

## CARACTERIZACIÓN Y ESTABILIDAD AMBIENTAL DE BIOMARCADORES EN PETRÓLEOS DE LA PROVINCIA DE SANTA CRUZ

Germán Tomas<sup>1,2</sup>, Adrián Acuña<sup>1,2</sup>, Walter Vargas<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación y Transferencia de Santa Cruz – CONICET. Av. Lisandro de la Torre 860, Río Gallegos (9400) Santa Cruz.

<sup>2</sup> Grupo de Estudios Ambientales (GEA), Universidad Tecnológica Nacional-Facultad Regional Santa Cruz. Los Inmigrantes 555, Río Gallegos (CP9400), Santa Cruz.

<sup>3</sup> YPF – Tecnología (Y-TEC) – CONICET. Av. del Petróleo s/n (entre 129 y 143), Berisso (1923) Buenos Aires.

### CONTEXTO

El presente trabajo se desarrolla en las instalaciones de la Universidad Tecnológica Nacional – Facultad Regional Santa Cruz (UTN-FRSC) y en el Centro Tecnológico de YPF-CONICET (Y-TEC) en el marco del proyecto doctoral “Caracterización y Estabilidad Ambiental de Biomarcadores en Petróleos de la Provincia de Santa Cruz” a cargo de los Doctores Adrián Acuña (Director) y Walter Vargas (co-Director), con el objetivo de impulsar el desarrollo de una línea de investigación estratégica para la zona en lo que respecta a la biogeoquímica del petróleo y sus implicancias en la caracterización integral de los yacimientos petrolíferos y en la comparación entre muestras para determinar si son de la misma fuente o no, aspecto clave en temas legales y ambientales.

### RESUMEN

La química del petróleo está asociada inherentemente a la materia orgánica de la que proviene. Esta herencia orgánica está reflejada principalmente en unos constituyentes del petróleo que se conocen como biomarcadores, compuestos que pueden ligarse de forma directa con sus precursores biológicos y cuyo esqueleto (base de carbonos e hidrógenos) se preserva de tal forma que es reconocible a pesar de haber estado sometida a altas presiones y temperaturas (Wang *et al.*, 1999). Debido a la variedad de condiciones geológicas y edades bajo las cuales se forma el petróleo, cada tipo de crudo exhibe una huella “biomarcadora” (proto-biogénica) única que lo identifica. Con la determinación de los biomarcadores se busca identificar los yacimientos ubicados en la Provincia de Santa Cruz y generar una base de datos de los mismos, lo que permitiría caracterizarlos íntegramente (madurez térmica, roca madre, ambiente de deposición, materia orgánica) y facilitar cualquier tema legal-ambiental en el que estén implicados como los derrames accidentales o intencionales de crudo y/o combustibles o el hurto de los mismos de las zonas de carga.

**Palabras clave:** huellas geoquímicas, condiciones geológicas, caracterización de yacimientos.

### 1. INTRODUCCION

Los biomarcadores son aquellos compuestos que pueden ligarse de forma inequívoca con sus precursores biológicos y cuyo esqueleto de carbonos base se preserva de tal forma que es reconocible a pesar de la diagénesis y de gran parte de la catagénesis (Killops *et al.*, 2005). Estos comenzaron a utilizarse en estudios a partir de la década del 70 y han cobrado fuerza debido a la información que proveen. En el suroeste del Delta del Níger, Nigeria, se llevó a cabo la caracterización geoquímica de muestras de crudo de dos campos de petróleo, utilizándose esta herramienta para deducir la fuente de materia orgánica, la madurez térmica, el ambiente de deposición y el grado de biodegradación. Valores de Fitano (Fi)/n-C18 mayores que uno y relaciones Pristano (Pr)/Fi que oscilaron entre 8,78 y 32,27 sugirieron que los crudos fueron biodegradados y tuvieron una contribución terrestre significativa, depositándose en un paleoambiente óxico (Moldowan *et al.*, 1985).

Conocer los biomarcadores de un petróleo crudo es como conocer la huella dactilar de una persona. A veces las diferencias entre un yacimiento y otro son claras, sobre todo cuando ambos no pertenecen a la misma provincia geológica. Esta situación se presenta a continuación por comparación entre dos crudos que provienen de continentes diferentes. A partir de los cromatogramas de un crudo North Slope (NSC) y una mezcla de crudo de Nigeria se observó que ambos contenían una abundante cantidad de n-alcanos, pero con perfiles diferentes, exhibiendo el crudo de Nigeria una ligera predominancia en los alcanos mayores a C25. El NSC tuvo una relación más alta y más baja de n-C17/Pr y Pr/Fi, respectivamente, que el crudo de Nigeria. Los cromatogramas de masas parciales (m/z 191) en cada crudo revelaron una abundancia relativa de triterpenos tricíclicos extendidos y homohopanos en el NSC, y una abundancia relativa de oleananos en el crudo de Nigeria. Por último, las distribuciones de esteranos regulares mostraron mayor proporción de C27 y diasteranos, y una proporción más alta C29S/(C29S + C29R) en el crudo NSC que en el crudo de Nigeria. Estas diferencias indican colectivamente que las rocas generadoras de estos crudos variaban en sus

proporciones de materia orgánica marina y terrestre y que han expulsado el crudo en diferentes condiciones de calentamiento. Estas diferencias químicas primarias son relativamente obvias, dadas las diferencias geológicas significativas entre el sistema petrolero del Mesozoico en la vertiente del norte de Alaska, en comparación con el sistema petrolero terciario en el delta del Níger (Wang *et al.*, 2002).

Sin duda, una de las grandes herramientas que nos proporcionan los biomarcadores es la de poder contrastar dos o más muestras de crudo con el fin de determinar si se asemejan entre sí. Esto permite determinar cuál ha sido la fuente de un derrame que ha ocasionado un impacto en el medio ambiente. En determinadas ocasiones las muestras que se comparan son químicamente similares lo que dificulta la resolución del problema, es en este punto que mediante el empleo de biomarcadores puede diferenciarse entre una y otra (López *et al.*, 2013).

Por otra parte, además de los biomarcadores, otro aspecto de gran importancia para complementar la caracterización del petróleo es determinar la composición microbiana presente en las muestras. Uno de los factores determinantes de la proliferación microbiana es la composición orgánica de los nichos ecológicos que habitan. De esta manera, diferentes tipos de crudos (provenientes de distintos yacimientos) presentarán una composición diferenciada de microflora. Sin embargo, este factor no ha sido tenido en cuenta hasta la fecha en los procedimientos de caracterización de crudos. Los microorganismos juegan un papel fundamental en la determinación de la composición del crudo ya que tienen la capacidad de usar como fuente de carbono una gran variedad de hidrocarburos, alterando así su composición. Por lo tanto, sería de mucho interés que junto con el análisis químico de las muestras se lleven a cabo ensayos comparados de caracterización microbiológica de la fase orgánica y la fase acuosa de los fluidos de producción. De esta manera se obtendría una caracterización integral a nivel químico y microbiológico. En los últimos años se han publicado estudios microbiológicos en instalaciones de producción de petróleo (Murali Mohan *et al.*, 2013; Summer *et al.*, 2014) siendo un gran avance en la adaptación de metodologías de biología molecular para estudios de campo en el Oil & Gas. En nuestro país, Y-TEC ha sido pionera en la implementación de estrategias de secuenciación masiva para la determinación de las comunidades microbianas asociadas a la producción petrolera (Vargas *et al.*, 2016; Vargas *et al.* 2017a, b), permitiendo el desarrollo de estudios integrales en instalaciones hidrocarburíferas con una alta sensibilidad y precisión.

## 2. LINEAS DE INVESTIGACION y DESARROLLO

En este trabajo se plantearon los siguientes objetivos específicos a investigar:

- Evaluar los perfiles de biomarcadores en petróleos crudos provenientes de diferentes yacimientos de la Cuenca Petrolífera Austral.
- Estudiar la composición microbiana en muestras de la Cuenca Petrolífera Austral.
- Evaluar la procedencia de origen de los diferentes yacimientos estudiados en función a los perfiles de biomarcadores encontrados.
- Conocer la estabilidad ambiental de los diferentes biomarcadores encontrados en los petróleos crudos estudiados.

## 3. RESULTADOS OBTENIDOS/ ESPERADOS

Las muestras de estudio serán petróleo crudo tomado directamente de yacimiento. Serán colectadas de forma representativa bajo las normas de muestreo propias de cada empresa operadora de la zona de colección. Las muestras serán colectadas en botellas limpias (aproximadamente 1 L) y se evitará la presencia de cámara de aire por encima del fluido. De esta manera se minimiza el impacto del oxígeno sobre la estabilidad orgánica y microbiológica de las muestras. La zona de muestreo será parte de la comprendida por la Cuenca Petrolífera Austral, ubicada preferentemente en el sureste de la provincia de Santa Cruz. La idea principal es tomar muestras de aproximadamente 15 yacimientos diferentes ubicados en distintas zonas de la mencionada cuenca, donde cada yacimiento constituye una unidad de muestreo. Se tomarán muestras de cinco yacimientos ubicados en el sector este, próximos a la región costera, de cinco yacimientos ubicados en el sector centro, y cinco yacimientos ubicados en el sector sur. De esta manera se estima obtener muestras con mayor variabilidad de los parámetros estudiados, ya que a medida que los yacimientos se alejan unos de otros dentro de una misma cuenca las condiciones geológicas características de estos (profundidad del yacimiento, aporte de materia orgánica, presión, temperatura, ambiente redox, etc.) cambian en mayor medida, lo cual incidiría directamente en las concentraciones y tipos de biomarcadores y microorganismos que van a estar presentes en el yacimiento. Con el fin de determinar la composición promedio de biomarcadores de cada yacimiento, se procederá a realizar el muestreo antes mencionado cuatro veces en el período de un año.

**Caracterización Química.** Aproximadamente 100-200 mg de petróleo se colocarán en 10 mL de ciclohexano,

seguidamente se sonificará por 10 minutos y finalmente se filtrará el extracto. Un volumen de 1  $\mu\text{L}$  se inyectará en modo Split en un cromatógrafo de gases con un detector de tipo FID. Este análisis será utilizado para obtener el perfil completo y general de las muestras de petróleo estudiadas. Para obtener el perfil de biomarcadores específicos de cada muestra se colocarán aproximadamente 100-200 mg de petróleo en 10 mL de pentano. Este extracto será sometido a un fraccionamiento en hidrocarburos alifáticos y aromáticos en columna de sílica gel, eluyendo con *n*-pentano y diclorometano respectivamente. Cada fracción será analizada por separado por inyección de 1  $\mu\text{L}$  en modo Split en un cromatógrafo de gases con un detector masas. Por otro lado, la estabilidad ambiental de los biomarcadores detectados será evaluada en reactores a escala de laboratorio. Estos estarán diseñados para evaluar la estabilidad en suelos y en agua de mar. Se evaluará la influencia de los factores abióticos y bióticos utilizando suelo y agua de mar estéril y no estéril, respectivamente. Estos sistemas serán contaminados con los petróleos en estudio y serán monitoreados durante un período de un año por los métodos cromatográficos antes descriptos. A partir de los datos de biomarcadores obtenidos de este estudio de estabilidad ambiental se calcularán relaciones de diagnóstico, si estas relaciones permanecen constantes durante el tiempo que dura el estudio se pueden utilizar para identificar fuentes de derrames, ya que la muestra sospechosa y la muestra testigo tendrán los mismos valores en sus relaciones de diagnóstico.

**Caracterización Biológica.** Para la caracterización biológica se procederá a separar las fases acuosa y orgánica de los fluidos de producción recuperados de los yacimientos. Ambas fracciones serán procesadas de forma independiente. Las muestras de agua serán agitadas para resuspender las partículas sedimentadas y posteriormente serán filtradas usando membrana estéril de 0,22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro en un embudo fritado. En la membrana quedaran retenidas aquellas partículas que superen en tamaño al poro de la membrana y se procederá a la extracción de ADN genómico total utilizando el Kit de Extracción de ADN “NucleoSpin Soil<sup>®</sup> 740780.250” en el cual se detalla su protocolo (Busconi *et al.*, 2003). Este proceso se realizará por duplicado.

Para la recuperación de los microorganismos presentes en la fase orgánica se tomarán 20 mL de crudo y se colocarán en tubo tipo falcón de 50 mL. Se añadirá una solución de Tween 20 al 0,005% y se homogenizará vigorosamente. Luego se centrifugará por 5 min a 5000 rpm y se recuperará la fase acuosa, la cual se filtrará al vacío con membrana estéril de 0,22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro en un embudo fritado. En la membrana estarán retenidos los microorganismos, para extraer el ADN genómico total se utilizará el Kit de Extracción de ADN “NucleoSpin Soil<sup>®</sup> 740780.250” en el cual se detalla su

protocolo (Busconi *et al.*, 2003). Este proceso se realizará por duplicado.

Para llevar a cabo el recuento microbiano se utilizará la técnica de qPCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa) para estimar la concentración de los principales grupos microbianos: Bacterias Totales, Arqueas y Bacterias sulfato-reductoras. Para esta metodología se emplearán protocolos desarrollados para muestras provenientes de instalaciones productoras de petróleo (Murali-Mohan *et al.*, 2013; Vargas *et al.*, 2017a). En caso de inconvenientes con las estrategias propuestas se indagarán alternativas metodológicas incluyendo análisis metagenómicos y DGGE, entre otras. Los análisis metagenómicos se abordarán mediante la evaluación de las regiones V5 y V6 del gen 16S proveniente de microorganismos. Para ello se construirán bibliotecas que serán indexadas y pirosecuenciadas mediante las metodologías habituales para Illumina HiSeq.

#### 4. FORMACION DE RECURSOS HUMANOS

El presente trabajo se realizará en la Facultad Regional Santa Cruz de la UTN en conjunto con el Centro Tecnológico de YPF-CONICET (Y-TEC). De esta manera, se pretende realizar un continuo intercambio de conocimientos entre ambos grupos de trabajo.

Por otro lado, se pretende continuar con la formación doctoral del Lic. en Química Germán Tomas del Centro de Investigación y Transferencia de la Provincia de Santa Cruz (CIT Santa Cruz), quien ha obtenido una beca doctor de CONICET para el desarrollo de sus tareas de investigación.

#### 5. BIBLIOGRAFIA

1. Busconi, M., Foroni, C., Corradi, M., (2003). DNA extraction from olive oil and its use in the identification of the production cultivar. Food chemistry.
2. Killops, S., Killops, V., (2005). Introduction to organic geochemistry. 2 edición. Blackwell Publishing. 406 p.
3. López, L., (2013). Biomarcadores: Aplicaciones en la geoquímica del petróleo. Caracas. Universidad Central de Venezuela, Ediciones de la Biblioteca EBUC. 108p.
4. Moldowan, J.M., Seifert, W.K. and Gallegos, E.J. (1985). Relationship between petroleum composition and depositional environment of petroleum source rocks. Am. Assoc. Petrol. Geol. Bul.; 69, 1255–1268.

5. Murali, M., Hartsock, A., Bibby, K.J., (2013). Microbial community changes in hydraulic fracturing fluids and produce water from shale gas extraction. *Environmental Science and Technology*, 47: 13141-13150.
6. Vargas, W., Pagliaricci, M.C., Pietravalli, Gianni., (2016) De la biología molecular a la mitigación de la biocorrosión. Jornada de corrosión microbiológica. NACE-Argentina. Buenos Aires, Septiembre-2016.
7. Vargas, W., Pagliaricci, M.C., Pietravalli, Gianni., (2017a) Diagnostico por biología molecular para la mitigación de la biocorrosion en instalaciones de Oil & Gas. 3er Congreso de integridad en instalaciones en el upstream y downstream de petróleo y gas. IAPG, Buenos Aires, 30 de Mayo-1 de Junio de 2017.
8. Vargas, W., Pagliaricci, M.C., Pietravalli, Gianni., (2017b) Mesa de Discusión: Lanzamiento de un consorcio de estudio y caracterización de corrosión microbiológica. 3er Congreso de integridad en instalaciones en el upstream y downstream de petróleo y gas. IAPG, Buenos Aires, 30 de Mayo-1 de Junio de 2017.
9. Wang, Z.D., Fingas, M., Landriault, M.L., Sigouin, S., and Zhang. D., (1999). Source identification of an unknown spilled oil from Quebec (1998) by unique biomarker and diagnostic ratios of “source-specific marker” compounds, *Environmental Technology*, 20, 851–862.
10. Wang, Z.D., Fingas, M., and Sigouin, L., (2002). Using multiple criteria for fingerprinting unknown oil samples having very similar chemical composition, *Environmental Forensics*, 3, 251–262.