

ANALISIS MICROBIOLOGICO EN AGUAS DE INYECCION

(Informe preliminar)

MARÍA JOSEFA RIGONE DE PRITZ y RAMÓN E. SOLANES¹

SUMMARY

This study was made in order to determine oxidation bacteria e.g. those called iron and sulfur bacteria, as well as sulfate reducing bacteria, in flooding waters. The results were negative, for this type of bacteria, in samples taken in Agrelo, Dept. of Luján, Mendoza.

The results of the qualitative examinations of the waters as well as the number of material and microorganisms observed, are given.

Finally a weekly count of the total number of microorganisms from samples taken in the afore mentioned zone, is made.

The results obtained up to the present are reported, but it will be necessary to have the results of at least 18 months, of recounts, in order to obtain conclusions.

A test of the action of bactericides over the total microflora is at present being carried on.

I — INTRODUCCION

La Divisional Mendoza de YPF solicitó a esta Cátedra, en octubre de 1969, el análisis microbiológico de una muestra de agua de inyección para recuperación secundaria en pozos petrolíferos. Dicha muestra presentaba abundante depósito de color ocre. Se nos informó que existían problemas de corrosión y taponamiento en los pozos y que en análisis anteriores se había diagnosticado la presencia de bacterias del género *Desulfovibrio*. En consecuencia, nuestras determinaciones se orientaron a la búsqueda de bacterias que puedan causar corrosión, o sea las bacterias del hierro y del azufre, además de las reductoras de sulfato como son las del género *Desulfovibrio*. Durante varios meses insistimos con dichas determinaciones, variando técnicas y medios de cultivo.

Solicitamos a YPF mayor número de muestras y se tomaron (con nuestra intervención prácticamente a todo lo largo del trayecto que recorre el agua: desde el pozo productor, hasta el pozo de inyección. En especial, se extrajeron en el tanque existente a unos 15 km. del pozo productor (Agrelo), donde se tomaron en profundidad, en superficie y también del raspaje de la superficie interna del mismo.

Se obtuvo desarrollo de *Desulfovibrio* y de bacterias del Hierro, del tipo *Ferrobacillus* (absolutamente autotrofas), pero no significativo. En ningún caso hubo desarrollo de bacterias oxidantes del azufre. Estas tres categorías son las altamente corrosivas.

Descartada la existencia de esos tipos de bacterias, como agentes de corrosión, y el taponamiento posterior causado por el material desprendido, nuestro trabajo se orientó hacia la posibilidad de que el número total de microorganismos o bien la calidad de estos (como pueden ser los productores de mucus serían las causas directas del taponamiento.

Se hizo análisis del material en suspensión (especialmente del tanque) que resultó constituido por materia inerte (donde había restos de vegetales superiores) algas y protozoos (especialmente flagelados e infusorios).

A continuación y por el método clásico de las diluciones, se procedió al recuento periódico del número de microorganismos. Se identificaron las bacterias más frecuentes y se efectuó un ensayo de las influencias de distintos bactericidas sobre el número total de las mismas.

II — ANTECEDENTES

HAWKER (1) y colaboradores, establecen que las aguas de surgentes y de pozos artesianos, están relativamente libres de microorganismos, debido a la filtración que las mismas sufren a través de las rocas. No obstante, nunca están completa o prácticamente libres de microbios.

El recorrido le largos tramos o el almacenamiento, da lugar a un aumento considerable del número inicial, antes que dichas aguas sean usadas para fines específicos.

La polución o contaminación de las aguas empieza con la Revolución Industrial —OSTROF A. G. (2)— y de allí el esfuerzo por estandarizar métodos para el análisis de las mismas (3) (4) y la sanción de leyes, no ya locales sino de carácter federal que enfrentan dicho problema en los Estados Unidos (1948).

En consecuencia, los métodos de análisis se han orientado en primer lugar, hacia el problema higiénico que plantea la polución para el aprovisionamiento de agua potable y, secundariamente hacia problemas industriales de muy diversa naturaleza, pero en especial al de eliminación de aguas residuales.

En la industria petrolera, el problema de las aguas de inyección recibió también particular estudio, por parte del Instituto Americano

del Petróleo, y todo lo referente al análisis biológico de las mismas está contenido en el manual de métodos recomendados por el organismo citado (5).

Los métodos recomendables, para grupos especiales como las bacterias del hierro y las bacterias reductoras de sulfatos, están también standardizados por la Sociedad Americana de Ensayo de Materiales (6). Para la determinación de especies son útiles, entre otras publicaciones, el clásico Manual de BERGEY (7) y la Guía de SKERMAN (8). Estos grupos bacterianos han sido objeto de particular estudio por parte de FRED y WAKSMAN (9).

Por lo que se refiere a bacterias corrosivas anaerobias, es el género *Desulfovibrio*, bacteria reductora de sulfatos, a los que usa como aceptor de electrones cedidos por materia orgánica, la responsable de corrosiones más difundida y temible en las aguas de inyección (10) (11) (12).

Especialistas en Microbiología del Petróleo, han realizado experiencias de laboratorio y posteriormente de campo, inoculando determinadas especies bacterianas, para fluidificar el petróleo. Se han usado *Desulfovibrio*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, etc. Se partió de la base de que los gases producidos por fermentación, como en el caso de *Clostridium* o por respiración anaeróbica, como en *Desulfovibrio* y *Pseudomonas*, así como los ácidos del metabolismo, provocarían dicho efecto. Trabajos de laboratorio fueron realizados por ROSENFELD (1947), ZO BELL (1948), UPDEGRAFF and WREN (1954), LA RIVIERE (1955), DOSTALEK (1957), entre otros citados por DAVIS en pág. 265 (11). En trabajos de campo (DOSTALEK y col. citado por DAVIS) realizados en Checoslovaquia, con *Desulfovibrio* se concluye que: 1 - No hubo modificación en la producción de petróleo. 2 - No hubo producción de cantidades apreciables de gas. 3 - No hubo producción de ácidos que llegaran a causar disolución de las rocas.

En ensayos posteriores en otros tipos de yacimientos, se obtuvo un máximo de producción de petróleo, coincidente con el máximo de multiplicación bacteriana 10^8 a partir del cual comienza una caída en la producción, lo cual indicaría efecto adverso de las bacterias a partir de dicho número. Siempre se trabajó en yacimientos de alta permeabilidad; pero como indica DAVIS (11), el temor a la corrosión impide recomendar estas prácticas.

Este texto de DAVIS, detalla otros trabajos en la Unión Soviética y Estados Unidos, cuyos resultados no son lo suficientemente ilustrativos, debido a las muy distintas características de los yacimientos y la composición de los respectivos petróleos.

Este informe preliminar, adolece de la escasa información bibliográfica, en su mayoría suministrada por YPF a quien los autores agradecen profundamente, y se obligan a profundizarla, dado que se trata de un campo de la Microbiología, el del Petróleo, en el que nunca habían incursionado.

III — OBJETO DEL TRABAJO

El presente trabajo, tiene por objeto determinar en aguas de inyección, para recuperación secundaria, de pozos petrolíferos, del departamento de Luján, Mendoza, la presencia de microorganismos que producen corrosión en cañerías y recipientes de almacenamiento. También se trata la determinación de causas de taponamiento, que en muchos casos es ocasionado por el mismo material de corrosión arrastrado por las aguas.

Otra finalidad de este trabajo es el recuento del número total de microorganismos, en dichas aguas de inyección, dado que en la flora total hay siempre bacterias productoras de mucus: *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, etc., que por sí mismas son causa de taponamiento.

Además se prueba la eficacia de microbicidas usuales en la industria petrolera, frente a la flora microbiana total, y a cepas microbianas determinadas en particular.

Por consiguiente, el trabajo consta de las siguientes partes:

- 1 — Presencia de bacterias de la corrosión y taponamiento.
- 2 — Determinación del número total de microorganismos.
- 3 — Acción de bactericidas.

IV — MATERIAL Y METODOS

1 — Examen microbiano de las aguas en preparados microscópicos

En las muestras examinadas, especialmente en el tanque y en una represa, se determinó por examen microscópico directo las siguientes especies de:

a) Algas:

Oscillatoria, bastante frecuente y muy abundante en la represa.

Diatomeas.

Closterium.

b) Protozoos:

Paramecios.

Flagelados.

c) Bacterias.

2 — Examen bacteriológico mediante cultivo

A — Bacterias del Hierro

Si bien el examen microscópico no reveló la presencia de bacterias filamentosas, tipo *Sphaerotilus* o *Gallionella*, para cuya determinación

se siguieron las normas ASTM - D 932 - 58 (6), se consideró oportuno efectuar un enriquecimiento de bacterias del hierro, estrictamente autotrofas, para lo cual usamos medios de cultivo según FRED y WAKSMAN (9) en el N° 74 de dicho manual con pH modificados entre 4 y 6.

Además para enriquecer con respecto a probables bacterias filamentosas del hierro, no autotrofas, sino depositantes de hierro se usó el medio 101 del manual de los autores precitados, que lleva citrato amónico férrico.

En el caso de bacterias oxidantes del hierro, se obtuvo resultado positivo en solo uno de los múltiples y repetidos enriquecimientos practicados.

En el caso de bacterias depositantes de hierro, hubo resultado positivo en tres muestras; en una de ellas se trataba de *Rhodotorula*.

También se usó el medio 76 de dichos autores, donde se reemplazó el carbonato ferroso por cloruro ferroso, pero no hubo desarrollo en absoluto. La incubación se hizo en todos los casos a 17° C, 25° C y 30° C.

B - Bacterias del Azufre

Para las bacterias oxidantes, se usaron los medios para autotrofos estrictos al tiosulfato y al azufre - fosfato (3).

Las temperaturas de incubación fueron las mismas que para las del hierro.

Para enriquecer con respecto a probables bacterias del azufre con capacidad para respiración anaeróbica, se usó el medio de Trautwein (9), al tiosulfato - nitrato, en este caso el cultivo se hizo en condiciones anaeróbicas y las temperaturas que se usaron fueron también de 17° C, 25° C y 30° C.

En ningún caso se obtuvo un desarrollo significativo, ni hubo reducción de pH, o desaparición de tiosulfato en forma significativa.

C - Bacterias reductoras de sulfatos

Para enriquecimiento de estas bacterias, que reducen sulfatos, usando como dadores de electrones sustancia orgánica, se usó el medio al lactato de sodio provisto de YE y ácido ascórbico, adosado de las sales usuales, que recomienda el Instituto Americano del Petróleo y que está contenido en API-RP-38 (5).

Este medio se usó en condiciones anaeróbicas, en sólido y líquido a temperatura de 30° C. La técnica de siembra y diluciones sucesivas, fueron también las preconizadas en la publicación citada y el tiempo de incubación hasta 30 días.

También se usaron el medio de Baar y el medio de Starkey (detallados por Skerman (8) ambos al lactato de sodio, pero que difieren

en cuanto a la composición de los minerales con resultados similares al A.P.I.

En un solo caso de las múltiples determinaciones, hubo enriquecimientos de esta bacteria, que se manifiesta por un ennegrecimiento y olor a sulfídrico característico. Resultando en consecuencia no significativo.

Hay que hacer constar además, que ninguna de las muestras tomadas tenía un aspecto u olor que sugiriera la presencia de estas bacterias.

D — Recuento del número total de bacterias

Para el recuento del número total, se usó el método "pour plate" con el TGE agar como medio de cultivo.

Dicho medio contiene triptona, extracto de carne y dextrosa con pH ajustado a 7. Es el recomendado por el API (5).

Siempre se incubó a 30° C, ya que la experiencia se lleva a cabo a lo largo de todo el año, con toma de muestras semanales y se tiene el conocimiento de que las temperaturas del agua oscilan entre los 16° C en invierno y los 25° C en verano aproximadamente.

Las diluciones que se usaron al iniciar el trabajo, oscilaron entre 1:10 y 1:10.000. Con posterioridad y por el análisis de los resultados, se trabajó únicamente con las diluciones 1:100 y 1:1.000.

Se procedió a tomar 1 cc. de la muestra original, en cuanto llegó al laboratorio, se la diluyó en 9 cc. de agua estéril, se homogeneizó en Vortex y se hicieron diluciones progresivas en serie.

Siempre se homogeneizó antes de verter en caja el ml., al cual se le agregó el medio nutritivo.

Después de incorporar la muestra al nutriente mediante agitación rotatoria manual suave, se dejó gelificar y luego se incubó. Siguiendo exactamente la técnica anteriormente descrita, pero usando 9 cc. de un buffer de fosfato pH 6.8 se hizo otra serie de diluciones para determinar una probable influencia negativa del agua destilada.

El tiempo de incubación fue de 72 horas, y el conteo se efectuó con auxilio de lupa que magnifica hasta 2.5 veces, y está provista de iluminación especial.

Las colonias predominantes fueron de *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, etc.

V — ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

En el tiempo que los autores llevan estudiando los problemas de obstrucción de reservorios por microorganismos, que afectan el programa de recuperación secundaria de YPF en la zona de Agrelo, han debido enfrentarse con diversas dificultades derivadas principalmente

de la falta de experiencia en ese tipo de problemas y la escasa información disponible al respecto.

Los primeros ensayos realizados, como se dijo anteriormente, estuvieron destinados a detectar la presencia de bacterias sulforeductoras, que según análisis efectuados por orden de YPF, parecían ser las causantes del taponamiento de las formaciones. Descartada esta posibilidad después de muchos análisis, nuestra atención se centró sobre la cantidad total de microorganismos que arrastraban las aguas. Los primeros recuentos revelaron un alarmante número de bacterias (3 a 5 millones por ml.).

Las muestras de agua tomadas a la entrada de un pozo, tenían un aspecto turbio con abundantes filamentos de color ocre, lo que nos llevó a pensar de que se trataba probablemente de bacterias del hierro. Un análisis de estos filamentos permitió comprobar que estaban formados por una masa de hongos, algas y bacterias recubierta por abundante precipitado de óxidos de hierro.

Esta masa, por su cantidad y consistencia tenía un poder de taponamiento muy elevado, comprobado en nuestro laboratorio por la rápida obstrucción de filtros Millipore de 0.45 micrones.

En esa época el Grupo de Trabajo de YPF para Recuperación Secundaria, estaba realizando aplicaciones de un bactericida por medio de "bacheos", es decir la dosificación del producto por espacio de algunas horas con intervalos de algunos días entre agregados; de acuerdo a normas recomendadas por el fabricante.

Recuentos posteriores a los "bacheos" permitieron comprobar que el tratamiento no resultaba efectivo. Se nos plantearon tres alternativas a saber:

- 1) Que el bactericida no fuera efectivo.
- 2) Que la dosificación no fuera correcta.
- 3) Que las condiciones higiénicas en que se encontraba la línea hicieran ineficaz el agregado del producto.

Siendo esta última alternativa la base para comprobar las restantes, se decidió recomendar al Grupo de Recuperación Secundaria de YPF que encarara la limpieza de todos los tanques de almacenaje de agua de la línea, con el objeto de eliminar la materia orgánica que contenían, (restos de vegetales superiores en descomposición, algas, hongos etc.). Además clausurar herméticamente las bocas superiores de los mismos para evitar la entrada de hojas y asimismo privar de la luz necesaria para el desarrollo de algas.

Siendo bajo el número de bacterias contenido en las aguas del pozo productor (1500 a 3000 por ml.) y eliminando la materia orgánica, causa fundamental de la multiplicación de microorganismos dentro del sistema de conducción; teóricamente el contenido microbiano debía bajar considerablemente. Desgraciadamente, razones técnicas, impidieron limpiar de limo a la cañería y dejar los tanques

de almacenamiento en condiciones de perfecta operabilidad, ya que los mismos están recubiertos interiormente por una capa asfáltica en muchos lugares despegada de la chapa y su reparación hubiera obligado a emplear más tiempo del aconsejable.

YPF dispuso eliminar de la línea el tanque B-153, medida a nuestro criterio acertada, teniendo en cuenta que ese enorme depósito de difícil limpieza, se prestaba para la multiplicación microbiana y además cuando se efectuaba un agregado de bactericida, al llegar al mismo se diluía a concentraciones que resultaban ineficaces. Después de la limpieza, se dispuso efectuar un control permanente en diferentes puntos de la línea, con el objeto de constatar las condiciones sanitarias de la misma y tener una base concreta para aconsejar el agregado de bactericidas.

Al hacer los conteos semanales, aparecieron resultados heterogéneos debidos a varios factores; el principal, como se dijo anteriormente era la falta de limpieza de la cañería que contenía y contiene cierta cantidad de limo; la longitud de la línea unido a tramos de baja velocidad y variaciones en el bombeo, provocan turbulencias que levantan ese limo, aumentando por consiguiente el número de bacterias en algunos puntos de muestreos. Es por ello que los valores obtenidos en cada uno de los análisis, no pueden servir para dar una idea de lo que ocurre en la línea en ese momento, sino que es preciso promediarlos. (Un valor alto en un análisis, no indica necesariamente que se esté operando una infección en el sistema).

Nosotros hemos elegido hacer el promedio mensual de los valores obtenidos de los análisis semanales, con muestras de tres diferentes puntos. Los datos hasta el presente se detallan a continuación.

PUNTOS DE MUESTREO

Mes	Agrelo	B2	B193
Mayo	26.000	—	400.000
Junio	20.000	—	350.000
Julio	45.000	140.000	200.000
Agosto	22.000	83.000	120.000
Setiembre	5.000	37.000	39.000

Las cifras indican el número de bacterias por mililitro.

NOTA: Al notarse un incremento en el número de bacterias durante la última semana de junio y primera de julio, se efectuó un agregado de bactericida.

Los resultados precedentes, si bien indican una disminución considerable en el número de bacterias, pueden causar alarma a la vista del Standar para Aguas de Inyección API-RP 38, que recomienda como máximo recuento total permisible, el número de 10.000 bacterias por mililitro.

Este severo Standar si bien está basado en muchos años de experiencia, indica una cifra difícilmente alcanzada en la práctica, y solamente se lo puede considerar como un ideal para una operatibilidad óptima.

Con respecto al número de bacteria que pueden obstruir un reservorio de una determinada permeabilidad, nosotros hemos podido encontrar en la bibliografía solamente una referencia; Sharpley indica que 30.000 bacterias/ml pueden obstruir un reservorio de 20 milidarcy. Por otro lado, hemos encontrado citas de trabajos de investigadores, que usando microorganismos en ensayos para facilitar la salida de petróleo, han llegado a inyectar 100 millones de bacterias por ml en formaciones de gran permeabilidad, sin causar taponamientos.

En nuestro caso concreto, pensamos seguir controlando y estudiando las condiciones bajo las cuales está operando el sistema, con el objeto de elaborar una experiencia propia, teniendo como meta alcanzar los valores estipulados en el API RP38 de la manera más económica posible.

Para ello hemos recomendado:

- 1) Efectuar periódicamente la limpieza de los tanques.
- 2) Reemplazar los tramos de cañería de baja velocidad.
- 3) Tener especial cuidado con el agregado de sustancias orgánicas en la línea. Los inhibidores de corrosión deben dosificarse en las mínimas dosis en que resultaren efectivos.
- 4) No emplear bactericidas como operación de rutina, sino cuando las circunstancias lo aconsejen.
- 5) Testar bacteriológicamente y químicamente los bactericidas para comprobar su efectividad y compatibilidad.

RESUMEN

El presente aporte al estudio de las aguas de inyección tiene por objeto la determinación de bacterias de la corrosión es decir, las llamadas bacterias del hierro y del azufre, así como también las bacterias reductoras de sulfatos. En muestras tomadas en Agrelo, departamento de Luján, Mendoza, los resultados para este tipo de bacterias resultaron negativos.

El trabajo consigna los resultados del examen cualitativo de las aguas enumerando los materiales y microorganismos detectados.

Finalmente, se hace un recuento semanal del número total de microorganismos de las muestras de la zona citada. Se informa de los resultados obtenidos hasta este momento, pero se considera que será necesario contar con resultados de por lo menos 18 meses de recuento para poder extraer conclusiones. Está también en ejecución un ensayo de la acción de bactericidas, sobre la microflora total.

VI — BIBLIOGRAFIA

- 1 — HAWKER, L. E., LINTON, A. H. and CARLILE, M. J. (1960). And introduction to the biology of microorganisms. E. Arnold, London.
- 2 — OSTROFF, A. G. (1965): Introduction to oilfield water technology. Prentice Hall.
- 3 — Report of Committee nº 1 on standard methods of water analysis. J. Amer. W. W. Ass., 21, 668 (1929).
- 4 — Standards methods for the examination of water on sewage. 8 ed. 1943. Amer. Pub. Health Assoc. 1790. Broadway. N. York.
- 5 — API — Recommended practice for biological analysis of subsurface injection waters (1965). American Petroleum Institute R. P. Texas.
- 6 — Standard methods of test for iron bacteria in industrial water and water formed deposits of the American Society for testing materials D-932-58 y D-993-58 (1959). EE. UU.
- 7 — BERGEY (1957), Manual of determinative bacteriology. Williams and Wilkins Co., Baltimore 2, Md.
- 8 — SKERMAN, V. B. D. (1959): A guide to the identification of the genera of bacteria. Wilkins Co. Baltimore 2 — Maryland.
- 9 — FRED, E. B. and WAKSMAN, S. (1928): Laboratory manual of general microbiology. Mac Graw-Hill Book Co.
- 10 — SHARPLEY, J. M. (1966): Elementary petroleum microbiology. Sharpley Lab. Inc. Fredericksburg, Virginia, Gulf Pub. Co. Houston, Texas.
- 11 — DAVIS, J. B. (1967): Petroleum Microbiology. Elsevier Pub. Co.
- 12 — SHARPLEY, J. M. (1961): Bacteria in floods water. Petroleum Engineering Feb. (1961).
- 13 — TRAUTENBERG, G S.: Don't underestimate role of aerobic bacteria. The oil and gas Journal. Copia fotostática de una traducción facilitada por YPF.
- 14 — SHRYOCK, S. and J. KNOX: Stimulating injection wells. Halliburton. The oil and gas Journal. Idem 14.