presente en el ecosistema (ver figura 6). Las superficies metálicas son colonizadas en tan solo 4 horas en medios acuosos naturales por bacterias sésiles (Videla & Salvarezza, 1984).



Fuente: Registro fotográfico Champion Technologies, 2014.

**Figura 6:** Corrosión microbiológica. a) Área atacada cubierta por un revestimiento de producto corrosivo; b) El acero tiene una superficie moteada; c) Apariencia típica de picadura iniciada por bacterias.

### **2.3 BACTERIAS CAUSANTES DE PROBLEMAS EN LA INDUSTRIA PETROLERA**

Como ya se estableció con anterioridad, las bacterias pueden contribuir en muchos problemas de las industrias. La corrosión y el bioensuciamiento, son los más comunes y los que causan mayores inconvenientes en los Yacimientos petroleros (Williams & Cooper, 2014).

En una colonia o medio aislado, las bacterias segregan los subproductos de la asimilación de nutrientes, en el medio que las rodea (Patton, 1986). Así subproductos tales como el  $\text{CO}_2$ ,  $\text{SH}_2$ , ácidos orgánicos, alcoholes de cadena corta, Fe y sales alcalinas producen problemas de corrosión, bioensuciamiento y depósitos incrustantes (Patton, 1986).

Debido a esto, las bacterias pueden afectar los procesos en Yacimientos petroleros de varias maneras (Endean & Shelton, 1991):

1. Corrosión localizada por picaduras; debajo de la colonia bacteriana en crecimiento (bacterias asentadas), por transferencia y por difusión de los subproductos de asimilación a través de una matriz de glucocalix, que las protege del medio y sirve para adherir la colonia a las superficies metálicas, plásticas de incrustaciones, etc.
2. Producir enzimas que pueden incrementar la velocidad de corrosión participando directamente en los procesos de corrosión electroquímicos involucrados.
3. La presencia de Bacterias Sulfato Reductoras, en un sistema originalmente libre de  $\text{SH}_2$ , crea la posibilidad de corrosión por fisuramiento y ampollamiento.  
Si el sistema ya es agrio, es decir contiene  $\text{SH}_2$ , el adicional producido por las bacterias, puede tener o no un efecto aditivo. Sin embargo, si el sistema era originariamente dulce, es decir sin  $\text{SH}_2$ , la adición de  $\text{SH}_2$  al sistema por acción bacteriana, puede incrementar sustancialmente las velocidades de corrosión, que resulta en un ataque generalizado a través de todo el sistema.
4. En la corrosión ácida, se produce  $\text{SFe}$  insoluble, que es un excelente material de taponante por su naturaleza coloidal, además de las interferencias que provoca en los sistemas de tratamiento de aguas y de petróleo en los tanques lavadores y electrostáticos (interfases agua / petróleo).
5. Producir ácidos orgánicos que inician o aceleran la corrosión sobre la superficie del metal debajo de las colonias.
6. Oxidar el hierro disuelto en agua, causando que éste precipite y se deposite (llamados tubérculos) acelerando la corrosión a través de la formación de una concentración de células.
7. Las bacterias pueden provocar una combinación de estos procedimientos.

Las Bacterias Sulfato Reductoras, causan los problemas más serios en los

sistemas de inyección de recuperación secundaria que cualquier otra bacteria (ver figura 7). Reducen los sulfatos a sulfuros produciendo ácido sulfhídrico ( $\text{SH}_2$ ) altamente corrosivo, que provoca sobre los aceros y otras aleaciones de alta resistencia fallas por fisuras y fallas por fisura bajo tensión, aún con concentraciones de 0,1 ppm en agua y presiones parciales de 0,001 atm de ácido sulfhídrico ( $\text{SH}_2$ ) (Endean & Shelton, 1991).

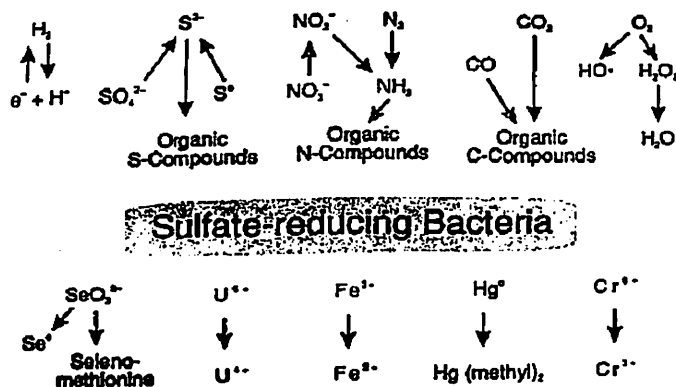


Fuente: Registro fotográfico laboratorio MAG, 2016

**Figura 7:** Sistema de agua con altos recuentos de BSR y elevados tenores de ácido sulfhídrico ( $\text{SH}_2$ )

### 2.3.1. Bacterias Sulfato Reductoras (BRS)

Si bien por varios años se creyó que existían sólo un pequeño grupo de Bacterias Sulfato Reductoras y que éstas crecían a expensas de lactato y piruvato, hoy se sabe que tienen capacidad para usar casi cien compuestos como aceptores de electrones. En ausencia de sulfatos, ciertas cepas de Bacterias Sulfato Reductoras pueden usar compuestos simples de carbono como dadores y aceptores de carbono mediante un proceso llamado dismutación (ver figura 8) (Patton, 1986).



Fuente: Madigan et al., 2003

**Figura 8:** Transformaciones químicas atribuidas a las bacterias reductoras de sulfato.

Las Bacterias Sulfato Reductoras son anaerobias estrictas y para cultivarlas se tienen que emplear técnicas estrictamente anóxicas. Se encuentran ampliamente distribuidas en ambientes acuáticos y terrestres que se vuelven anóxicos debido a procesos microbianos de descomposición. Requieren una fuente orgánica de carbono (heterótrofos), y algunos pueden efectuar la reducción de sulfato a sulfuro por la capacidad de oxidar directamente al hidrógeno mediante enzimas denominadas Hidrogenasas (Videla & Salvarezza, 1984).

Las Bacterias Sulfato Reductoras probablemente causan problemas más serios en los sistemas de inyección de los Yacimientos petrolíferos que cualquier otra bacteria ya que reducen los iones de sulfato o sulfito en el agua a iones de sulfuros, lo que resulta en ácido sulfhídrico ( $\text{SH}_2$ ) como un derivado (Endean & Shelton, 1991).

Cuatro tipos de problemas pueden aparecer en los sistemas de inyección como consecuencia de la presencia de este tipo de bacterias (Patton, 1986):

- 1- Pueden participar directamente en la reacción de corrosión y causar picado directamente bajo colonia bacteriana
- 2- La generación de ácido sulfhídrico ( $\text{SH}_2$ ) por las bacterias puede aumentar la corrosividad del agua. Si el sistema ya es ácido, el ácido sulfhídrico ( $\text{SH}_2$ ) generado por los microorganismos puede tener pequeño o ningún efecto. Sin embargo, si el sistema fue originalmente



dulce, adición de ácido sulfhídrico (SH<sub>2</sub>) al sistema como consecuencia de la actividad bacteriana puede aumentar sustancialmente el nivel de corrosión.

- 3- La presencia de Bacterias Sulfato Reductoras en un sistema originalmente libre de ácido sulfhídrico (SH<sub>2</sub>) crea la posibilidad de agrietamiento y ampollamiento del metal.
- 4- La corrosión ácida resulta en la formación de sulfuro de hierro insoluble el cual es un excelente material de taponamiento.

Las Bacterias Sulfato Reductoras son encontradas principalmente en áreas de baja velocidad o de estancamientos de líquidos y debajo de escamas o lodos. Los lugares comunes para la actividad bacteriana en sistemas de inyección son los tanques, filtros y pozos de inyección y pozos de captación de agua (Endean & Shelton, 1991).

#### 2.3.1.1 Tipos de Bacterias Sulfato Reductoras

Son conocidas cerca de nueve familias de Bacterias Sulfato Reductoras. Sin embargo, la mayoría de los problemas de corrosión debido a Bacterias Sulfato Reductoras se les atribuyen a los miembros de dos familias; *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum*. Algunas de las especies de cada familia que se sabe que contribuyen a la corrosión aparecen en la lista de la tabla I (Videla & Salvarezza, 1984).

**Tabla I:** Familias de Bacterias Sulfato Reductoras.

Genero	Especies	Forma
<i>Desulfovibrio</i>	<i>africanus</i>	Baston Sigmoidea
	<i>desulfuricans</i>	Vibrio
	<i>salexigens</i>	Vibrio
	<i>vulgaris</i>	Vibrio
<i>Desulfotomaculum</i>	<i>nigrificans</i>	Baston
	<i>orientis</i>	Espirales

Fuente: Elaboración propia, 2016

Las Bacterias Sulfato Reductoras en su mayoría detectadas en los Yacimientos petrolíferos pertenecen al género *Desulfovibrio* (ver figura 9). Este género utiliza lactato, piruvato, etanol o ciertos ácidos grasos como donadores de electrones, reduciendo así el sulfato hasta sulfuro. Otros géneros que no han sido nombrados aquí, se han especializado en la oxidación de ácidos orgánicos, particularmente el acetato, reduciendo sulfato a sulfuro (Madigan et al, 2003).

Las bacterias del género *Desulfovibrio* presentan flagelos polares, no esporulan y son Gram negativa, son anaerobias obligados, incapaces de crecer en presencia de trazas de oxígeno. Se caracteriza por participar en la reducción de sulfatos desasimilatoria, donde el sulfato es el aceptor final de electrones. Tanto el sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) como el azufre ( $\text{S}^0$ ) funcionan como aceptores de electrones bajo condiciones anóxicas; el ácido sulfhídrico ( $\text{SH}_2$ ) es el producto final de la reducción del  $\text{SO}_4^{2-}$  y  $\text{S}^0$ . Son heterótrofos y algunos pueden efectuar la reducción de sulfato a sulfuro por la capacidad de oxidar al hidrógeno mediante las hidrogenasas (Videla & Salvarezza, 1984).



a



b

Fuente: Registro fotográfico laboratorios MAG, 2016.

**Figura 9:** a) Bacterias Sulfato Reductoras con su típica forma de coma o vírgula (SEM) 10000X. b) Bacteria Sulfato Reductoras (SEM) 15000X.

### 2.3.1.2. Factores ambientales

Las Bacterias Sulfato Reductoras crecen en un ambiente específico para ellas. Si alguno de los factores que conforman este ambiente se viera afectado, perjudicaría desarrollo de las mismas. A continuación, se describen los factores importantes a considerar (Patton, 1986):

#### a.- Presencia de agua

Todos los seres vivos necesitan agua, ya que su composición química es mayoritariamente agua, por ello es que las bacterias, requieren un medio acuoso y estas no pueden reproducirse sin al menos tener una película fina de agua que rodee sus cuerpos (Patton, 1986).

El agua es necesaria para el transporte de gases, iones y materiales nutrientes (proteínas, hidratos de carbono y ácidos grasos) dentro del organismo, para su alimento y reproducción (Patton, 1986).

#### b.- Efecto de la salinidad

Las Bacterias Sulfato Reductoras se encuentran en aguas naturales que abarcan todo el espectro de salinidad de casi cero hasta saturación. Muchas bacterias del género *Desulfovibrio* son halotolerantes y pueden crecer en concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) tan altas como 100g/L. concentraciones más elevadas pueden limitar el crecimiento (Patton, 1986).

### c.- Temperatura, presión y pH

Las Bacterias *Desulfovibrio* poseen un rango de temperatura óptimo para el crecimiento de aproximadamente entre 25°C y 43°C con temperatura límite máxima de 49°C, rango de pH de 5 y 9, y presiones de al menos 14500 psi (100000 kPa) (Videla & Salvarezza, 1984). Sin embargo, valores absolutos de estos parámetros son difíciles de establecer con certeza en ambientes naturales. Hay Bacterias Sulfato Reductoras aisladas de fondo de pozo con temperaturas de 120°C, que han sido cultivados en laboratorios a temperaturas menores, pero no crecen por encima de los 88°C a presión atmosférica. Aparentemente la temperatura máxima a la cual desarrollan estas bacterias se incrementa con la presión. En particular las bacterias del género *Desulfovibrio* presentan un rango de temperatura óptimo para el crecimiento 25 y 43°C como ya se mencionó anteriormente (Patton, 1986).

### d.- Nutrición

Las Bacterias Sulfato Reductoras absorben sus nutrientes directamente del medio que los rodea. Cada célula contiene enzimas que ayudan a descomponer los nutrientes de las moléculas y permite que las bacterias extraigan energía de ellas.

Las Bacterias Sulfato Reductoras requieren ciertos nutrientes para sustentar su crecimiento. Algunos de los principales son:

- Carbono. Las Bacterias Sulfato Reductoras son heterotrófica, significa que la mayor parte de carbono de las células deriva de sustancias orgánicas y que pueden generar dióxido de carbono cuando las mismas crecen. Utilizan como fuente de carbono materia orgánica disuelta en el agua, como ácidos orgánicos provenientes de la oxidación de alcoholes.
- Nitrógeno y Fósforo.
- Hierro disuelto. Las Bacterias Sulfato Reductoras tienen un requerimiento absoluto relativamente alto de concentraciones de hierro disuelto.

- Sulfato, sulfito, bisulfito ó iones tiosulfito. Las Bacterias Sulfato Reductoras crecen principalmente en presencia de sulfatos, reduciéndolo a sulfuro, también pueden hacerlo con sulfito y otros componentes de azufre reducidos.

La ausencia de cualquiera de estos materiales puede limitar su crecimiento. La adición de secuestrantes de oxígeno o componentes con contenidos de fósforo como los inhibidores pueden mejorar el crecimiento, en caso que las concentraciones de fósforo o sulfato en el sistema sean bajas limitarán el crecimiento. Sin embargo, esto es poco probable, ya que la mayoría de aguas de inyección contienen suficientes nutrientes para un abundante crecimiento de bacterias (Endean & Shelton, 1991).

Las Bacteria Sulfato Reductoras son las responsables de la coloración negra de las aguas. Puesto que este color se debe a la acumulación de Sulfuros de Hierro (SFe) precipitado, propio de la reacción del ácido sulfhídrico con el hierro disuelto (Patton, 1986).

#### e.- Efecto de Oxígeno disuelto y ácido sulfhídrico

Las Bacterias Sulfato Reductoras se encuentran en aguas de superficies oxigenadas como océanos. Se presentan en números muy pequeños y no se multiplican muy rápidamente o de manera apreciable. Sin embargo, si el agua está previamente desaireada para inyección, entonces tienen un ambiente libre de oxígeno, el cual es ideal para su crecimiento. La actividad de las Bacterias Sulfato Reductoras es común en sistemas de inyección con agua de mar (Patton, 1986).

Es también probable que crezcan en sistemas aireados con la asistencia de bacterias aeróbicas. Los aerobios se establecen en las paredes de los sistemas y consumen oxígeno para su crecimiento. Un ambiente anaeróbico es creado debajo de las bacterias aeróbicas proveyendo, por lo tanto, un terreno propicio para la reproducción de las Bacterias Sulfato Reductoras (Patton, 1986).

En cuanto al ácido sulfhídrico, se ha observado que el mismo disminuye la tasa de crecimiento en altas concentraciones, disminuyendo la velocidad de

crecimiento a cero. Se cree que la disminución de la velocidad de crecimiento está causada por la reducción de la concentración de hierro disuelto por reaccionar con el ácido sulfhídrico y subsecuentemente su precipitación como sulfuro de hierro. El ácido sulfhídrico puede ser detectado fácilmente en el sitio, puesto que genera un característico olor a huevo podrido (Endean & Shelton, 1991).

### **2.3.2. Bacterias que oxidan y precipitan el hierro (BPOM)**

Otros microorganismos relacionados con los procesos de corrosión, son las bacterias oxidantes del hierro (Ferrobacterias), que transforman  $Fe^{2+}$  en  $Fe^{3+}$ , que se deposita como hidróxido férrico hidratado (Patton, 1986).

Desde el punto de vista de la corrosión interesa fundamentalmente la familia *Caulobacteriaceae* y dentro de ella los géneros *Gallionella* y *Siderophacus*, pudiéndose tomar a *Gallionella ferruginea* como bacteria tipo (Videla & Salvarezza, 1984).

Permanece sujeta al material por un pedúnculo compuesto de hidróxido férrico. Es autótrofa. Cuando se desprenden de las tuberías dan origen a un flóculo en suspensión. Desarrollan mal en medios de cultivo de laboratorio y en la recuperación secundaria de petróleo son importantes porque disminuyen la permeabilidad de las rocas, debiéndose eliminar de las aguas de inyección (Patton, 1986).

Otro tipo de bacteria oxidante de hierro, importante en procesos de corrosión, es *Thiobacillus ferroxidans*, frecuente en las aguas de drenaje ácido en las minas. Es altamente aeróbico, autótrofo, crece a pH ácido y oxida el sulfato ferroso a férrico (Patton, 1986).

Por otro lado, dentro del orden de las *Clamidobacteriaceae*, se encuentran dos géneros que intervienen en los procesos de corrosión: *Sphaerotilus* y *Leptothrix*. Son incoloras y poseen vainas compuestas por una matriz orgánica impregnada con óxido de hierro y manganeso. Se cultivan bien en medios artificiales. Crecen en agua dulce y poseen esporas móviles. Las bacterias del género *Leptothrix* crecen mejor en aguas dulces ricas en hierro

preferentemente conteniendo CO<sub>2</sub>. Las vainas de las bacterias tienen hidróxido férrico y son de color marrón amarillento, éstos microorganismos aerobios crecen mejor a pH 8 (Videla & Salvarezza, 1984).

Por último, las bacterias de la familia *Crenothriaceae* se caracterizan por presentar vainas no incrustadas, salvo en su base. Dos géneros muy importantes son: *Crenothrix* y *Clonothrix*. Crecen en aguas estancadas o de río con materia orgánica. No se pueden cultivar en medios artificiales (Videla & Salvarezza, 1984).

La importancia de las Ferrobacterias en los procesos corrosivos está ligada a la corrosión de tuberías de hierro en medios aeróbicos, donde su acción puede hallarse asociada a Bacterias Sulfato Reductoras presentes en zonas anaeróbicas de formaciones denominadas tubérculos (Videla & Salvarezza, 1984).

### **2.3.3. Bacterias Formadoras de Limo**

Las bacterias formadoras de limo son una clase general de bacterias capaces de producir masas densas de limo en superficies sólidas. Ejemplos de estas bacterias son las pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Enterobacter* y *Escherichia*. Las cuales pueden causar taponamiento y pueden contribuir a la corrosión de la misma manera que las bacterias de Hierro debido a la formación de extensas cantidades de polisacáridos extracelulares (mucílagos) (Videla & Salvarezza, 1984).

Estas biopelículas pueden hallarse en sistemas de aguas dulces o salinas, en ambientes aeróbicos o anaeróbicos pero son más frecuentes en los de baja salinidad y aeróbicos (Patton, 1986).

### **2.3.4. Bacterias que reducen metales (aerobias) MRB**

Estos microorganismos son conocidos por promover la corrosión del hierro y sus aleaciones con reacciones que conducen o llevan a la disolución del film de óxido protector que resiste al fenómeno de la corrosión y que se forma sobre la superficie del metal. Esto hace que las capas pasivas protectoras, por ejemplo,

en los aceros inoxidable, se pierda o sea reemplazada por un film de metal reducido estable y que permita en el futuro que la corrosión ocurra. Dentro de este grupo de bacterias podemos mencionar bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Shewanella* (Patton, 1986).

## **2.4. PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIANA**

Las industrias buscan permanentemente la manera más conveniente para mantener sus sistemas productivos libre de los efectos nocivos de la contaminación microbiológica. Aunque esta es una tarea muy difícil, se pueden utilizar varios métodos generales, físicos o químicos (Videla & Herrera, 2005).

Desde el punto de vista microbiológico se puede atacar el problema en dos aspectos fundamentales (Patton, 1986):

- a) Destruyendo o inhibiendo el crecimiento o la actividad metabólica de los microorganismos mediante el añadido de sustancias bactericidas o bacteriostáticas al medio.
- b) Modificando las características del medio donde se desarrolla el proceso de corrosión para hacerlo inadecuado al desarrollo de los microorganismos perjudiciales (aireación en el caso de las bacterias anaerobias, pH alejado del óptimo para el desarrollo, etc.)

### **2.4.1. Control Químico de microorganismos**

Existen muchos métodos químicos por los cuales se puede atacar el problema de microorganismos, que pueden diferenciarse de acuerdo a su función o de acuerdo a su composición (Endean, 1989).

El uso de biocidas para eliminar y/o controlar microorganismos ha cobrado importancia en el control microbiano en sistemas donde hay transportes de fluidos (Endean, 1989).

Los biocidas son a menudo parte de una gran estrategia en el control químico que incluye inhibidores de corrosión, secuestrantes de oxígeno, dispersantes, quelatos y acondicionadores de superficie. Estas varían de acuerdo a la naturaleza de los ingredientes activos y los requerimientos de la aplicación



solicitada (Patton, 1986).

El ingrediente activo es un químico el cual tiene un efecto biocida general sobre un amplio rango de microorganismos (Patton, 1986).

#### **2.4.2. Clasificación y mecanismos de acción de biocidas**

Los biocidas pueden ser clasificados en oxidantes y no oxidantes, según se puede observar en la tabla II (Patton, 1986).

Los biocidas oxidantes matan organismos por oxidación química agresiva, oxidan irreversiblemente los grupos protéicos, determinando la pérdida de la actividad enzimática normal y, finalmente, provocando la muerte de la célula (Videla & Salvarezza, 1984).

Los biocidas no oxidantes alteran la permeabilidad de la pared celular interfiriendo en procesos vitales de los microorganismos; los hay del tipo que atraviesan la pared celular penetrando al citoplasma y destruyendo grupos protéicos esenciales para la vida (metales pesados); otros modifican la permeabilidad de la pared celular reduciéndola y perturbando el flujo normal de nutrientes y desechos (tensioactivos aniónicos y catiónicos), determinados compuestos pasan la pared celular y forman una suspensión coloidal con el citoplasma precipitando proteínas (compuestos fenólicos clorados), finalmente otros grupos de compuestos compiten con enzimas o las bloquean impidiendo la reacción enzimática normal necesaria para la vida (compuestos organosulfurosos) (Videla & Salvarezza, 1984).

Algunos ingredientes activos, cloro o la acroleína, por ejemplo, pueden ser aplicados directamente como compuesto puro. En otros casos, el ingrediente activo es disuelto en solución como parte de una formulación, siendo el agua el solvente más utilizado. Sin embargo, la mayoría de los biocidas son aplicados como compuesto puro para el control en los problemas de corrosión en las aguas de superficie (Videla & Salvarezza, 1984).

Entre los dos tipos de biocidas (Oxidantes y No Oxidantes) existen diferencias de costo, toxicidad, capacidad de formación de espuma, velocidad de reacción, selectividad y capacidad de mantener la efectividad al pH y temperatura del

sistema. Deben considerarse también los requerimientos en cuanto a contaminación del medio ambiente. Un programa alternado de biocidas es aconsejable para lograr un adecuado control de todas las especies microbianas (Videla & Salvarezza, 1984).

**Tabla II:** Clasificación de biocidas.

<b>Biocidas</b>		
<b>Tipos</b>	<b>Mecanismo de acción</b>	<b>Compuesto químico</b>
<b>Oxidantes</b>	Oxida sitios activos de ciertos grupos SH de algunas coenzimas en etapas intermedias de la producción de ATP.	Halógenos (Cloro, Bromo y derivados)
	Su dosis depende de la demanda del oxidante.	
	Se degradan rápidamente.	
	Suelen ser extremadamente Corrosivos	
<b>No Oxidantes</b>	Bloquean la acción de las enzimas respiratorias, citocromos, inactivando la transferencia de electrones necesaria para la respiración celular.	Sales de metales pesados. Compuestos Organosulfurosos
	Actúan en la membrana celular. Desnaturalizan proteínas de las membranas y citoplasma celular alterando el ingreso y egreso de sustancias a la célula.	Clorofenoles; Sales de amonio cuaternario.

Fuente: Elaboración propia, 2016.

Requisitos legales para la protección del medio ambiente y la necesidad de una mayor aceptabilidad ambiental han contribuido a restringir el uso de algunos biocidas (Videla & Herrera, 2009).

La ley provincial 899/08 (Modificada por la Ley 2.613/08) "Código de aguas de la Provincia de Neuquén" prohíbe la descarga de biocidas en los cursos de agua abiertos.

## 3. METODOLOGÍA

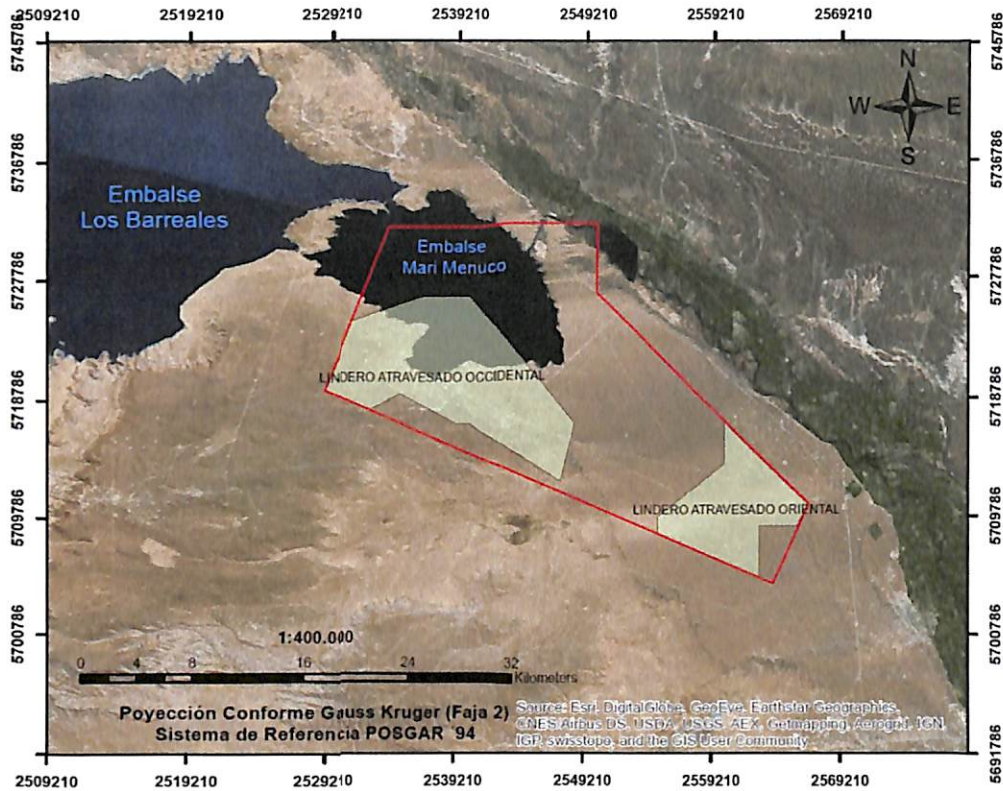
---

### 3.1. DESCRIPCIÓN DEL LUGAR

El área de estudio seleccionada es el Yacimiento Lindero Atravesado, actualmente explotado por la empresa petrolera Pan American Energy, la cual explota el territorio con fines de extracción de petróleo y gas.

Su ubicación geográfica es en proximidades a la localidad de Vista Alegre, Neuquén, a 38° 45' de latitud Sur y 68° 19' de longitud Oeste, sobre la Ruta Provincial N°51, a la altura del km 26. Situada dentro de la Región natural Extraandina; Subregión Árida Mesetiforme en el departamento Confluencia (Ferrer et al., 2006).

El Yacimiento cuenta con una superficie total de 509 Km<sup>2</sup>, la cual se divide en dos zonas geográficas: Lindero atravesado Occidental y Lindero atravesado Oriental. Lindero Atravesado Occidental, posee 51 pozos productores de hidrocarburos, tres plantas compresoras y una planta de tratamiento de gas. Lindero atravesado Oriental, posee 46 pozos, una planta de tratamiento de crudo y una planta compresora de gas (ver figura 10) (Ferrer et al., 2006).



Fuente: Elaboración propia, 2016.

**Figura 10:** Área de estudio seleccionado delimitada en color rojo.

El rasgo más conspicuo del relieve, es la presencia de amplias mesetas discontinuas, cuyas superficies cuspidales son marcadamente planas. El sustrato rocoso consolidado está conformado por rocas sedimentarias clásticas y químicas. Los fuertes vientos que caracterizan la zona suelen alcanzar entre 20 y 120 km/h en dirección Oeste-Sudeste, provocando fenómenos asociados a la actividad eólica, denominados montones de arena o dunas enanas,

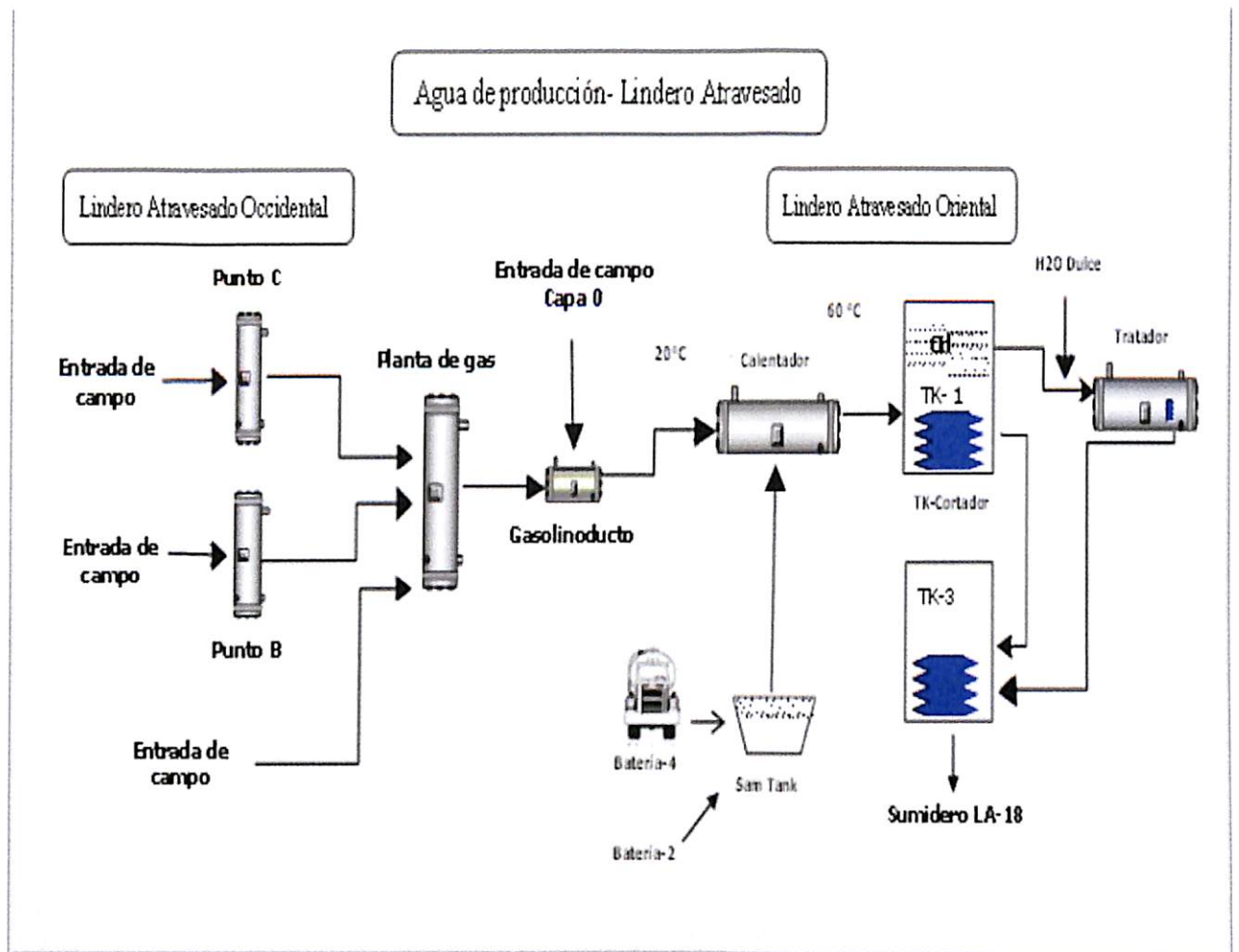
aunque en varios sectores alcanzan las dimensiones de los médanos (Ferrer et al., 2006).

La altitud media del área es de unos 250 msnm, en lo que respecta al clima esta subregión es la más árida, ya que las precipitaciones anuales son inferiores a 130 mm, siendo a su vez la más cálida. Está caracterizada por una vegetación de estepa arbustiva baja y rala, condiciones responsables del escaso contenido de materia orgánica (del 1%) con un neto predominio de elementos florísticos de la Provincia del Monte. Encontramos suelos dominantes como Aridisoles, principalmente Haplocalcides, Petrocalcides y Haplogipsides típicos, y varios subgrupos de Entisoles, así como su fase somera (Ferrer et al., 2006).

El balance hídrico negativo impide la lixiviación de los constituyentes solubles, generando horizontes cálcicos y petrocalcicos, gypsicos, petrogypsicos y sálicos, o bien acumulaciones de sales solubles sin constituir horizontes diagnóstico (Ferrer et al., 2006).

En la actividad hidrocarburífera, durante el traslado de fluidos, los mismos sufren cambios: diferencias de velocidades; diferencias de presiones; diferencias de temperatura; estanqueidad. Provocando un ambiente favorable al desarrollo de diferentes microorganismos en el circuito de producción (Patton, 1986).

Los fluidos de producción (gas, agua y petróleo), son transportados a través de cañerías de conducción de acero al carbono a puntos estratégicos (baterías), de allí son separados de acuerdo a las especificaciones de cada fluido y el agua de producción es transportada nuevamente hacia la planta de tratamiento principal que se encuentra en el sector Oriental, donde son tratados (ver Figura 11).



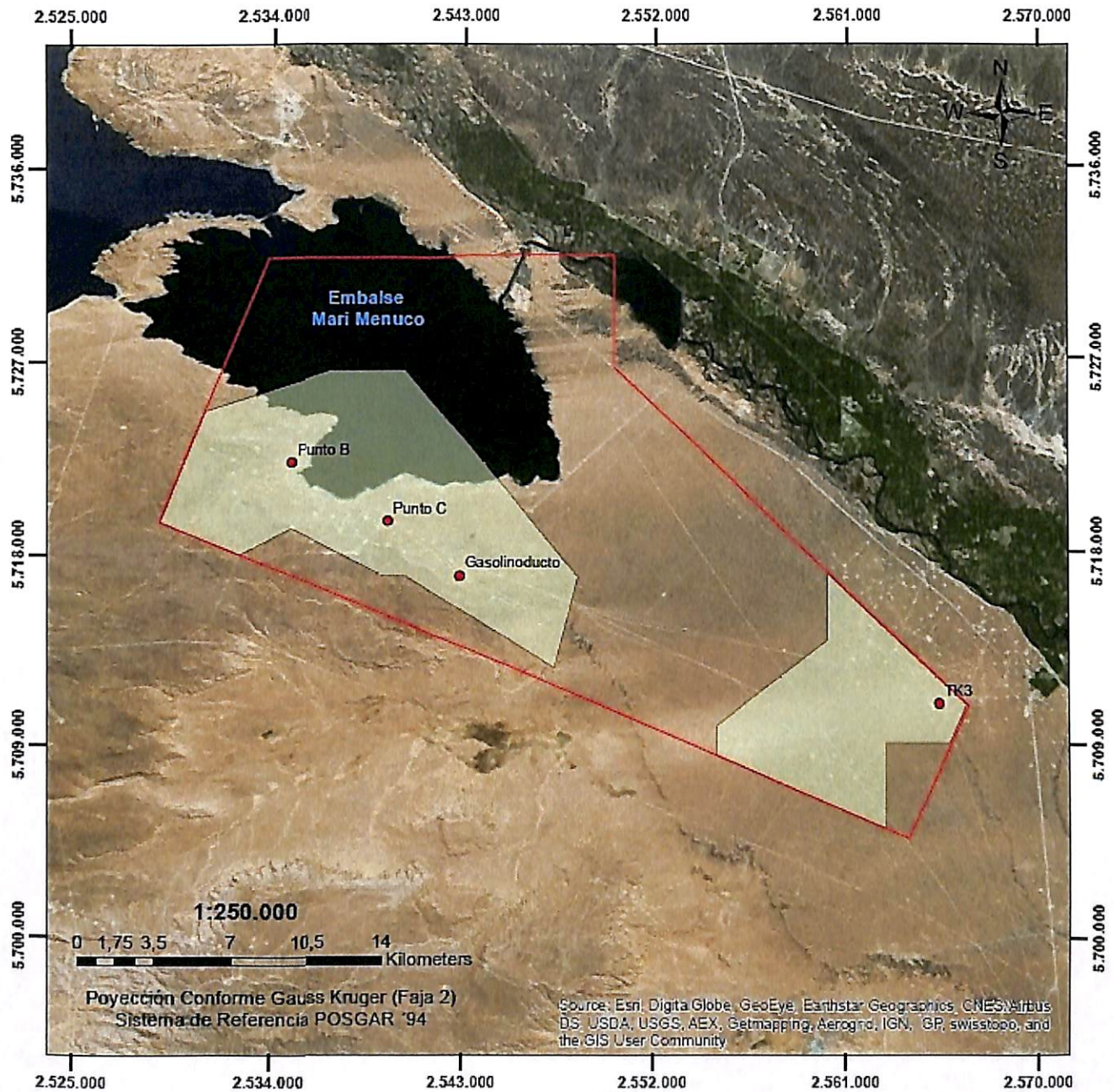
Fuente: Elaboración propia, 2016.

**Figura 11:** Diagrama de flujo del agua de producción de Lindero Atravesado.

### 3.2. SELECCIÓN DE PUNTOS DE MUESTREO

Para llevar a cabo los ensayos se seleccionaron 4 puntos de muestreo. Para ello se tuvo en cuenta los antecedentes del lugar los cuales referenciaban problemas asociados a contaminación microbiana. Además, se valoró aquellos sitios en los cuales el agua de producción cubría variaciones ya sean de: tiempo de residencia, saltos de presión, cambios de dirección y puntos muertos. En la figura 12 se pueden observar los 4 puntos de muestreo, los cuales se denominaron: Punto Compresor B; Punto Compresor C; Gasolinoducto y Tanque 3.

## Puntos de Muestreo

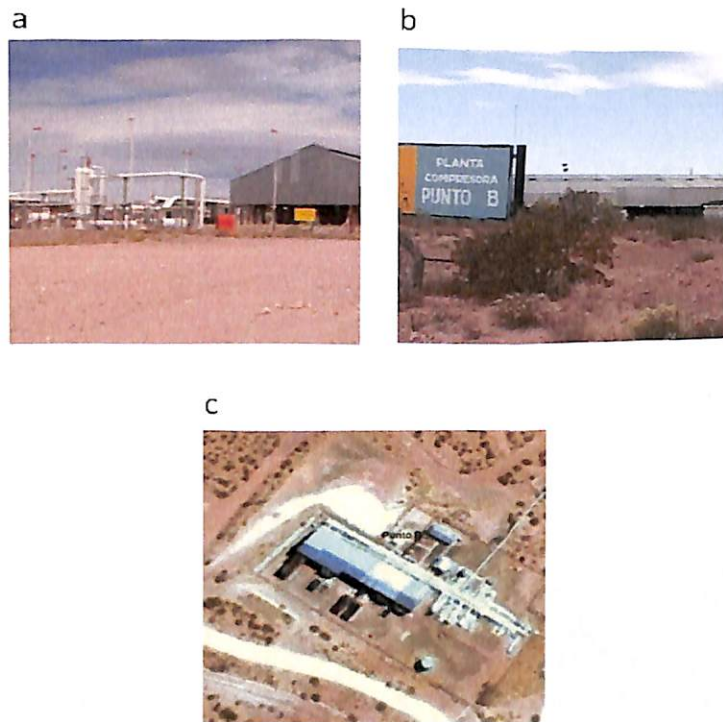


Fuente: Elaboración propia, 2016.

**Figura 12:** Puntos rojos observados en el mapa, indican los puntos de muestreo seleccionados.

- Punto Compresor B

Se encuentra en las coordenadas  $38^{\circ} 39'1,71''S$  y  $68^{\circ}35'58,51''O$ . Aquí confluye la producción de un determinado sector del campo los cuales son productores de gasolina, por lo que el agua proveniente de este punto es agua de condensado. Este punto se encuentra muy cercano al Embalse Mari Menuco. En la figura 13 se puede observar el sitio de muestreo.



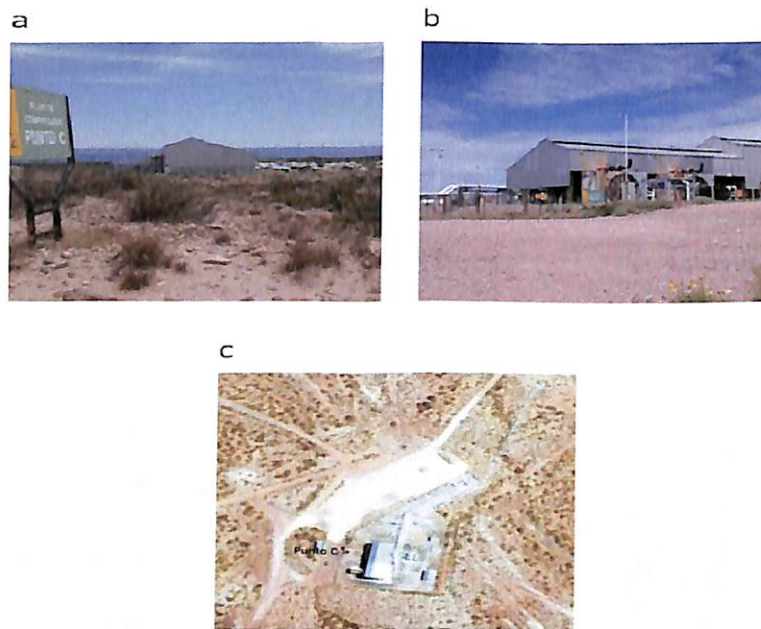
Fuente: Elaboración propia, 2015.

**Figura 13:** a) Vista frontal del sitio de muestreo; b) Vista lateral del sitio de muestreo; c) Imagen aérea del sitio de muestreo.



- Punto Compresor C

Se encuentra en las coordenadas  $38^{\circ} 40'28,88''S$  y  $68^{\circ}32'48,99''O$ . Aquí confluyen la producción de otra zona del campo, los pozos que aportan a este punto son productores de gasolina, por lo que el agua proveniente de este punto es agua de condensado. Dicho punto se encuentra cercano a las aguas del Embalse Mari Menuco. En la figura 14 se puede observar el sitio de muestreo.

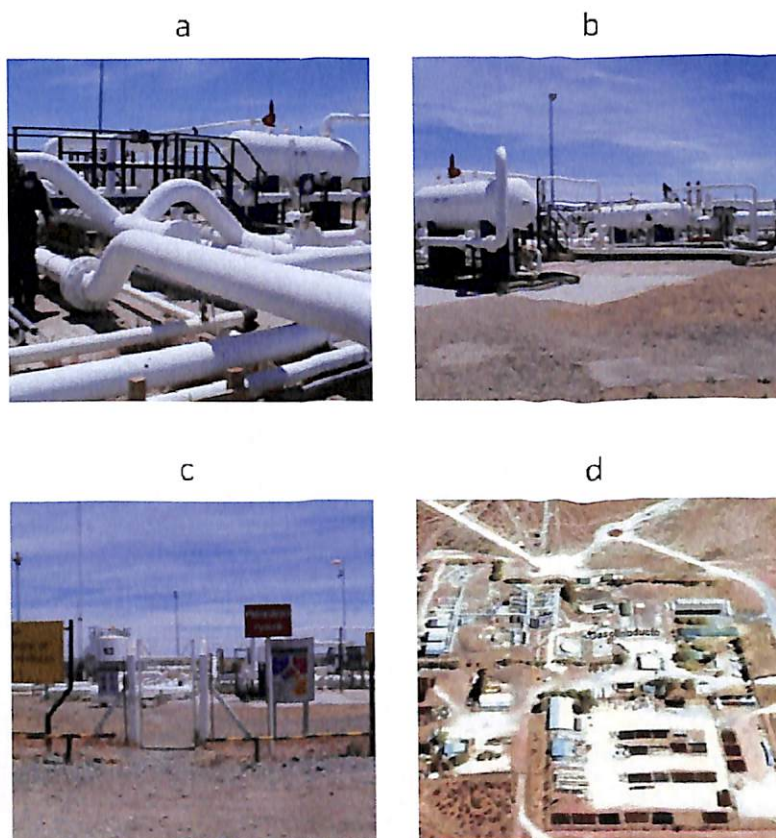


Fuente: Elaboración propia, 2015

**Figura 14:** a) Vista frontal del sitio de muestreo; b) Vista lateral del sitio de muestreo; c) Imagen aérea del sitio de muestreo.

- Gasolinoducto

Se encuentra en las coordenadas  $38^{\circ}41'51,75''S$  y  $68^{\circ}30'27,84''O$ . Aquí se junta el agua de producción de los dos puntos anteriores más agua proveniente de la capa 0, los pozos productores que extraen de esta capa son pozos que extraen petróleo. Con lo cual las condiciones físico- químicas se modifican. En la figura 15 se puede observar el sitio de muestreo.

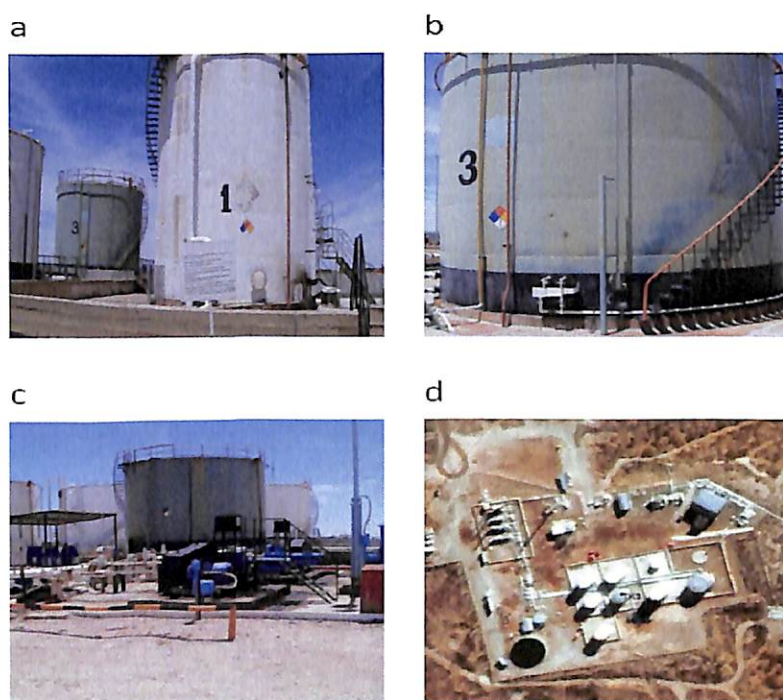


Fuente: Elaboración propia, 2015.

**Figura 15:** Las diferentes imágenes muestran el sitio de muestreo desde diferentes ángulos.

- Tanque 3- Planta Tratamiento Oriental

Se encuentra en las coordenadas  $38^{\circ} 45'02,94''\text{S}$  y  $68^{\circ}14'52,63''\text{O}$ . Aquí se recibe toda el agua del yacimiento para su tratamiento previo a su eliminación en pozo sumidero. En la figura 16 se puede observar el sitio de muestreo.



Fuente: Elaboración propia, 2015.

**Figura 16:** En las diferentes imágenes se puede observar el punto de muestreo y su ubicación en el sitio.

### 3.3. TOMA DE MUESTRA

Los muestreos fueron realizados en dos etapas. En la primera etapa de muestreo se pretendió realizar un sondeo inicial de cada punto de muestreo, a fin de determinar la viabilidad del punto para realizar los ensayos de Time kill test, junto con un análisis físico-químico del lugar; en la segunda etapa de muestreo fue utilizada para llevar a cabo los ensayos del Time kill test. Con el fin de seleccionar el biocida/dosis adecuado para mitigar los problemas de Bacterias Sulfato Reductoras del lugar.

### 3.3.1. Primer etapa

Se realizó un sondeo inicial con la finalidad de evaluar la presencia de Bacterias Sulfato Reductoras, conjuntamente se determinaron los parámetros físicos- químicos.

#### 3.3.1.1. Recuento de Bacterias Sulfato Reductoras

Se realizó la Técnica de Extensión- Dilución para enumerar Bacterias Sulfato Reductoras en Agua de campo (NACE, 1994). Dicha técnica determina la población de Bacterias Sulfato Reductoras (BRS) planctónicas, en muestras de agua de campo. El método se basa en el hecho de que Bacterias Sulfato Reductoras producen sulfuro, que reacciona con el hierro presente en el medio de cultivo para producir sulfuro de hierro (precipitado negro). Por lo tanto, si un caldo de cultivo muestra un precipitado negro 2-3 días después de la inyección de la muestra de agua, entonces se considera positiva la presencia de Bacterias Sulfato Reductoras en que el agua de análisis (NACE, 1994).

Las muestras de agua adquiridas se inocularon en Caldos de cultivos (marca MAG BRS-10-B) específicos para dichas Bacterias, ya que en su formulación este caldo de cultivo responde a la del caldo Postgate B modificada. Es un caldo muy utilizado para el recuento de bacterias reductoras de Sulfato (BRS) planctónicas. Son elaborados con Lactato como fuente de carbono, con un clavo de hierro, con pH 7,5 +/- 0,5 y Eh= -250mV que asegura su estricta anaerobiosis. Su aspecto es claro, incoloro o ligeramente ambarino y se puede observar un leve precipitado en los caldos elaborados con alta salinidad (NACE, 1994).

Para obtener resultados más fiables los medios de cultivo y las condiciones de operación deben simular las condiciones de operación en el campo. Es por ello que los medios de cultivo deben poseer una salinidad aproximada a la existente en el campo (NACE, 1994).

- Procedimiento de la Técnica de Extensión- Dilución para enumerar Bacterias Sulfato Reductoras en Agua de campo (NACE, 1994).

#### 1. Preparación de Botellas

Para inocular las muestras de agua se seleccionaron los caldos de cultivo MAG-BRS para salinidades entre 30 a 49 gr/l NaCl, para los puntos de muestreo Punto B y Punto C (según lo indican los análisis físico-químicos; Ver anexo I), y para los puntos de Gasolinoducto y tanque 3 entre 50-99 g/l NaCl (según lo indican los análisis físico-químicos; Ver anexo I) Se ubican las botellas que contienen 9 ml de solución del medio de cultivo adecuado, en líneas de 5 botellas y se rotulan de 1 a 5. Tal cual se indica en la figura 17.

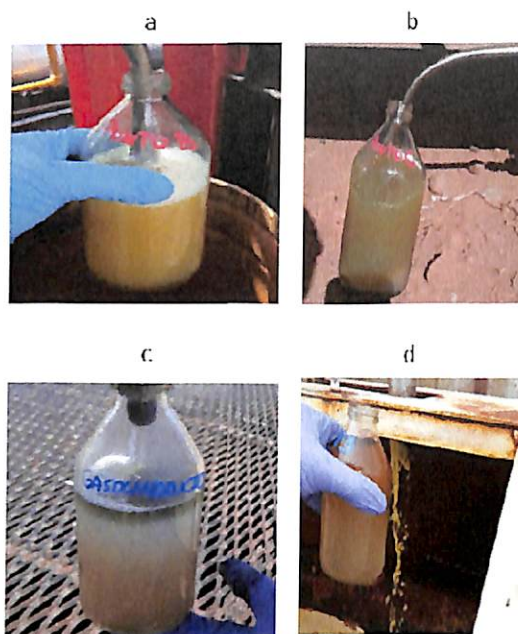


Fuente: Elaboracion propia, 2015.

**Figura 17:** Preparación de los caldos BRS.

2. Se tomó una muestra representativa de cada punto seleccionado anteriormente. En el Punto compresor B, la muestra fue tomada al ingreso de la línea de conducción (ver figura 18 a). Al igual que para el punto compresor C (ver figura 18 b). En el Gasolinoducto la muestra fue tomada de la línea de ingreso al mismo (ver figura 18 c). Para el Tanque 3, la muestra fue tomada a la salida del tanque, en el grifo n°2 (ver figura 18 d).

Para tomar la muestra se procedió de la siguiente manera: se dejó fluir el líquido durante varios minutos y se lavó cada botella de muestreo dos veces con el agua del sistema, a fin de que las líneas se limpien y evitar recoger líquidos de los espacios muertos o evitar contaminación. Se procuró llenar las botellas de muestreo hasta el límite del envase, eliminando el aire que pueda existir. Se registran valores de temperaturas del agua.



Fuente: Elaboracion propia, 2015

**Figura 18:** Muestras de agua representativa de cada punto de muestreo.

3. La inoculación se realizó In-situ. Para ello se utilizó una jeringa estéril de 1ml, se tomó 1 ml de muestra de agua obtenida en el punto anterior y se inyectó en el primer caldo de inoculación. Luego se agitó vigorosamente. Luego utilizando una nueva jeringa se retiró 1 ml del primer caldo inoculado y se inyectó nuevamente en el segundo caldo inoculado.

Siguiendo esta metodología se continúa el proceso hasta el caldo n°5 para completar las diluciones. Si no existe información previa sobre la cantidad de bacterias/ml de la muestra suelen sembrarse 6 frascos. Pero sabiendo los antecedentes del área y bajo experiencias del personal del lugar, se utilizaron 5 caldos para inocular.

4. Los caldos de inoculación se rotularon adecuadamente, con la fecha de inoculación y el lugar del muestreo. Se guardaron en una caja de telgopor, al resguardo del sol y del calor, hasta llegar al laboratorio.

5. Se colocaron en la estufa de incubación los cultivos a 34°C aproximadamente, respetando una diferencia de +/- 5 °C que poseía el sistema. Efectuándose lecturas diarias durante 21 días, tomando nota sobre

cambios en los caldos.

#### 6. Lectura de los resultados:

Se tuvieron en cuenta los frascos que manifestaron alguna modificación como consecuencia del crecimiento bacteriano, esta modificación puede ser turbidez, cambio de color o ennegrecimiento, la contabilización de los caldos reaccionados se realizó siguiendo la tabla III (NACE, 1994) que se muestra a continuación.

En el Anexo II se podrá encontrar mayor detalle de las variaciones en la lectura de los caldos.

**Tabla III:** Lectura de resultados de Técnica de Extensión- Dilución para enumerar Bacterias Sulfato Reductoras en agua de campo.

N° de caldos positivos	Bacterias/ ml
1	1-10 ( $10^1$ )
2	10- 100 ( $10^2$ )
3	100-1000 ( $10^3$ )
4	1000-10000 ( $10^4$ )
5	10000-100000 ( $10^5$ )

Fuente: Elaboracion propia 2016

#### 3.3.1.2. Parámetros Físico-Químicos

El crecimiento de las Bacterias Sulfato Reductoras depende de diferentes factores ambientales. Por lo tanto, los parámetros físicos-químicos medidos permiten asegurarnos de que las condiciones óptimas de crecimiento de Bacterias Sulfato Reductoras estuvieron dadas. Las mediciones se realizaron In -situ, debido a que las mismas pueden sufrir variaciones en algunos parámetros a lo largo del tiempo, como: salinidad, pH, temperatura, oxígeno disuelto, ácido sulfhídrico, color y olor (NACE, 1994).

### a) Salinidad

Para su medición se utilizó un equipo Digital Titration y cartuchos de Hach de Nitrato de Mercurio 2,256 N, como titulador (Ver figura 19), siguiendo el método de Nitrato de mercurio (N° 8206 Hach) para determinar Cl<sup>-</sup> en un rango de 10 a 8000 mg/l de Cl<sup>-</sup>. Una vez obtenido el resultado de Cl<sup>-</sup> en el agua, se realizó la relación estequiometria para determinar la concentración salina del agua (NaCl).



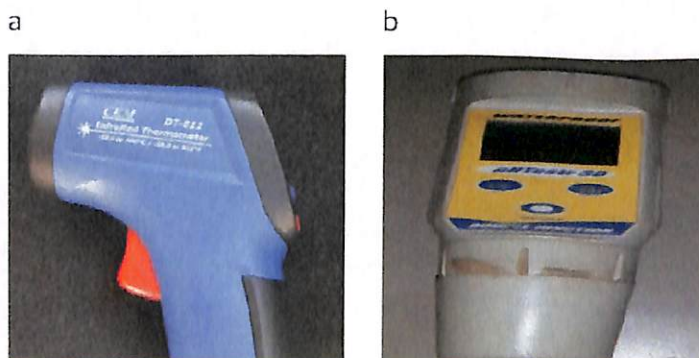
Fuente: Elaboracion propia, 2015

**Figura 19:** Digital Titration para medir salinidad.

### b) Temperatura y pH

La temperatura fue medida con Pistola Láser CEM DT-812, termómetro infrarrojo- OmyBigDeal (Ver figura 20 a); rango de medición de -50°C a 500°C.

Las mediciones de pH fueron realizadas con un pH-metro digital OaktonWaterproof-pH Tester 30 Pocket (ver figura 20b). El cual posee un rango de medición de -1 a 15 pH.



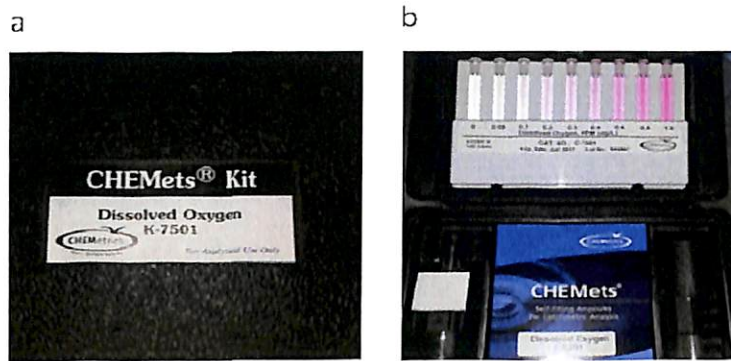
Fuente: Elaboracion propia, 2015

**Figura 20:** a) Pistola láser para medir temperatura; b) pH-metro digital para medir pH.



### c) Oxígeno disuelto

La medición de Oxígeno disuelto se realizó con el kit de CHEMests (ver figura 21 a) utilizando un rango de ampollas graduadas (ver figura 21 b). La cual indica su concentración de acuerdo a la variación de color. Para el rango de 0 - 1 ppm OD (C-7501), la variación de color va de incoloro a rosa fuerte.

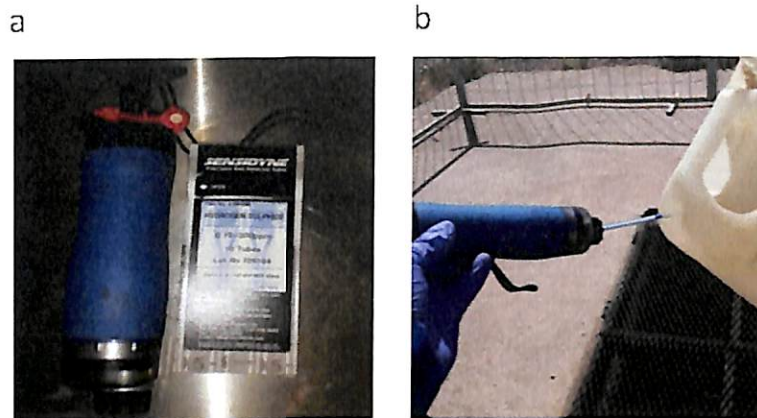


Fuente: Elaboracion propia, 2015

**Figura 21:** a) Kit utilizado para medir oxígeno; b) Ampollas utilizadas para medición.

### d) Ácido Sulfhídrico.

El ácido sulfhídrico se midió con un equipo que consta de una bomba de vacío o de aspiración (Sensidyne) de 100 ml de capacidad (ver figura 22), la cual se utiliza para extraer un volumen de la muestra de gas a analizar, y ampollas descartables graduadas (Sensidyne) que permiten realizar, por medio de una reacción química, un cambio de color en la ampolla, la lectura de la concentración de gas sulfhídrico en partes por millón (ppm) de acuerdo con el grado de contaminación de la corriente fluida que se está monitoreando. Otro elemento utilizado fue un recipiente para confinar el gas a analizar, éste posee dos orificios, uno por donde se produce el escape de gas y otro por donde se introduce la ampolla.



Fuente: Elaboracion propia, 2015

**Figura 22:** a) Equipo utilizado para medición ácido sulfhídrico; b) Toma de muestra en campo.

Para el rango de medición de la ampolla utilizada (0,75 -300 ppm), la reacción obtenida fue la siguiente:



Cambio de color: Blanco a Negro

#### e) Color y olor

En acompañamiento a las determinaciones físico-químicas del agua, también se realizaron observaciones de las características organolépticas de las muestras, las cuales dan indicios de la presencia de Bacterias Sulfato Reductoras, como ser el color, olor, sólidos suspendidos, turbidez (NACE, 1994).

### 3.3.2. Segunda Etapa

En esta etapa se llevó a cabo el segundo muestreo con la intención de realizar el ensayo de Time kill test. Para el cual fue necesario realizar previamente una búsqueda bibliográfica de los diferentes biocidas utilizados en la industria hidrocarburífera.

#### 3.3.2.1. Selección de biocidas

Para poder llevar a cabo el ensayo Time kill Test se debieron seleccionar solo

algunos biocidas, de todos los existentes en el mercado. Luego de una intensa búsqueda bibliográfica en la cual se evaluó: biocidas utilizados actualmente en la Industria Petrolera, aspecto ambiental de cada uno y la regulación legal, tanto nacional como internacional. Se fueron descartando ciertos componentes que no aplicaban a nuestros requerimientos y a las necesidades de aplicación en el lugar de trabajo.

En la tabla IV se podrá encontrar los biocidas seleccionados para el ensayo de Time kill test.

Las dosis escogidas de ensayo fueron las siguientes: 0, 10, 30, 50 y 100 ppm (Figuroa de Gil, et al., 2012).

**Tabla IV:** Biocidas seleccionados para el ensayo Time Kill Test

Nombre comercial	Nombre común- componente activo	Nombre químico- componente activo
<b>Bactron L-133</b>	THPS	Sulfato de tetrakis (hidroximetil) fosfonio.
<b>Bactron L-95</b>	THPS	Sulfato de tetrakis (hidroximetil) fosfónio.
<b>Bactron L- 54</b>	Glutaraldehido	1,5-Pentanodiol
<b>Bactron L-1032</b>	THPS + Quats	Sulfato de tetrakis (hidroximetil) fosfónio + Surfactantes iónicos

Fuente: Elaboracion propia, 2016

### 3.3.2.2. Time Kill test

Este ensayo evalúa la performance de los productos químicos (biocidas) con respecto al control de la actividad bacteriana en un sitio, en función de la dosis del reactivo utilizado y del tiempo de reacción (NACE, 1994).

Para realizar dicho ensayo se tomó en cuenta el Procedimiento Time Kill Test CH/103\_Revisión 1", de Champion Technologies, el cual respeta los lineamientos del "Standard Test Method: NACE TM 19404 "Field Monitoring of

## Bacterial Growth in Oil and Gas Systems”.

- Procedimiento: Time Kill Test.

1. Se tomó una muestra de agua de producción de cada punto de muestreo detallado anteriormente y se llevó inmediatamente al laboratorio para continuar con el ensayo. La muestra se mantuvo al resguardo del calor y del sol, para ello se utilizó una caja de telgopor.
2. En el laboratorio se prepararon diluciones al 10 % de los biocidas seleccionados y se dosificaron en 100 ml del agua de producción obtenida en los diferentes puntos de muestreo, de acuerdo a la dosis requerida.
3. Se consideraron las mismas características de los caldos, que se utilizaron en el ensayo anterior (Técnica de Extensión- Dilución para enumerar Bacterias Sulfato Reductoras en Agua de campo) para inocular las nuevas muestras de agua de producción dosificadas con los biocidas seleccionados.

Se ubicaron los caldos en hileras del 1 al 5, se rotularon según correspondía y se procedió a la inoculación tal cual se realizó en el punto 3 de la Técnica de Extensión- Dilución para enumerar Bacterias Sulfato Reductoras en Agua de campo.

4. Luego se colocaron en la estufa de incubación cultivos a 34°C aproximadamente, respetando una diferencia de +/- 5 °C que poseía el sistema, durante 21 días. Efectuándose lecturas diarias, anotando los cambios que iban apareciendo al correr de los días.
5. Luego de finalizado los días de incubación se procedió a la lectura final, siguiendo la tabla III.

### **3.4. ANALISIS DE DATOS**

Para la determinación de la mejor combinación biocida-dosis se realizó un experimento en un Diseño en Bloques Completos al Azar con un arreglo factorial de tratamientos (Montgomery, 1991). Se consideró el efecto asociado al tipo de Biocida, el efecto de la dosis, la interacción entre ambos, y cada punto de muestreo se trató como un bloque.

Todos los factores se consideraron fijos.

El modelo de análisis de la varianza que corresponde al diseño implementado es el siguiente:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \gamma_k + \varepsilon_{ijk}$$

Dónde:

$y$  es el número de caldos reaccionados.

$\mu$  es la media general

$\alpha_i$  es el efecto del  $i$ -ésimo nivel del Biocida

$\beta_j$  es el efecto del  $j$ -ésimo nivel de dosis

$\alpha\beta_{ij}$  es el efecto de la interacción entre el  $i$ -ésimo biocida y la  $j$ -ésima dosis

$\gamma_k$  es el efecto del  $k$ -ésimo bloque

$\varepsilon_{ijk}$  es el error aleatorio que se supone normal y homocedástico

La hipótesis principal que se pone a prueba es la posible existencia de interacción entre los biocidas y las dosis. Esta hipótesis supone que no habrá variaciones entre las respuestas a las dosis dependiendo del Biocida utilizado:

$$H_0: (\alpha\beta)_{ij} = 0 \quad \forall ij$$
$$H_1: (\alpha\beta)_{ij} \neq 0 \quad \text{para al menos un par } ij$$

Si se rechaza la hipótesis nula, se concluye que existe interacción entre los factores y se procede a realizar una prueba de comparación de medias de Tukey. Si no se rechaza la hipótesis, se analizan los efectos principales de Biocida y Dosis.

También se pone a prueba la efectividad de los Bloques:

$$H_0: \gamma_k = 0 \quad \forall k$$
$$H_1: \gamma_k \neq 0 \quad \text{para al menos un } k$$

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

---

### 4.1. PRIMER ETAPA

#### 4.1.1. Recuento de Bacterias Sulfato Reductoras

La lectura final de los caldos inoculados según la Técnica de Extensión-Dilución para enumerar Bacterias Sulfato Reductoras en Agua de campo, para cada punto de muestreo seleccionado, arrojó los siguientes resultados.

- Punto compresor B

Se observaron 4 caldos ennegrecidos, todos con presencia de un precipitado color negro, según se muestra en la figura 23. Por lo tanto, el valor de la lectura arrojó 4 caldos positivos, un total de  $10^4$  Bacterias Sulfato Reductoras/ml.



Fuente: Elaboracion propia, 2015

**Figura 23:** Lectura de caldos de punto compresor B: 4 caldos positivos.

- Punto compresor C

Se observaron 5 caldos ennegrecidos, los cuales van perdiendo fuerza en el color a medida que aumentan las diluciones, llegando al caldo 5 que se observa un leve color negro. En los primeros 4 se observó un precipitado, según se muestra en la figura 24. Por lo tanto, el valor de la lectura arrojó 5 caldos positivos, un total de  $10^5$  Bacterias Sulfato Reductoras/ml.



Fuente: Elaboracion propia, 2015

**Figura 24:** Lectura de caldos de punto compresor C: 5 caldos positivos.

- Gasolinoducto

Se observaron 5 caldos ennegrecidos, el caldo n° 1 presenta un fuerte color negro, luego disminuye la intensidad del color. Con excepción del caldo n° 4, en el resto se observó un precipitado, según se muestra en la figura 25. Por lo tanto, el valor de la lectura arrojó 5 caldos positivos, un total de  $10^5$  Bacterias Sulfato Reductoras/ml.



Fuente: Elaboracion propia, 2015

**Figura 25:** Lectura de caldos de Gasolinoducto: 5 caldos positivos.

- Tanque 3

Se observaron 5 caldos ennegrecidos. En todos los caldos se observó un precipitado, según se muestra en la figura 26. Por lo tanto, el valor de la lectura arroja 5 caldos positivos, un total de  $10^5$  Bacterias Sulfato Reductoras/ml.



Fuente: Elaboracion propia, 2015

**Figura 26:** Lectura de caldos de Tanque 3: 5 caldos positivos.

Estos resultados demuestran que los puntos de muestreo seleccionados para realizar el ensayo de Time kill Test, son correctos. Ya que en todos los puntos se observó gran presencia de Bacterias Sulfato Reductoras, permitiendo resultados claros en el Time kill test.

#### 4.1.2. Parámetros físico - químicos

Los valores de los parámetros físico-químicos medidos en los puntos de muestreo seleccionados se observan en la tabla V.

**Tabla V:** Valores de parámetros Físicos – Químicos de agua de producción.

Parámetros	Punto compresor B	Punto compresor C	Gasolinoducto	Tanque 3
Salinidad (gr/l de NaCl)	30,71	39,01	73,02	82,25
pH	6,50	6,53	6,74	5,90
T (°C)	28,2	28,5	27,3	30,3
O.D (ppm)	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
SH <sub>2</sub> (ppm)	1,50	1	1	1

Fuente: Elaboracion propia 2016

Se puede observar que los valores obtenidos de salinidad, pH y temperatura en los diferentes puntos de muestreo, son valores aptos de crecimiento para las Bacterias Sulfato Reductoras, según indica Videla & Salvarezza, 1984. Según



describe Patton (1986), valores de concentración mayores a 100 g/L pueden limitar el crecimiento de las Bacterias Sulfato Reductoras.

Se pudo corroborar que los valores de salinidad obtenidos coinciden con los valores de salinidad determinados mediante análisis realizados por laboratorios externos solicitados por la Operadora (ver Anexo I).

Los valores bajos o casi nulos de oxígeno disuelto obtenido en las mediciones, indican la presencia de un ambiente óptimo para el desarrollo de Bacterias Sulfato Reductoras, ya que según Videla & Salvarezza (1984), estas Bacterias son anaeróbicas, y por lo tanto la ausencia de oxígeno en el sistema favorece su crecimiento dentro del mismo. Si bien Patton (1986), dice que se han encontrado Bacterias Sulfato Reductoras en ambientes acuáticos oxigenados, se sabe que estas se encuentran en escaso número y no se multiplican a una tasa apreciable.

Al realizar la inspección visual de las muestras tomadas se pudo observar un precipitado y/o coloración negra y un leve olor a huevo podrido la cual según Endean (1989), estas determinaciones visuales son las características para identificar Sulfuro de Hierro y ácido sulfhídrico y esos compuestos demuestran actividad de las Bacterias Sulfato Reductoras.

También es así, que la baja concentración del ácido sulfhídrico que dio como resultado la medición en campo, condice con lo dicho por Videla & Salvarezza (1984), ya que ellos consideran que valores bajos del ácido sulfhídrico favorece el crecimiento de las Bacterias, pero estas a altas concentraciones del compuesto, disminuyen su tasa de crecimiento.

Patton (1986), a su vez, cree que ese efecto es a causa de la reducción de la concentración de hierro disuelto que al reaccionar con el ácido sulfhídrico provoca la precipitación como sulfuro de hierro, disminuyendo de este modo la concentración de ión ferroso en el medio, el cual según Jhobalia et al., (2005), es esencial para la velocidad de crecimiento de las Bacterias Sulfato Reductoras.

## 4.2. SEGUNDA ETAPA

### 4.2.1. Time kill test

De los biocidas seleccionados para realizar el ensayo de Time kill test, se puede describir, según las hojas de seguridad (SDS), la siguiente identificación de peligros:

- El Bactron L-54, se clasifica como tóxico en caso de ingestión (H301); provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves (H314); puede provocar una reacción alérgica en la piel (H317); mortal en caso de inhalación (H330); puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación (H334); Muy tóxico para los organismos acuáticos (H400) (Champion Technologies, 2013).
- El Bactron L-95, se clasifica como nocivo en caso de ingestión (H302); Nocivo en contacto con la piel (H313); puede provocar una reacción alérgica en la piel (H317); provoca lesiones oculares graves (H318); puede ser nocivo si se inhala (H333); puede perjudicar la fertilidad o dañar el feto (H360); nocivo para los organismos acuáticos (H402) (Champion Technologies, 2013).
- El Bactron L-133, se clasifica como nocivo en caso de ingestión (H302); puede provocar una reacción alérgica en la piel (H317); provoca lesiones oculares graves (H318); tóxico en caso de inhalación (H331); puede perjudicar la fertilidad o dañar el feto (H360); muy tóxico para los organismos acuáticos (H400) (Champion Technologies, 2013).
- El Bactron L-1032, se clasifica como nocivo en caso de ingestión (H302); provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves (H314); puede provocar una reacción alérgica en la piel (H317); tóxico en caso de inhalación (H331); puede perjudicar la fertilidad o dañar al feto (H360); puede provocar daños en los órganos (H371); muy tóxico para los organismos acuáticos (H400) (Champion Technologies, 2013).

A continuación, se pueden observar los resultados obtenidos del ensayo Time Kill Test, detallados según el punto de muestreo. En el Anexo III se

podrá observar en mayor detalle el resultado de los caldos de inoculación de acuerdo a la evolución de los días.

- Punto compresor B

La figura 27 muestra la inoculación completa del ensayo Time kill test para un punto de muestreo específico. Aquí podremos observar los caldos positivos luego de 21 días de haber sido inoculados. En la figura 28, se puede observar la totalidad de los caldos reaccionados.

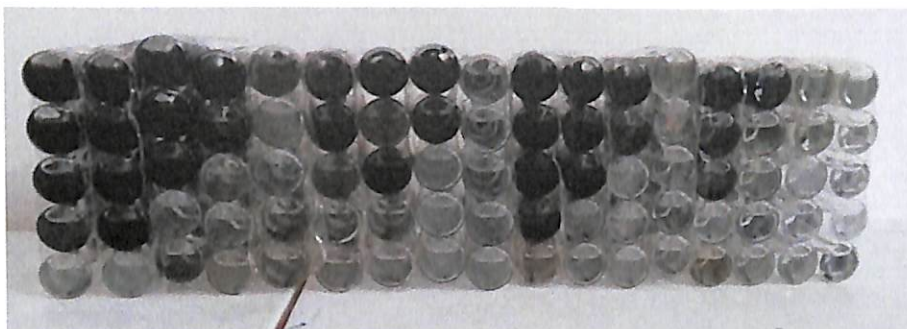
Se han logrado buenos resultados con la aplicación de los biocidas en general. El Bactron L-133, Bactron L-95 y Bactron L-54 han logrado disminuir la concentración de Bacterias Sulfato Reductoras a una cantidad permitida en el sistema ( $10^2$  Bacterias Sulfato Reductoras/ml) con una dosis de 50 ppm. El Bactron L-1032 ha mostrado una marcada diferencia ya que a una dosis de 30 ppm ha logrado reducir la cantidad de Bacterias del sistema a  $10^1$  Bacterias Sulfato Reductoras/ml.

El total de los biocidas aplicados a una dosis excesiva de 100 ppm ha logrado la mortandad total de las Bacterias Sulfato Reductoras en el punto de aplicación.



Fuente: Elaboracion propia, 2015

**Figura 27:** Vista de frente de la inoculación de los caldos BRS para el Punto compresor B.



Fuente: Elaboracion propia, 2015

**Figura 28:** Vista inferior de los caldos de BRS reaccionados luego de 21 días para el Punto compresor B.

- Punto compresor C

En la figura 29, se puede observar la inoculación completa del ensayo Time kill test para la muestra de agua obtenida en el Punto compresor C. En la figura 30, se puede observar la totalidad de los caldos positivos.

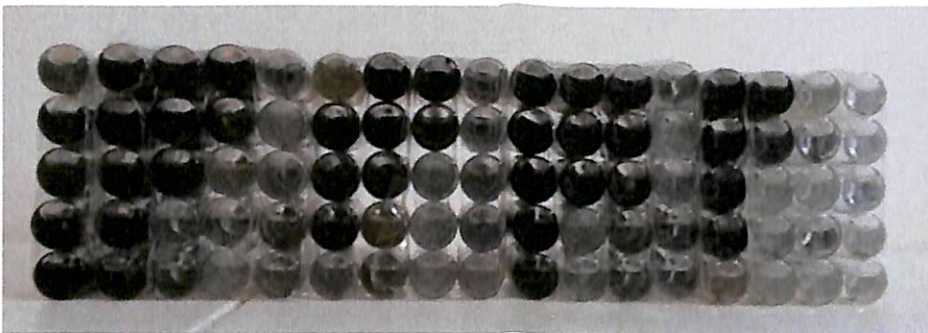
Se han logrado buenos resultados con la aplicación de los biocidas en general. El Bactron L-133 y Bactron L-95 han logrado disminuir las concentraciones de Bacterias Sulfato Reductoras a una cantidad permitida en el sistema ( $<10^2$  Bacterias Sulfato Reductoras/ml) con una dosis de aplicación de 50 ppm. Bactron L-54 a igual dosis presenta un total de  $10^3$  Bacterias Sulfato Reductoras/ml, por lo que se cree que a esa concentración de Bacterias ya causan un problema serio al sistema. El Bactron L-1032 ha mostrado una marcada diferencia ya que a una dosis de 30 ppm ha logrado reducir la cantidad de Bacterias a  $10^2$  Bacterias Sulfato Reductoras/ml.

El total de los biocidas aplicados a una dosis excesiva de 100 ppm ha logrado la mortandad total de las Bacterias Sulfato Reductoras en el punto de aplicación.



Fuente: Elaboracion propia, 2015

**Figura 29:** Vista de frente de la inoculación de los caldos BRS para el Punto compresor C.



Fuente: Elaboracion propia, 2015

**Figura 30:** Vista inferior de los caldos de BRS reaccionados luego de 21 días para el Punto compresor C.

- **Gasolinoducto**

En la figura 31, se puede observar la inoculación completa del ensayo Time kill test para la muestra de agua obtenida del punto Gasolinoducto. En la figura 32, se puede observar la totalidad de los caldos positivos.

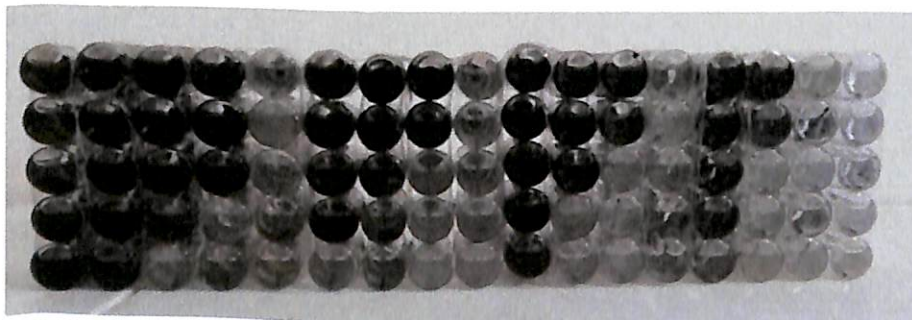
El Bactron L-95 y Bactron L-54 han logrado disminuir las concentraciones de Bacterias Sulfato Reductoras a una cantidad permitida en el sistema ( $10^2$  Bacterias Sulfato Reductoras/ml) con una dosis de aplicación de 50 ppm. El Bactron L-133 a igual dosis presenta un total de  $10^3$  Bacterias Sulfato Reductoras/ml, por lo que se cree que a esa concentración de Bacterias ya causan un problema serio al sistema. El Bactron L-1032 ha mostrado una marcada diferencia ya que a una dosis de 30 ppm ha logrado reducir la cantidad de Bacterias a  $10^2$  Bacterias sulfato Reductoras/ml.

El total de los biocidas aplicados a una dosis excesiva de 100 ppm ha logrado la mortandad total de las Bacterias Sulfato Reductoras en el punto de aplicación.



Fuente: Elaboracion propia, 2015

**Figura 31:** Vista de frente de la inoculación de los caldos BRS para el Gasolinoducto.



Fuente: Elaboracion propia, 2015

**Figura 32:** Vista inferior de los caldos de BRS reaccionados luego de 21 días para el Gasolinoducto.

- **Tanque 3**

En la figura 33, se puede observar la inoculación completa del ensayo Time kill test para el agua obtenida en el punto de muestreo Tanque 3. En la figura 34, se puede observar la totalidad de los caldos positivos.

El Bactron L-95 ha logrado disminuir las concentraciones de Bacterias Sulfato Reductoras a una cantidad permitida en el sistema ( $10^2$  Bacterias Sulfato Reductoras/ml) con una dosis de aplicación de 50 ppm. El Bactron L-133 y el Bactron L-54 a igual dosis presenta un total de  $10^3$  Bacterias Sulfato Reductoras/ml, por lo que se cree que a esa concentración de Bacterias ya causan un problema serio al sistema. El Bactron L-1032 ha mostrado una

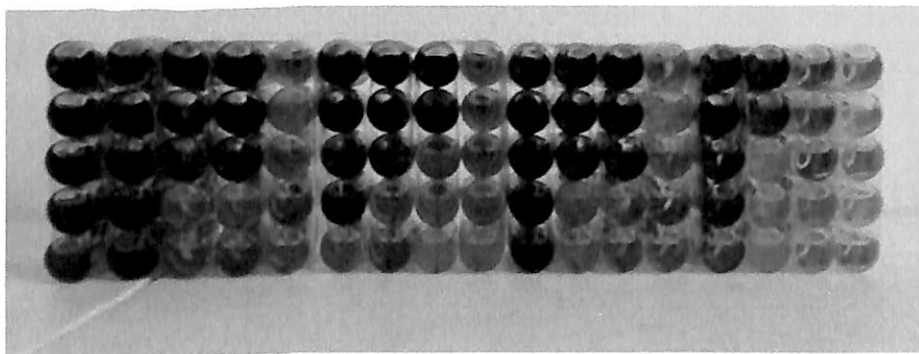
marcada diferencia ya que a una dosis de 30 ppm ha logrado reducir la concentración de Bacterias a  $10^2$  Bacterias sulfato Reductoras/ml.

El total de los biocidas aplicados a una dosis excesiva de 100 ppm ha logrado la mortandad total de las Bacterias Sulfato Reductoras en el punto de aplicación.



Fuente: Elaboracion propia, 2015

**Figura 33:** Vista de frente de la inoculación de los caldos BRS para el Tanque 3.



Fuente: Elaboracion propia, 2015

**Figura 34:** Vista inferior de los caldos de BRS reaccionados luego de 21 días para el Tanque 3.

Según la NACE (1994), los resultados arrojados en el ensayo de Time Kill Test (ver tabla XIV en el Anexo III) dan cuenta de una población de Bacterias Sulfato Reductoras planctónicas y no de las sésiles. Según Morton et al. (1998), en un sistema típico, existen entre 1000 a 10000 veces más bacterias adheridas a superficies que libres en el agua.

A su vez, los resultados no reflejan el total de los microorganismos que se han inoculado, y que luego conforma el biofilm, el cual según Videla & Herrera

(2009), participan de manera activa, junto a las Bacterias Sulfato Reductoras, aportando al aumento del problema.

Es importante entender esta situación para una correcta interpretación de los resultados, ya que la susceptibilidad de microorganismos planctónicos a los agentes químicos (biocidas) difiere notablemente de la de los microorganismos sésiles dentro del biofilm.

Según Morton et al. (1998), las bacterias sésiles son capaces de desarrollar un mecanismo de protección (sustancias exopolisacáridas) generando cierta tolerancia a la acción del biocida, lo que hace más difícil combatir un problema de bacterias sésiles que uno de bacterias plantónicas. Es por ello, que la aplicación de los químicos en campo puede variar de los ensayos realizados en el laboratorio.

Según Chambless et al. (2006), las bacterias ofrecen cierta resistencia al efecto del biocida por lo cual, si el tratamiento propuesto para combatir las no es el adecuado, o sea, no se encuentra dentro de la dosis umbral de aplicación, este finaliza en un aumento de dosis periódico, haciendo ineficiente el tratamiento. Los motivos de la ineficiencia se traducen en un aumento de los gastos económicos, mayor consumo de producto químico, mayor concentración de producto en el sistema y una mayor exposición de los riesgos, tanto para el hombre como para el ambiente. Es por ello, que se intenta buscar una mayor eficiencia a la menor dosis posible.

Chambless et al., (2006) dice que, cuando el valor de dosis umbral es menor que la concentración requerida para matar, entonces hay un rango de concentraciones de biocida en la que la adaptación para las bacterias es relativamente favorable. La adaptación de las bacterias también puede ocurrir a concentraciones por encima de la concentración de dosis umbral, pero en esta situación hay una carrera entre la transformación de células vivas a las células muertas y la transformación de células vivas a las células adaptadas.

Las células adaptadas se vuelven invulnerables a la muerte, lo que permite, según Chambless et al., (2006), que este tipo de células, dominen finalmente la población del biofilm y causen futuros inconvenientes de pinchaduras en las



líneas de conducción y tanques de almacenamiento.

#### 4.2.2. Análisis de la varianza

La tabla VI de Análisis de la Varianza muestra los resultados de este análisis.

**Tabla VI:** Resultado de análisis de datos.

Effect	Univariate Tests of Significance for RTA (ensayos) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	402,5208	1	402,5208	2938,217	0,000000
BIOCIDA	21,2292	3	7,0764	51,654	0,000000
DOSIS	53,0417	2	26,5208	193,590	0,000000
BIOCIDA*DOSIS	4,9583	6	0,8264	6,032	0,000243
PUNTO MUESTREC	2,7292	3	0,9097	6,641	0,001240
Error	4,5208	33	0,1370		

Fuente: Elaboracion propia 2016

De acuerdo a estos resultados se rechazan ambas hipótesis propuestas. Es decir, existe efecto de la interacción entre biocida y dosis y existe efecto bloque.

Las verificaciones de los supuestos del modelo indican que los errores pueden considerarse normales y que las varianzas pueden suponerse iguales. Las pruebas de hipótesis asociadas junto con los gráficos de análisis se encuentran en el Anexo IV.

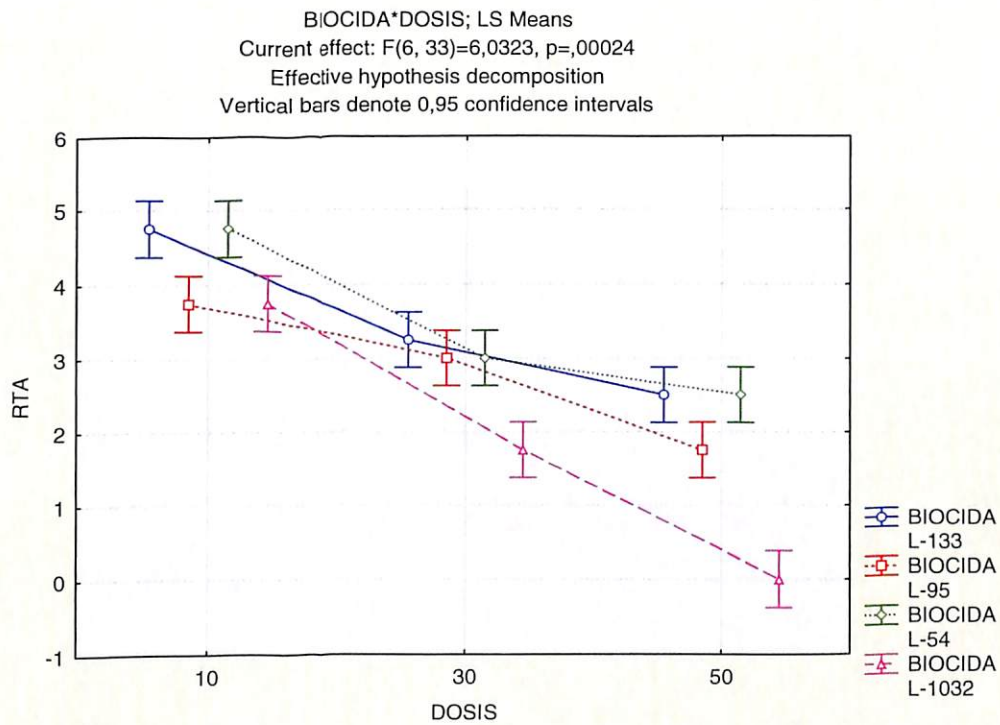
A continuación, se analizan las diferencias de medias de los tratamientos (ver tabla VII), con la finalidad de establecer una combinación óptima para el control de las bacterias BRS en el sistema. Se entiende por combinación óptima aquella que a la menor dosis posible produzca una respuesta de a lo sumo 2 caldos reaccionados. Mayor cantidad de caldos reaccionados ya indican un tratamiento sin eficiencia, según condiciones de trabajo establecidas por la operadora.

**Tabla VII:** Análisis de comparación de medias de Tukey.

		Tukey HSD test; variable RTA (ensayos)						
		Homogenous Groups, alpha = ,05000						
		Error: Between MS = ,13699, df = 33,000						
Cell No.	BIOCIDA	DOSIS	RTA Mean	1	2	3	4	5
12	L-1032	50	0,000000					****
6	L-95	50	1,750000			****		
11	L-1032	30	1,750000			****		
9	L-54	50	2,500000	****		****		
3	L-133	50	2,500000	****		****		
5	L-95	30	3,000000	****	****			
8	L-54	30	3,000000	****	****			
2	L-133	30	3,250000	****	****			
10	L-1032	10	3,750000		****			
4	L-95	10	3,750000		****			
7	L-54	10	4,750000				****	
1	L-133	10	4,750000				****	

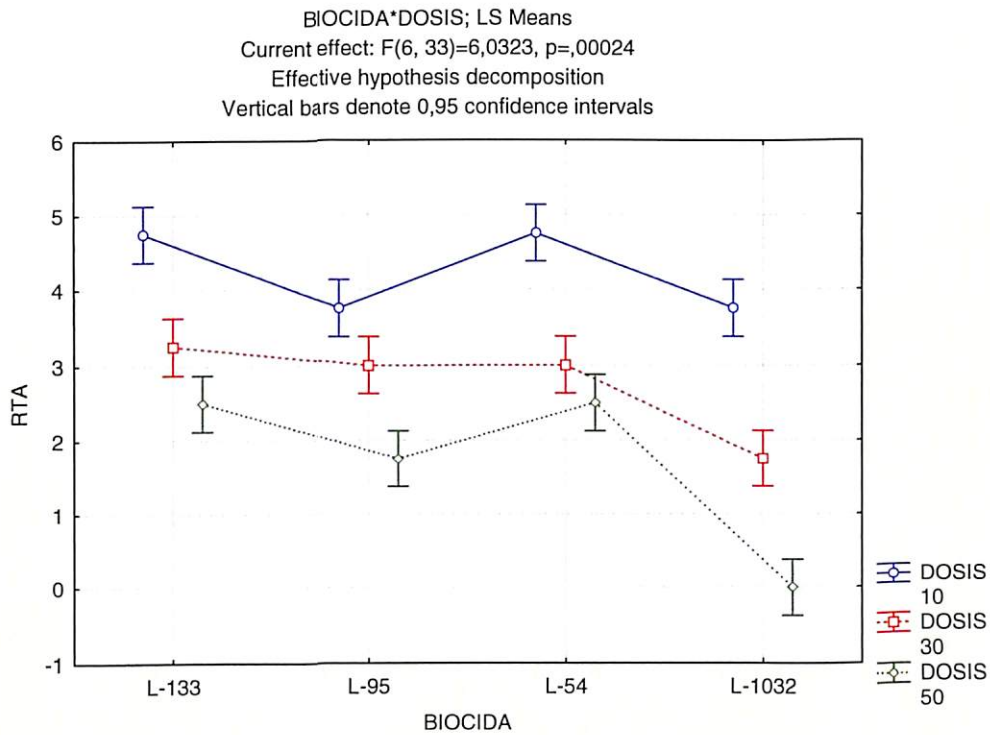
Fuente: Elaboracion propia 2016

**Tabla VIII:** Respuesta media por dosis según el tipo de Biocida.



Fuente: Elaboracion propia 2016

**Tabla IX:** Respuesta media por Biocida según dosis.



Fuente: Elaboracion propia 2016

Del análisis de datos realizado se puede observar en la tabla VIII y IX que las combinaciones que producen una respuesta media inferior a 2 son las combinaciones Bactron L-95 a dosis de 50 ppm, Bactron L-1032 a dosis de 50 ppm y Bactron L-1032 a dosis de 30 ppm. El resto de las combinaciones superan las expectativas de dosis a aplicar.

Videla & Herrera (2005), indican que la combinación de un compuesto de amonio cuaternario con los otros biocidas provoca un efecto sinérgico en el componente activo, aumentando su eficiencia en el control bacteriano, puesto que ataca la superficie del biofilm y mejora la penetración del biocida. Esto ha sido demostrado tanto por Williams & Cooper (2014), los cuales han realizado diferentes pruebas con Formaldehído, Glutaraldehído, Sales de amonio cuaternario (Quats) y Sulfato de tetrakis (hidroximetil) fosfonio (THPS), como también por los resultados del ensayo del Time kill test realizado en nuestro trabajo. Ya que aquí se ha demostrado que la mayor eficiencia a la menor dosis se obtuvo con Bactron L-1032, el cual es un biocida cuya formulación posee una combinación de Sal de amonio cuaternario con Sulfato de tetrakis

(hidroximetil) fosfonio (THPS).

Según Endean (1989), las sales de amonio cuaternario actúan sobre la pared celular bacteriana cargada negativamente. Esta química solubiliza esencialmente la membrana celular que conduce al daño celular y finalmente la muerte. La acción del tensioactivo que posee las sales de amonio, logran afectar la pared celular bacteriana haciéndola más accesible a otros biocidas, facilitando su penetración y la mejora de efecto biocida. Por lo tanto, es común encontrar tratamientos de Corrosión Inducida Microbiológicamente, en el cual se combinan sales de amonio cuaternario (Quats) con otros biocidas.

Según Videla & Herrera (2005), se sabe que históricamente el Sulfato de tetrakis (hidroximetil) fosfonio (THPS) ha sido utilizado por su capacidad para disolver el sulfuro ferroso insoluble, el cual fue hallado en las muestras de agua como un precipitado negro. Por lo que es una buena solución de uso para los problemas que plantea el Yacimiento. Tanto el Sulfato de tetrakis (hidroximetil) fosfonio (THPS) como el Glutaraldehído son compuestos frecuentemente utilizados para el control bacteriano en Yacimientos y aptos para la aplicación en líneas de inyección y tanques de agua, ya que, según indica Figueroa de Gil et al., (2012), no provocan daños colaterales, como es el caso de los productos oxidantes como el Cloro y sus derivados.

En cuanto al aspecto ambiental de los biocida ensayados, según Williams & Cooper (2014), han demostrado ser más estable bajo condiciones ligeramente ácidas (pH 5) y la estabilidad fue más reducida (vida media más corta) a pH 9. Al igual que el resto de los biocidas, los biocidas estudiados presentan valores de solubilidad en agua relativamente altos. Su potencial de bioacumulación y bioconcentración en el medio ambiente es bajo.

En sus ensayos Williams & Cooper (2014), muestran al Glutaraldehído y el Sulfato de tetrakis (hidroximetil) fosfonio (THPS) como componentes móviles, lo cual significa que pasarían fácilmente a través de columnas de suelo, no siendo esto muy beneficioso desde el aspecto ambiental, mientras que los biocidas catiónicos y cuaternarios mostraron una mayor unión (menos movilidad) en los

suelos.

De todos modos, considerando la baja permeabilidad que posee el suelo en el Yacimiento Lindero Atravesado, según Ferrer et al., (2006), esto no se presenta como un problema a la hora de seleccionar un biocida de bajo impacto ambiental.

Según las directrices del ensayo OECD 301, de los resultados de biodegradación de los biocidas No oxidantes, el Glutaraldehído, y las sales de amonio cuaternario fueron los únicos biocidas clasificados como "fácilmente biodegradable". A su vez, la Environmental Protection Agency (EPA) (2011), también describió al Sulfato de tetrakis (hidroximetil) fosfonio (THPS) como "fácilmente biodegradable". Esto se presenta como un beneficio, ya que podemos decir que los biocidas seleccionados poseen una rápida degradación del compuesto original y no se espera que se acumulen en el medio ambiente.

Williams & Cooper (2014), consideran que es posible desactivar de forma segura y eficaz (neutralizar) los diversos biocidas seleccionados, en caso de ser necesario, previo a la descarga de un sistema de tratamiento de aguas residuales o de aguas naturales.

Ensayos de ecotoxicidad realizados para mamíferos y especies acuáticas no dianas, por Williams & Cooper (2014), para diferentes biocidas demostraron que en general, los biocidas oxidantes mostraron el mayor grado de toxicidad oral y dérmica. El Glutaraldehído, mostro una toxicidad oral para los mamíferos relativamente baja. En cuanto a la toxicidad acuática, los biocidas con la más alta toxicidad para los organismos acuáticos fueron los compuestos de amonio cuaternario catiónicos y los oxidantes. El Sulfato de tetrakis (hidroximetil) fosfonio (THPS) fue uno de los que presentó la toxicidad más baja para especies acuáticas.

De la normativa legal consultada, tanto a nivel internacional como nacional y local respecto a alguna prohibición de uso de los biocidas seleccionados no se halló alguna que prohibiera el uso de los mismos.

A nivel local no se ha encontrado una normativa que regule o prohíba el uso de

biocidas en la industria petrolera, si consideramos la ordenanza municipal de Neuquén N° 8320/98- Capítulo V- Título I: Controles especiales- 5.1.2; la cual menciona que el uso de productos químicos para el control de plagas y enfermedades (bactericidas, insecticidas, rodenticidas, fungicida, herbicida, etc.) deberán ser aptos según la autoridad de aplicación, reservándose esta, el derecho de rechazar los que considere inadecuado para tal fin o cuando se trate de productos ya prohibidos, en el orden provincial, nacional o internacional.

Desde el marco Provincial se encuentra la ley 2.774/11, de la Provincia de Neuquén. El alcance de esta ley, está orientado a las personas físicas o jurídicas, públicas o privadas, que en todo el territorio de la Provincia del Neuquén realicen actividades que impliquen el manejo de agroquímicos destinados a la producción agrícola, agroindustrial y a las áreas de esparcimiento. No se ha hallado ninguna normativa que regule el uso de biocidas para la industria Petrolera.

Desde el marco nacional, encontramos la lista de “Químicos prohibidos y restringidos en Argentina” emitido por el ministerio de Salud de la Nación, en la cual no aparece enlistados los biocidas seleccionados para el ensayo de Time kill test (Digón, 2013).

La Unión Europea publicó un inventario Reach (2014), en la cual se encuentran listados todos aquellos productos químicos que poseen algún tipo de restricción en su uso y comercialización, en la cual no se encuentran listados ningunas de los biocidas ensayados. No así, es el caso de China el cual publicó un inventario IECSC (2014) que colocó a la química del Glutaraldehido en el catálogo de químicas peligrosas.

De igual modo el inventario realizado en los Estados Unidos TSCA (2015) aprueba el uso de los biocidas ensayados. La EPA cree que el Sulfato de tetrakis (hidroximetil) fosfonio (THPS) puede ser un liberador de formaldehído (de uso prohibido), pero no puede estar seguro de ello ya que necesita de mayores datos.

## 5. CONCLUSIÓN

---

De acuerdo a los objetivos planteados en el presente trabajo de investigación, se puede concluir que:

La selección y el uso de biocidas debe estar acompañado de un análisis detallado que involucre varios aspectos, como lo son: el rendimiento del mismo, el costo, la seguridad en la manipulación y características ambientales. Todos los biocidas que existen en el mercado presentan toxicidad tanto para mamíferos como para especies acuáticas, algunos en mayor medida que otros, por lo que su uso debe ser restringido y controlado, al igual que su eliminación.

Los únicos biocidas clasificados como "fácilmente biodegradable" fueron el Glutaraldehído, las sales de amonio cuaternario y el Sulfato de tetrakis (hidroximetil) fosfonio (THPS). Basado en la búsqueda bibliográfica realizada, estos biocidas demostraron una rápida degradación del compuesto original y no se espera que se acumulen en el medio ambiente. Son más seguros en cuanto a la manipulación y poseen menor toxicidad general. Lo que resulta en un perfil ambiental favorable.

De los biocidas ensayados, el Bactron L-1032, el cual está compuesto por un porcentaje de Sulfato de tetrakis (hidroximetil) fosfonio (THPS) y otro de sales de amonio cuaternario, logró el mayor rendimiento en lo que respecta al control microbiológico en las muestras de agua obtenidas del Yacimiento Lindero Atravesado, a una dosis umbral de aplicación mínima.

Si se requiere eliminar este producto como residuo, según la búsqueda bibliográfica realizada, se vió que existen métodos fácilmente disponibles y eficaces para degradar químicamente los compuestos que los conforman y de esta forma minimizar aún más los efectos ambientales adversos potenciales. A su vez resulta ser un producto accesible a la comercialización y no posee restricciones legales de uso.

Por lo que se recomienda el uso del Bactron L-1032 a una dosis de 30 ppm para controlar el crecimiento de las bacterias Sulfato Reductoras en el

Yacimiento Lindero Atravesado.

En este trabajo no se ha podido demostrar la eficiencia real de la dosis de aplicación recomendada del Bactron L-1032 para combatir las Bacterias Sulfato Reductoras con el ensayo de "Time kill test", puesto éste ensayo es utilizado como una guía para la selección de biocidas en laboratorio.

Por lo tanto, se sugiere la posibilidad de abrir nuevas investigaciones que lleven a la práctica en campo de los resultados obtenidos del Time kill test de laboratorio que aquí se presentan.

A su vez se sugiere llevar este trabajo a los diferentes entes gubernamentales, encargados de regular el uso de sustancias químicas en las Industrias, con el fin de incluir aquellas sustancias químicas utilizadas en la Industria Hidrocarburífera, con la intención de disminuir el impacto ambiental que puede generar el uso de las sustancias químicas.

Considero muy importante que como profesionales del ambiente, exista nuestra participación en el desarrollo de los planes de trabajo de las diferentes Industrias. Como así también, exista la posibilidad de poder colaborar en la revisión del portfollio químico, con el fin de reemplazar aquellas sustancias que atentan contra el bienestar del ambiente, por otras menos agresivas.



## 6. ANEXOS

### ANEXO I

#### Caracterización del agua- Puntos de muestreo

Los siguientes resultados muestran los valores obtenidos en los diferentes puntos de muestreo seleccionados en el trabajo, realizado por la Operadora.

#### Caracterización del agua: Punto Compresor C

REEMPLAZAR ÚNICAMENTE LAS CELDAS AMARILLAS CON LETRAS ROJAS  
NO REEMPLAZAR EN PLANILLA DE RESULTADOS

Análisis solicitado por:	PANAMERICAN
Procedencia de la muestra	Punto Compresor C
Yacimiento:	Lindero Atravesado Occi.
Extraída por:	ALDAY R.
Fecha Extracción	06/06/2013
Hora de extracción	
Informe N°	
Fecha de Informe:	06/06/2013

FORMULARIO DE REPORTE DE LABORATORIO  
API RP 45

Empresa	Yacimiento	Fecha	Hora	Muestreado por
PANAMERICAN	Lindero Atravesado Occi.	06/06/2013	00:00	ALDAY R.
No. Informe	Punto Muestreo	Pozo	Profund.	Fecha Informe
0	Punto Compresor C	—	—	06/06/2013

Observaciones: **POLIDUCTO 3**

DETERMINACION	Vol. gastado	Vol. muestra	F. Dilución	F. Reactivo
Cloruros	3,7	5,0	1,0	1,0000
Alcalinidad Fenolftaleína	0,0	100,0	1,0	1,0000
Alcalinidad Total	0,3	100,0	1,0	1,0000
Dureza Total	1,6	10,0	1,0	1,0000
Dureza Cálctica	1,1	10,0	1,0	1,0000

Sulfatos	56,0
Hierro Total	56,100
Hierro Ferroso	0,000
Bario	18,000

Lectura	0,000
Dilución	0,000
Potasio	0,000

Nitrato de Plata	0,90090
Acido Sulfúrico	0,10000
EDTA	0,10000

Cationes	mg/L	meq/L	ppm	Metodo *	Propiedades	Valor	Unidades	Metodo *
Sodio Na <sup>+</sup>	14.179,24	633,87	14.377,75	5.3.28.4	pH	6,12		5.3.24.1
Calcio Ca <sup>++</sup>	441,10	22,06	435,01	5.3.8.3	Densidad (20°)	1,014	g/mL	5.3.8.3
Magnesio Mg <sup>++</sup>	121,50	9,99	119,82	5.3.18.4	Conductividad	.....	µmS/cm	5.3.13.1
Bario Ba <sup>++</sup>	18,00	0,26	17,75	5.3.4.3	Resistividad	.....	ohm/cm	5.3.13.1
Hierro FeT	56,10	2,01	55,33	5.3.16.1	TDS	38.530,22	mg/L	5.3.33.1
Potasio K <sup>+</sup>	0,00	0,00	0,00	5.3.26.3				
<b>Total Cationes</b>	<b>14.815,94</b>	<b>668,19</b>	<b>15.005,66</b>		<b>Otros Test</b>	<b>Valor</b>	<b>Unidades</b>	<b>Metodo *</b>
					CO <sub>2</sub>	NS	mg/L	5.3.9.1
					SH <sub>2</sub>	NS	mg/L	5.3.32.4
Aniones	mg/L	meq/L	ppm	Metodo *				
Cloruros Cl <sup>-</sup>	23.639,98	666,72	23.313,59	5.3.10.1	O <sub>2</sub>	NS	mg/L	5.3.23.1
Sulfatos SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	56,00	1,17	55,23	5.3.31.2	Dureza Total	1.603,33	mg/L CO <sub>2</sub> Ca	ASTM D-1126
<b>Alcalinidad</b>					Dureza Calcica	1.102,75	mg/L CO <sub>2</sub> Ca	ASTM D-1126
Bicarbonatos CO <sub>3</sub> H <sup>-</sup>	18,30	0,30	18,05	5.3.1.2	Alcalinidad pH 8.3	0,00	mg/L CO <sub>2</sub> Ca	5.3.1.2
Carbonatos CO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,00	0,00	0,00	5.3.1.2	Alcalinidad pH 4.5	15,00	mg/L CO <sub>2</sub> Ca	5.3.1.2
Hidroxilos OH <sup>-</sup>	0,00	0,00	0,00	5.3.1.2	Hidrocarburos	.....	mg/L	EPA 418.1
<b>Total Aniones</b>	<b>23.714,28</b>	<b>668,19</b>	<b>23.386,86</b>		Residual Inhibidor	.....	mg/L	

Fuente: Laboratorio PanAmerican Energy 2013

## Caracterización del Agua: Punto compresor B

REEMPLAZAR ÚNICAMENTE LAS CELDAS AMARILLAS CON LETRAS ROJAS  
NO REEMPLAZAR EN PLANILLA DE RESULTADOS

FORMULARIO DE REPORTE DE LABORATORIO  
API RP 45

Análisis solicitado por:	PANAMERICAN
Procedencia de la muestra	Punto Compresor B
Yacimiento:	Lindero Atravesado Occi.
Extraída por:	R. Alday
Fecha Extracción	06/06/2013
Hora de extracción	
Informe N°	
Fecha de Informe:	06/06/2013

Empresa	Yacimiento	Fecha	Hora	Muestreado por
PANAMERICAN	Lindero Atravesado Occi.	06/06/2013	00:00	R. ALDAY
No. Informe	Punto Muestreo	Pozo	Profund.	Fecha Informe
0	Punto Compresor B	---	---	06/06/2013

Observaciones: **POLIDUCTO 2**

DETERMINACION	Vol. gastado	Vol. muestra	F. Dilución	F. Reactivo
Cloruros	2,2	5,0	1,0	1,0000
Alcalinidad Fenolftaleína	0,0	100,0	1,0	1,0000
Alcalinidad Total	0,3	100,0	1,0	1,0000
Dureza Total	2,6	10,0	1,0	1,0000
Dureza Cálrica	2,1	10,0	1,0	1,0000

Cationes	mg/L	meq/L	ppm	Metodo *	Propiedades	Valor	Unidades	Metodo *					
Sodio Na <sup>+</sup>	7.771,27	343,31	7.833,44	5.3.28.4	pH	6,31		5.3.24.1					
Calcio Ca <sup>++</sup>	842,10	42,11	835,42	5.3.8.3	Densidad (20°)	1,008	g/mL	5.3.8.3					
Magnesio Mg <sup>++</sup>	121,50	9,99	120,54	5.3.18.4	Conductividad	.....	µmS/cm	5.3.13.1					
Bario Ba <sup>++</sup>	26,00	0,38	25,79	5.3.4.3	Resistividad	.....	ohm/cm	5.3.13.1					
Hierro FeT	74,10	2,65	73,51	5.3.16.1	TDS	22.991,47	mg/L	5.3.33.1					
Potasio K <sup>+</sup>	0,00	0,00	0,00	5.3.26.3									
<b>Total Cationes</b>	<b>8.834,97</b>	<b>398,44</b>	<b>8.888,70</b>		<b>Otros Test</b>	<b>Valor</b>	<b>Unidades</b>	<b>Metodo *</b>					
					CO <sub>2</sub>	NS	mg/L	5.3.9.1					
					SH <sub>2</sub>	NS	mg/L	5.3.32.4					
					O <sub>2</sub>	NS	mg/L	5.3.23.1					
					Dureza Total	2.605,83	mg/L CO <sub>2</sub> Ca	ASTM D-1126					
					Dureza Cálrica	2.105,25	mg/L CO <sub>2</sub> Ca	ASTM D-1126					
					Alcalinidad								
					Bicarbonatos CO <sub>3</sub> H	18,30	0,30	18,15	5.3.1.2	Alcalinidad pH 8.3	0,00	mg/L CO <sub>2</sub> Ca	5.3.1.2
					Carbonatos CO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	0,00	0,00	0,00	5.3.1.2	Alcalinidad pH 4.5	15,00	mg/L CO <sub>2</sub> Ca	5.3.1.2
					Hidroxilos OH <sup>-</sup>	0,00	0,00	0,00	5.3.1.2	Hidrocarburos	.....	mg/L	EPA 418.1
					<b>Total Aniones</b>	<b>14.156,50</b>	<b>398,44</b>	<b>14.044,15</b>		Residual Inhibidor	.....	mg/L	

Sulfatos	82,0
Hierro Total	74,100
Hierro Ferroso	0,000
Bario	26,000

Nitrato de Plata	0,90090
Acido Sulfúrico	0,10000
EDTA	0,10000

Lectura	0,000
Dilución	0,000
Potasio	0,000

Fuente: Laboratorio PanAmerican Energy 2013

## Caracterización del agua: Gasolinoducto

REEMPLAZAR ÚNICAMENTE LAS CELDAS AMARILLAS CON LETRAS ROJAS

NO REEMPLAZAR EN PLANILLA DE RESULTADOS

Análisis solicitado por:	Pan American Energy
Procedencia de la muestra	Gasolinoducto
Yacimiento:	LA
Extraída por:	R. Alday
Fecha Extracción	27/05/2013
Hora de extracción	
Informe N°	
Fecha de Informe:	27/05/2013

FORMULARIO DE REPORTE DE LABORATORIO

API RP 45

Empresa	Yacimiento	Fecha	Hora	Muestreado por
Pan American Energy	LA	27/05/2013	00:00	R. Alday
No. Informe	Punto Muestreo	Pozo	Profund.	Fecha Informe
0	Gasolinoducto	—	—	27/05/2013

DETERMINACION	Vol. gastado	Vol. muestra	F. Dilución	F. Reactivo
Cloruros	6,5	5,0	1,0	1,0000
Alcalinidad Fenolftaleína	0,0	100,0	1,0	1,0000
Alcalinidad Total	0,3	100,0	1,0	1,0000
Dureza Total	31,1	10,0	1,0	1,0000
Dureza Cálrica	27,6	10,0	1,0	1,0000

Sulfatos	141,0
Hierro Total	101,300
Hierro Ferroso	0,000
Bario	32,000

Lectura	0,000
Dilucion	0,000
Potasio	0,000

Nitrato de Plata	0,90090
ácido Sulfúrico	0,10000
IDTA	0,10000

Cationes	mg/L	meq/L	ppm	Metodo *	Propiedades	Valor	Unidades	Metodo *
Sodio Na <sup>+</sup>	10.249,62	547,09	11.356,57	5.3.28.4	pH	5,71		5.3.24.1
Calcio Ca <sup>++</sup>	11.067,60	553,38	9.988,81	5.3.8.3	Densidad (20°)	1,108	g/mL	5.3.8.3
Magnesio Mg <sup>++</sup>	850,50	69,94	767,60	5.3.18.4	Conductividad	.....	µmS/cm	5.3.13.1
Bario Ba <sup>++</sup>	32,00	0,47	28,88	5.3.4.3	Resistividad	.....	ohm/cm	5.3.13.1
Hierro Fe <sup>++</sup>	101,30	3,63	91,43	5.3.16.1	TDS	63.990,00	mg/L	5.3.33.1
Potasio K <sup>+</sup>	0,00	0,00	0,00	5.3.26.3				
<b>Total Cationes</b>	<b>22.301,02</b>	<b>1.174,51</b>	<b>22.233,29</b>		<b>Otros Test</b>	<b>Valor</b>	<b>Unidades</b>	<b>Metodo *</b>
					CO <sub>2</sub>	NS	mg/L	5.3.9.1
					SH <sub>2</sub>	NS	mg/L	5.3.32.4
					O <sub>2</sub>	NS	mg/L	5.3.23.1
Sulfatos SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	141,00	2,94	127,26	5.3.31.2	Dureza Total	31.173,06	mg/L CO <sub>2</sub> Ca	ASTM D-1126
<b>Alcalinidad</b>					Dureza Calrica	27.669,00	mg/L CO <sub>2</sub> Ca	ASTM D-1126
Bicarbonatos CO <sub>3</sub> H	18,30	0,30	16,52	5.3.1.2	Alcalinidad pH 8.3	0,00	mg/L CO <sub>2</sub> Ca	5.3.1.2
Carbonatos CO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,00	0,00	0,00	5.3.1.2	Alcalinidad pH 4.5	15,00	mg/L CO <sub>2</sub> Ca	5.3.1.2
Hidroxilos OH	0,00	0,00	0,00	5.3.1.2	Hidrocarburos	.....	mg/L	EPA 418.1
<b>Total Aniones</b>	<b>41.688,99</b>	<b>1.174,51</b>	<b>37.625,44</b>		Residual	.....	mg/L	

Fuente: Laboratorio PanAmerican Energy 2013

• Caracterización de Agua: Tanque 3

	
Título Documento	<b>INFORME FINAL</b>
Cod. IQ-12.04.01	
20/05/2010 Rev. 01	
<small>CAMPAMENTO 1 800 - CALLE 12 - PLAZA HÉRCULES - BAJOPLAZA - TEL. 0395 - 826200          PERDUE WAZAFI PARRA, P.P. 8 - CAÑELAS - R.D. PARAGUAY - TEL. 0395 - 8912697 / 8916228</small>	
<a href="mailto:Induslab@copelnet.com.ar">Induslab@copelnet.com.ar</a>	

**Protocolo Nº 21923**

IQ-12.01

<b>Punto de Extracción:</b>	<b>TK 3 ORIENTAL</b>		
Fecha de Recepción:	08/06/2014	Muestra de:	AGUA
Fecha de Informe:	08/06/2014	Solicita:	Pan American Energy LLC
Objetivo:	SEGÚN SOLICITUD	Extrae:	Pan American Energy LLC

DETERMINACIONES	UNIDAD	RESULTADO	METODO
pH	—	5,78	S.M.4500 H - B
TEMPERATURA	°C	17,60	S.M.4500 H - B
DENSIDAD a 17,6°C	g/cm <sup>3</sup>	1,062	ASTM D - 1429
CONDUCTIVIDAD a 25 °C	µS/cm	113100,0	S.M. 2510 - B
RESISTIVIDAD a 25 °C	Ω/m	0,088	Calculado
SH <sub>2</sub>	mg/lit.	1,00	S.M. 4500 S - E
CO <sub>2</sub>	mg/lit.	176,00	S.M. 4500 CO2
CLORUROS	mg/lit.	51000,00	S.M. 4500 Cl - B
SULFATOS	mg/lit.	115,00	S.M. 4500 SO4 - E
CARBONATOS	mg/lit.	0,00	S.M. 2320 B
BICARBONATOS	mg/lit.	292,80	S.M. 2320 B
CALCIO	mg/lit.	8176,30	S.M. 3500 Ca - D
MAGNESIO	mg/lit.	1361,40	S.M. 3500 Mg - E
SODIO	mg/lit.	20856,60	Calculado
HIERRO TOTAL	mg/lit.	52,50	S.M. 3500 Fe - D
BARIO	mg/lit.	0,00	S.M. 3500 Ba - C
POTASIO	mg/lit.	714,00	S.M. 3500 K - B
TOTAL SOLIDOS DISUELTOS (CALC.)	mg/lit.	82568,60	Calculado
DUREZA TOTAL (CO <sub>2</sub> Ca)	mg/lit.	26000,00	ASTM D 1125
DUREZA CALCICA (CO <sub>2</sub> Ca)	mg/lit.	20440,8	Calculado
DUREZA MAGNESICA (CO <sub>2</sub> Ca)	mg/lit.	5581,7	Calculado
ALCALINIDAD a pH 4.5	mg/lit.	240,1	Calculado

Fuente: Laboratorio Induslab 2014

## ANEXO II

### Interpretación lectura de siembra- caldos BRS

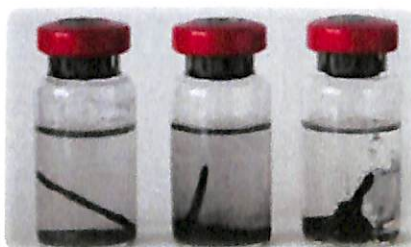
En este instructivo se podrá considerar para el conteo de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR).

La necesidad del mismo surge por los problemas que a diario se presentan y confunden una lectura correcta de los caldos de cultivo BRS sembrados.

A continuación, se plantean algunas preguntas habituales y se dan sus respuestas con algunas fotografías para graficar mejor cada situación.

#### 1. ¿Cuándo es considerado un resultado POSITIVO en la lectura del caldo?

Se considerarán resultados POSITIVOS cuando al realizar la lectura en los caldos se observe en los mismos un precipitado negro grosero, que se adhiere a las paredes del frasco o al clavo, debido a la formación de un biofilm. Esto es a consecuencia que las BSR producen ácido sulfhídrico ( $\text{SH}_2$ ), el cual reacciona con el hierro (Fe) presente en el medio de cultivo, dando como resultado sulfuro de hierro, (SFe) de color francamente negro. Tal se puede observar en la figura 35.

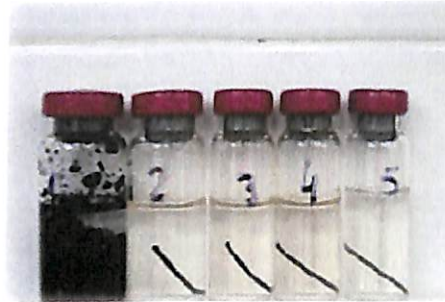


Fuente: Elaboración propia 2015

**Figura 35:** Ejemplo de viales positivos.

#### 2. ¿Cuándo es considerado un resultado NEGATIVO en la lectura del caldo?

Se considerarán resultados NEGATIVOS cuando los viales no presenten un precipitado negro grosero. Cuando se agita el líquido permanece de un color transparente, pudiendo aparecer ciertas partículas negras en suspensión, las que no tiñen el medio de cultivo, ver figura 36.



Fuente: Aroca, R., 2008

**Figura 36:** Lectura: 1 caldo positivo (10 BRS/ml).

3. ¿La turbidez presente en los caldos qué indica? ¿Cómo considerar la lectura en éste caso?

La turbidez puede aparecer en los caldos como tal o acompañada de un color grisáceo. Esto es debido a la existencia de otros géneros de bacterias, que no son BSR, que pueden desarrollarse en este medio. La lectura es negativa para BSR, ver figura 37.



Fuente: Aroca, R., 2008

**Figura 37:** El 4 vial presenta turbidez, pero no debido a la presencia de BRS. Lectura 2 caldos positivos (102 BRS/ml).

4. Si se observa en los viales una coloración amarilla ¿cómo interpreto la lectura en esta situación?

El color amarillo presente en los medios se debe a la oxidación de los mismos. Esto refleja que se ha incorporado oxígeno y las BSR no pueden crecer en esta condición del medio de cultivo (ver figura 38).

En el caso que después del vial oxidado no hubiese viales positivos, el vial

oxidado no debería considerarse como positivo porque es dudoso (ver figura 39).



Fuente: Aroca, R., 2008

**Figura 38:** Lectura: 3 caldos positivos (103 BRS/ml)



Fuente: Aroca, R., 2008

**Figura 39:** Lectura: 3 caldos positivos (103 BRS/ml).

5. ¿Cómo considerar la lectura si el 1er y/o 2do vial son negativos y los sucesivos son claramente positivos?

Se toma como vial positivo hasta el último caldo que presente un precipitado negro grosero, que se adhiere a las paredes del frasco (ver figura 40).

La presencia de viales negativos al comienzo de una serie de caldos, seguidos de caldos claramente positivos, es debido a que quedan restos de bactericidas en los primeros, y no permiten el desarrollo bacteriano (ver figura 41).



Fuente: Aroca, R., 2008

**Figura 40:** Lectura: 2 caldos positivos (102 BRS/ml).

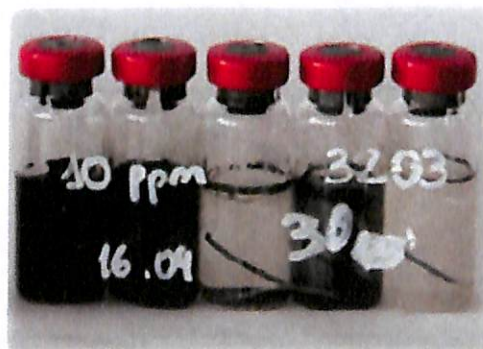


Fuente: Aroca, R., 2008

**Figura 41:** Lectura: 3 caldos positivos (103 BRS/ml).

6. ¿Cómo considerar la lectura si hay viales negativos en medio de viales positivos?

Se toma como positivo hasta el último vial que presente un precipitado negro grosero que se adhiera a las paredes del frasco (ver figura 42).



Fuente: Aroca, R., 2008

**Figura 42:** Lectura: 4 caldos positivos (104 BRS/ml).



## 7. ¿Qué sucede si todos los caldos inoculados se oxidan?

Si todos los caldos inoculados se oxidan la lectura es dudosa, ya que no se sabe si los viales son negativos debido a la ausencia de BSR ó que éstas no pudieron crecer por las condiciones oxidadas del medio de cultivo, por lo que se recomienda volver a repetir la siembra (ver figura 43).



Fuente: Aroca, R., 2008

**Figura 43:** Ejemplo de caldos oxidados luego de la inoculación. Lectura: No considerar. Repetir muestreo.

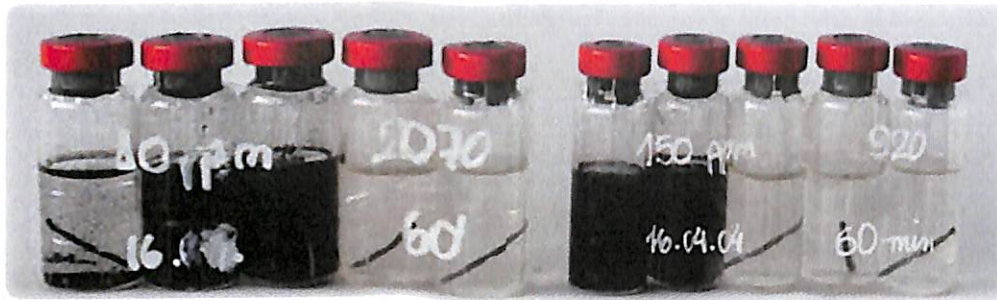
## 8. ¿Si existen caldos dudosos en una serie, ¿cómo realizar la lectura?

Al igual que en otros casos el criterio a considerar es que se toma como positivo hasta el último vial que presente un precipitado negro grueso que se adhiera a las paredes del frasco. Si existen viales dudosos se procederá a agitarlos y se observará si el líquido se tiñe de negro, considerándose así positivo o no, según el caso (ver figura 44 y 45).



Fuente: Aroca, R., 2008

**Figura 44:** Caldos dudosos antes de la agitación (arriba) y después de la agitación (abajo).



Fuente: Aroca, R., 2008

**Figura 45:** Lectura (izquierda): 3 caldos positivos (103 BRS/ml); Lectura (derecha): 2 caldos Positivos (102 BRS/ml).

Se considerarán viales o caldos POSITIVOS aquellos que presenten un precipitado negro grosero y/o los que tengan un biofilm adherido al vidrio o al clavo. Esto es debido a la producción de ácido sulfhídrico a partir de las BSR, el cual reacciona con el hierro presente en el medio, dando sulfuro de hierro.

En caso de viales dudosos, agitarlos y si la solución se tiñe de negro considerar POSITIVO. Si el líquido permanece de un color transparente o sólo se observan ciertas partículas en suspensión sin teñir el medio, considerar NEGATIVO.

Cuando aparecen caldos oxidados su interpretación depende de la posición: si le siguen caldos positivos, se cuenta como positivo. En el caso que no le sigan caldos positivos el resultado es dudoso; por lo que se recomienda volver a repetir la siembra.

### ANEXO III

En las siguientes tablas X, XI, XII, XIII, se puede observar el crecimiento de las Bacterias Sulfato Reductoras dentro de los Caldos BRS según los días de inoculación y según el tipo y dosis de producto inoculado.

En cada casilla de cruce se ubica el resultado de la lectura de caldos que arrojó cada inoculación luego de los 21 días. Aquellas casillas que poseen el número en color rojo, se debe a que no cumple los requerimientos establecidos por la operadora en su programa de monitoreo para la cantidad máxima de Bacterias Sulfato Reductoras aceptadas en el Yacimiento.

**Tabla X:** Inoculación de caldos BRS- Punto Compresor B.

YACIMIENTO LINDERO ATRAVEZADO																							
Ensayo de Kill Test - Agua de producción- Línea de conducción_ Ing. Pto. B																							
Bacterias Sulfato Reductoras																							
Productos ensayados	Fecha de inoculación	Dosis (ppm)	Días de Inoculación																				
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Blanco	10/04/15	0	0	1	1	2	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
Bactron L-133	10/04/15	10	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	
		30	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3
		50	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bactron L-95	10/04/15	10	0	0	0	0	1	1	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	
		30	0	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3
		50	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bactron L-54	10/04/15	10	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	4	4	4	4	
		30	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3
		50	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bactron L-1032	10/04/15	10	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	
		30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Indica la cantidad de caldos reaccionados

Fuente: Elaboración propia 2015

**Tabla XI: Inoculación de caldos BRS- Punto Compresor C**

YACIMIENTO LINDERO ATRAVEZADO																						
Ensayo de Kill Test - Agua de producción- Línea de conducción_ Ing. Pto. C																						
Bacterias Sulfato Reductoras																						
Productos ensayados	Fecha de inoculación	Dosis (ppm)	Días de Inoculación																			
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Blanco	10/04/15	0	0	1	1	2	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5
Bactron L-133	10/04/15	10	0	1	1	2	2	2	3	3	3	3	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5
		30	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3
		50	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bactron L-95	10/04/15	10	0	1	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4
		30	0	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3
		50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bactron L-54	10/04/15	10	0	1	1	2	2	2	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5
		30	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3
		50	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bactron L-1032	10/04/15	10	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	4	4	4
		30	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2
		50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Indica la cantidad de caldos reaccionados

Fuente: Elaboración propia 2015

**Tabla XII: Inoculación de caldos BRS- Gasolinoducto**

YACIMIENTO LINDERO ATRAVEZADO																							
Ensayo de Kill Test - Agua de producción- Línea de Gasolinoducto.																							
Bacterias Sulfato Reductoras																							
Productos ensayados	Fecha de inoculación	Dosis (ppm)	Días de Inoculación																				
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Blanco	10/04/15	0	0	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3	4	4	4	4	4	5	5	5	5	
Bactron L-133	10/04/15	10	0	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3	4	4	4	4	4	5	5	5	5	
		30	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	4	4	4	4
		50	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	3	3	3	3
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bactron L-95	10/04/15	10	0	1	1	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	
		30	0	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3
		50	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bactron L-54	10/04/15	10	0	1	1	2	2	2	2	2	3	3	3	3	4	4	4	4	5	5	5	5	
		30	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3
		50	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bactron L-1032	10/04/15	10	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	4	4	4	4
		30	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2
		50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Indica la cantidad de caldos reaccionados

Fuente: Elaboración propia 2015

Tabla XIII: Inoculación de caldos BRS- Tanque 3

YACIMIENTO LINDERO ATRAVEZADO																							
Ensayo de Kill Test - Agua de producción- Grifo 2- TK 3_Oriental.																							
Bacterias Sulfato Reductoras																							
Productos ensayados	Fecha de inoculación	Dosis (ppm)	Días de Inoculación																				
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Blanco	10/04/15	0	0	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5
Bactron L-133	10/04/15	10	0	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5
		30	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3
		50	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bactron L-95	10/04/15	10	0	1	1	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4
		30	0	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3
		50	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bactron L-54	10/04/15	10	0	1	1	2	2	2	2	2	3	3	3	3	4	4	4	4	5	5	5	5	5
		30	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3
		50	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bactron L-1032	10/04/15	10	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	4	4	4	4
		30	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2
		50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Indica la cantidad de caldos reaccionados

Fuente: Elaboración propia 2015

En la tabla XIV se puede observar el resultado del Time Kill Test según el punto de aplicación, el biocida utilizado y las dosis de inoculación seleccionadas. En sus columnas se observan los puntos de muestreo seleccionados, y en sus filas se pueden observar los biocidas ensayados a diferentes dosis.

Tabla XIV: Resultados del Time Kill Test

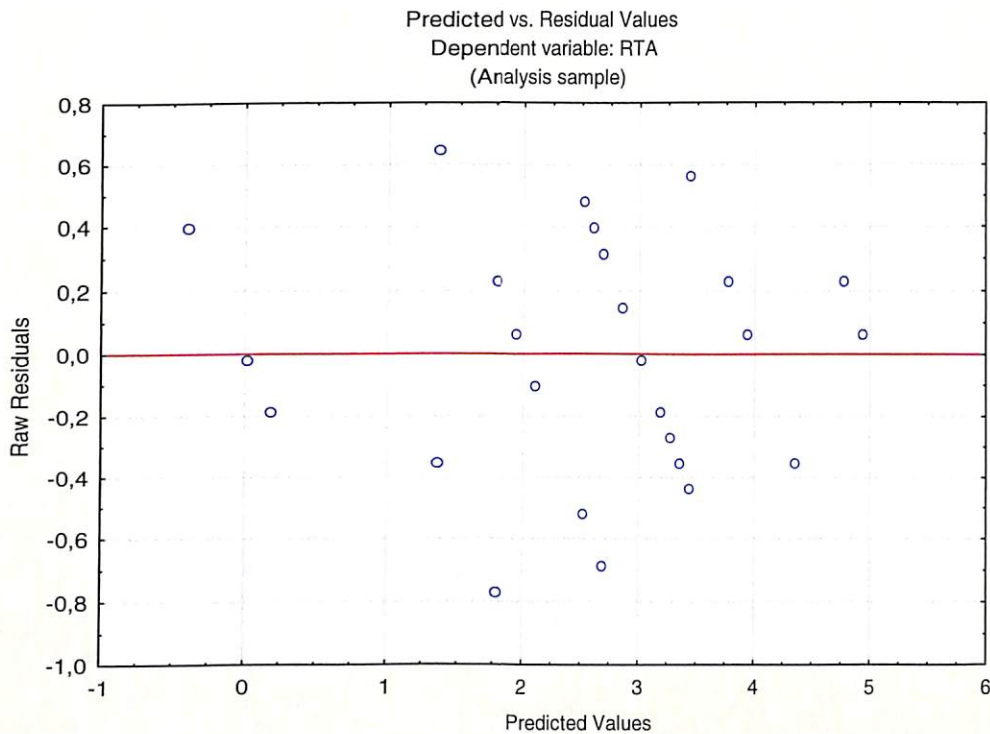
Yacimiento Lindero Atravesado- Ensayo Time Kill test- 10/04/15					
		Occidental			Oriental
Producto	Dosis (ppm)	Punto B	Punto C	Gasolinoducto	Tanque 3
Blanco	-	4	5	5	5
Bactron L-133	10	4	5	5	5
	30	3	3	4	3
	50	2	2	3	3
	100	0	0	0	0
Bactron L-95	10	3	4	4	4
	30	3	3	3	3
	50	2	1	2	2
	100	0	0	0	0
Bactron L-54	10	4	5	5	5
	30	3	3	3	3
	50	2	3	2	3
	100	0	0	0	0
Bactron L-1032	10	3	4	4	4
	30	1	2	2	2
	50	0	0	0	0
	100	0	0	0	0

Fuente: Elaboración propia 2015

## ANEXO IV

### Verificación de supuestos:

Para verificar el supuesto de aleatoriedad y homogeneidad de varianzas se observa la figura 46 de Residuales versus Predichos. En este gráfico no se observan tendencias. De todas maneras, se utilizó la prueba de Levene para corroborar homogeneidad de varianzas (ver tablas XV, tabla XVI y tabla XVII).



Fuente: Elaboración propia 2015

**Figura 46:** Gráfico de Residuales versus Predichos para la variable de respuesta.

**Tabla XV:** Prueba de homogeneidad de varianzas (Levene) para el Factor Biocida

Levene's Test for Homogeneity of Variances (ensayos)				
Effect: BIOCIDA				
Degrees of freedom for all F's: 3, 44				
	MS Effect	MS Error	F	p
RTA	0,895062	0,390783	2,290433	0,091422

Fuente: Elaboración propia 2015



**Tabla XVI:** Prueba de homogeneidad de varianzas (Levene) para el Factor Dosis

Levene's Test for Homogeneity of Variances (ensayos)				
Effect: DOSIS				
Degrees of freedom for all F's: 2, 45				
	MS Effect	MS Error	F	p
RTA	0,862305	0,234353	3,679507	0,033111

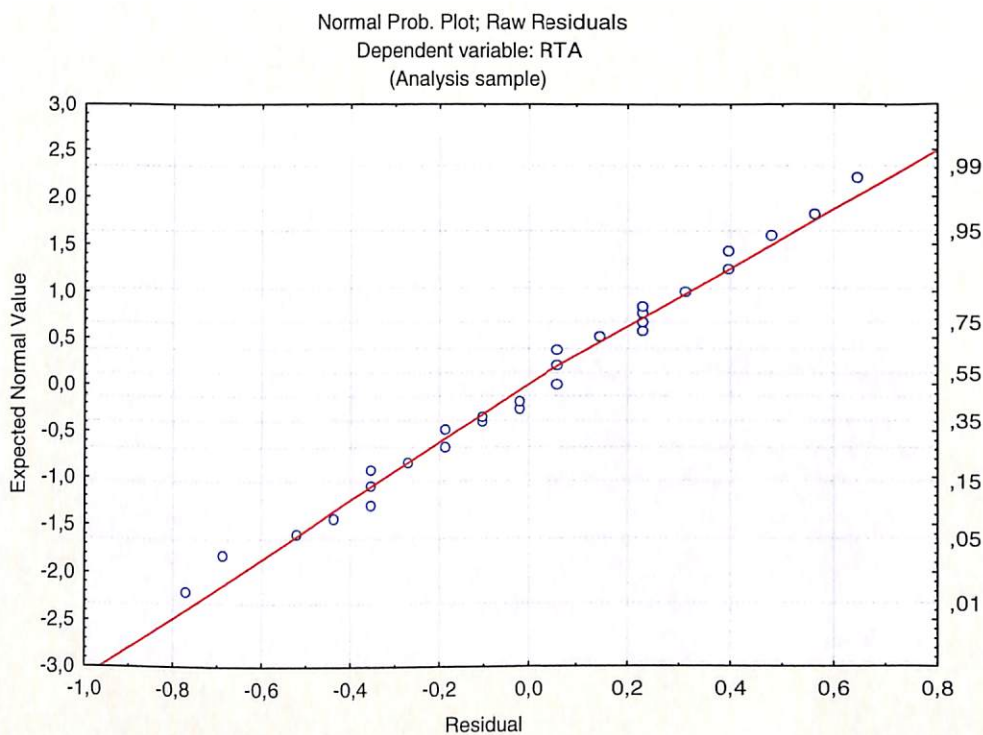
Fuente: Elaboración propia 2015

**Tabla XVII:** Prueba de homogeneidad de varianzas (Levene) para el Bloque

Levene's Test for Homogeneity of Variances (ensayos)				
Effect: "PUNTO MUESTREO"				
Degrees of freedom for all F's: 3, 44				
	MS Effect	MS Error	F	p
RTA	0,122492	0,765941	0,159924	0,922710

Fuente: Elaboración propia 2015

Para analizar el supuesto de Normalidad se muestra el gráfico Q-Q plot en el cual se observa una buena alineación de los puntos (ver figura 47)



Fuente: Elaboración propia 2015

**Figura 47:** Gráfico de probabilidad normal

Los resultados de la prueba de normalidad Chi cuadrado realizada sobre los residuales no rechaza la hipótesis ( $p=0,23568$ ) por lo cual se considera que son normales.

## 7. BIBLIOGRAFIA

---

- BEECH, I.B & C. C. GAYLARDE., 1999.- Recent advances in the study of biocorrosión– an overview. Revista de microbiología. 30: 177-190 pp.
- CHAMBLESS, J. D, S. M. HUNT & P. S. STEWART., 2006.- A Three-Dimensional Computer Model of Four Hypothetical Mechanisms Protecting Biofilm from Antimicrobials. Applied and environmental microbiology. 72 (3):2005-2013 pp.
- COSTERTON, J. W & E. S. LASHEN., 1984.- Influence of biofilm on efficacy of biocides on corrosion-causing bacteria. Materials performance. 23: 7-34 pp.
- DIGÓN, A., 2013.-Químicos prohibidos y restringidos en Argentina. 1er edición. Buenos Aires. Ministerio de Salud de la Nación.
- DOUGLAS, A. S., 2004.- Fundamentos de química analítica. Editorial Thomson.8ª edición.
- ENDEAN, H. J., 1989. - Detección y control de corrosión en campos petroleros. Champion Technologies. 1-6 pp.
- ENDEAN, H. J & R. D. SHELTON., 1991. -Problemas iniciados por el agua en las operaciones de producción. Champion Technologies. 1-32, 97-98 pp.
- FERRER, J. A, J. IRISARRI & J. M. MENDÍA., 2006. Suelos de la Provincia del Neuquén. Ed. INTA. Buenos Aires. 226pp.
- FIGUEROA DE GIL, Y, Y. BRUZUAL, G. LÓPEZ DE GÓMEZ, C. RODRÍGUEZ, J. L. PRIN & N. BRAVO., 2012. - Evaluación de la eficiencia de biocida como inhibidor de la corrosión inducida por microorganismos. Rev. Latín Am. Metal. Mat. 5:8-11 pp.
- Glutaraldehyde.[www.inchem.org/documents/sids/sids/111308.pdf](http://www.inchem.org/documents/sids/sids/111308.pdf).Noviembre 2015.
- GUIAMET, P. S & S. G. GÓMEZ DE SARAIVIA., 2003. - Inhibición de la

adherencia bacteriana a superficies metálicas por cubiertas de origen biológico. Publicación Técnica y Didáctica 43: 1-8 pp.

- JHOBALIA, C. M, A. HU, T.GU & S. NESIC., 2005. -Biochemical Engineering approaches to MIC. Institute for Corrosion and Multiphase technology, Ohio University Athens. Corrosion. Paper 5500.
- LEY 2.774., 2011. Poder legislativo. Provincia de Neuquén. República Argentina.
- MADIGAN, M. T, J. M. MARTINKO & J. PARKER., 2003.- Brock. Biología de los microorganismos. Editorial Pearson, Southern Illinois, USA.
- MARTÍNEZ CARRETERO, E., 2013. - La Diagonal Árida Argentina: entidad Bioclimática. Rehabilitación y restauración en la Diagonal Árida de la Argentina. 14-31pp.
- MONTGOMERY, D., (1991). - Diseño y análisis de experimentos. México: Grupo Editorial Iberoamericano S.A.
- MORTON, L. H. G, D. L. A. GREENWAY, C. C. GAYLARDE & S. B. SURMAN., 1998. - Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. International Biodeterioration& Biodegradation 41: 247-259 pp.
- NACE., 1994. - Field monitoring bacterial growth in Oil and gas systems. Standard test method. Item n° 22240.
- Ordenanza 8.320/98., 1998. - Municipio de Neuquén. Provincia de Neuquén.Cap. V.
- PATTON, C. C., 1986. - Applied Water Technology.
- POSGATE, J.R., 1979. – The sulphate reducing bacteria. Cambridge University Press. Cambridge.
- SAND, W., 1997. - Microbial Mechanisms of Deterioration of Inorganic

Substrates – A General mechanistic Overview. International Biodeterioration & Biodegradation. 40: 183-190 pp.

- SDS Bactron L-54., 2013. - Champion Technologies, Version 3.1.
- SDS Bactron L-95., 2013. - Champion Technologies, Version 3.1.
- SDS Bactron L-133., 2013. - Champion Technologies, Version 3.1.
- SDS Bactron L-1032., 2013. - Champion Technologies, Version 3.
- (Tetrakis (hydroxymethyl) phosphonium sulfate Chemistry Document. US EPA. EPA-HQ-OPP2011-0067. 2011.
- VIDELA, H. A., 1996. - Manual de Biocorrosión. Departamento de Ing. Química. Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional La Plata.
- VIDELA, H. A. & L. K. HERRERA., 2005. -Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. International Microbiology. 8:169-180 pp.
- VIDELA, H. A. & L. K. HERRERA., 2009. -Understanding microbial inhibition of corrosion. A comprehensive overview. International Biodeterioration & Biodegradation. 896–900 pp.
- VIDELA, H. A. & R. C. SALVAREZZA., 1984. –Introducción a la corrosión microbiana. Librería agropecuaria. Argentina.
- WILLIAMS, T. M & L. E. COOPER., 2014. - The Environmental Fate of Oil and Gas Biocides: A Review. Dow Microbial Control. Congreso Corrosión 2014. Paper n° 3876.