



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

FACULTAD DE CIENCIAS

Tesis para optar al título en la Licenciatura en Bioquímica

**ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE MUESTRAS DE
SUELO COMO HERRAMIENTA PARA LA PROSPECCIÓN Y
EXPLORACIÓN DE HIDROCARBUROS**

MAGALÍ FERNÁNDEZ TRINIDAD

Orientador: Ing. Quím. Mónica Loustaunau

Co-orientador: MSc. Matías Soto

Evaluador: Dr. Edison Neirotti

Diciembre 2015

Montevideo, Uruguay

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi reconocimiento a todas aquellas personas que de una manera u otra han colaborado en la concreción de esta tesis y de manera especial a:

Mis tutores, Mónica Loustaunau y Matías Soto, por su orientación y su estímulo constante.

Al Área de Exploración y Producción de ANCAP, especialmente a Héctor de Santa Ana, Matías Soto y Bruno Conti por ayudarme en la elección del tema y apoyarme técnicamente durante el desarrollo de esta investigación.

A Víctor Hermida y Jorge Bassaiztegui de la Gerencia de Controles de ANCAP, por permitirme hacer este trabajo.

A Daniel Ferrari, Jefe de Gestión de la Calidad, división Medio Ambiente, Seguridad y Calidad, de ANCAP, por su generosidad a la hora de ofrecerme sus conocimientos y experiencia para diseñar algunos experimentos y también por acercarme al Laboratorio Medio Ambiente.

Al Laboratorio Medio Ambiente de ANCAP, en especial a Edison Saucedo, Carlos Albornoz y Edison Neirotti, por recibirme en el laboratorio y orientarme durante los primeros ensayos de este trabajo.

A Claudio Claudio Larriestra y Fernando Larriestra por todos los aportes y por contactarme con el laboratorio Proanálisis.

Al Depto. de Microbiología del laboratorio Proanálisis. A Máximo Vecchio y Sergio Teves, por sus contribuciones. Agradezco

especialmente a Lucila Sabeckis, por su disposición y amabilidad especialmente durante el trabajo práctico.

A Lucía y a Gaby.

A mi familia que siempre está conmigo.

A Mariel, por supuesto.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 5 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 7 |
| 1.1. Sistemas petroleros | 7 |
| 1.2. Exploración geoquímica | 9 |
| 1.3. Prospección microbiológica | 10 |
| 1.4. Estudios anteriores realizados en el país | 14 |
| 1.5. Hipótesis | 17 |
| 1.6. Objetivo | 17 |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS | 18 |
| 2.1. Extracción de muestras | 19 |
| 2.2. Procesamiento de muestras en el laboratorio microbiológico .. | 23 |
| 3. RESULTADOS | 33 |
| 3.1. Primer ensayo | 33 |
| 3.2. Segundo ensayo | 34 |
| 4. DISCUSIÓN | 36 |
| 4.1. Primer ensayo | 36 |
| 4.2. Segundo ensayo | 38 |
| 4.3. Posibles fuentes de carbono | 39 |
| 4.4. Consideraciones para la utilización esta técnica | 41 |
| 4.5. Consideraciones generales sobre el método de prospección microbiológica | 42 |
| 5. CONCLUSIONES | 45 |

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue reproducir la técnica microbiológica que fue utilizada previamente para investigar sobre la posible existencia de acumulaciones de hidrocarburos en el subsuelo de nuestro territorio. La metodología fue la misma que la utilizada en aquella oportunidad por quienes la desarrollaron (Larriestra Geotecnologías S.A.).

La técnica se basa en el análisis microbiológico de muestras de suelo. Para ello, las muestras se procesan y se siembran sobre un medio de cultivo sintético, sólido, sin adición de fuentes de carbono. Las muestras se incuban en atmósfera conformada por aire y gas butano, siendo este último la única fuente de carbono adicionada al sistema. El fundamento de la técnica supone que sólo aquellos microorganismos capaces de utilizar el gas como fuente de carbono serán capaces de desarrollarse. Luego, el recuento de unidades formadoras de colonias por gramo de muestra, puede ser utilizado como indicador indirecto de la existencia de una acumulación de hidrocarburos en el subsuelo del área muestreada.

Los resultados de este trabajo demostraron que las colonias bacterianas crecían de igual manera en sistemas donde la atmósfera contenía butano, que en donde la misma estaba desprovista de dicha fuente de carbono. Esto dejó de manifiesto la existencia de al menos una fuente de carbono alternativa que la microbiota era capaz de utilizar para su desarrollo. Se discute sobre las posibles fuentes de carbono y modificaciones a la técnica microbiológica.

Finalmente, se concluye que esta técnica no debería ser utilizada como método prospectivo sin antes ser puesta a punto teniendo en cuenta las condiciones locales (suelo, clima, etc.) de nuestro territorio.

Palabras clave: Hidrocarburos, microfiltraciones, bacterias oxidantes de butano, prospección microbiológica

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Sistemas petroleros

Un sistema petrolero abarca todos los elementos y procesos necesarios para que exista una acumulación de hidrocarburos. De esta manera, comprende tanto a la roca generadora como a todas las acumulaciones de petróleo y gas genéticamente relacionadas con la misma. Esto incluye tanto los elementos geológicos como a los procesos que son esenciales para que dicha acumulación exista (Magoon y Beaumont, 1999; Soto, 2015).

Son cuatro los elementos de un sistema petrolero:

- La roca generadora, que puede ser definida como una roca de grano fino, rica en materia orgánica. El potencial de generación de la roca está directamente relacionado con su volumen, riqueza en materia orgánica, la calidad de la misma y la madurez térmica que haya alcanzado.
- La roca reservorio es aquella que almacena los hidrocarburos generados por la roca generadora. Una roca es considerada reservorio si posee alta porosidad y sus poros están conectados entre sí. Los mejores reservorios son rocas sedimentarias como las areniscas, conglomerados y carbonatos, pero también pueden

actuar como reservorios rocas no sedimentarias como granitos fracturados.

- La *roca sello* debe ser de muy baja permeabilidad ya que actúa impidiendo que el petróleo o gas generado siga migrando. Ejemplos de rocas sello son las pelitas, la sal o rocas ígneas.

- La *trampa* es la configuración geométrica espacial que posibilita la acumulación de los hidrocarburos. Para que esto ocurra la misma debe estar cerrada en los cuatro sentidos.

Los procesos incluyen:

- La *maduración térmica*, que refiere a la temperatura a la que la roca generadora estuvo expuesta a través del tiempo. El calor se incrementa cuando la profundidad de enterramiento de la roca generadora aumenta debajo de las capas de sedimento. La transformación térmica de la materia orgánica contenida en la roca da origen al petróleo.

- La *migración* ocurre una vez que la roca madre ha generado suficiente hidrocarburo y se satura del mismo. El aumento de presión produce microfisuras que permiten que comience la migración hacia la roca reservorio.

- El *timing* refiere al orden en el que ocurren los hechos. Para que exista una acumulación de hidrocarburos es necesario que la trampa se genere antes de que ocurra la migración (Fig. 1) (McCarthy et al., 2011; Anadón, 2013; Soto, 2015).

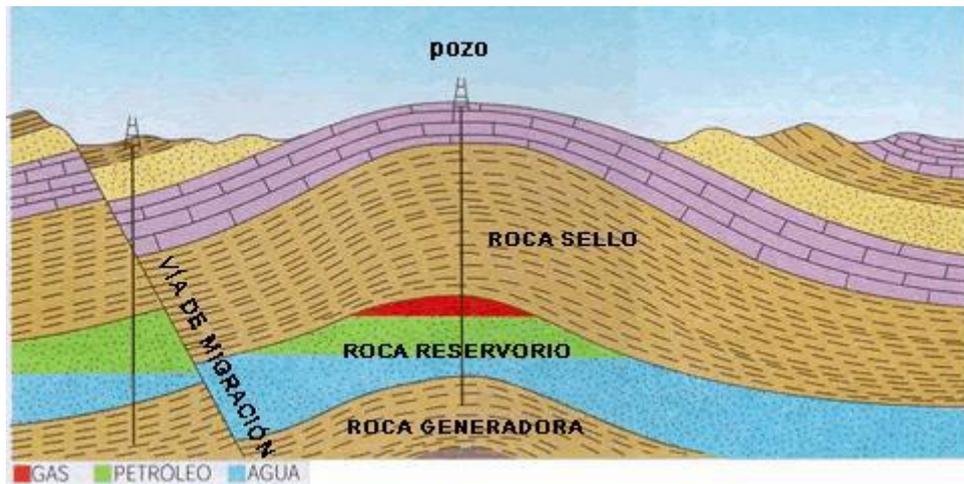


Figura 1: Elementos de un sistema petrolero. Tomado del curso Geología del Petróleo. Programa de capacitación de Exploración y Producción de ANCAP. Dictado por MSc. Matías Soto. Montevideo, 11 al 15 de Mayo de 2015.

1.2. Exploración geoquímica

Los métodos de prospección geoquímica de superficie para la exploración de petróleo, se basan en la microfuga de hidrocarburos desde las acumulaciones subterráneas de petróleo o gas hacia la superficie. Se han propuesto diversos mecanismos de migración de los hidrocarburos como por ejemplo la difusión, efusión, advección con movimiento de agua y permeación (Batista García, 2010; Rasheed et al., 2012; Veena Prassana et al., 2013).

La exploración geoquímica de superficie investiga la presencia de hidrocarburos químicamente identificables que se encuentran en la superficie o cerca de ella, o las modificaciones que ocurren en el suelo por presencia de éstos. Algunos de estos cambios son: concentración

anómala de hidrocarburos en sedimentos, suelos, aguas y atmósfera, anomalías microbiológicas, cambios mineralógicos en el suelo, anomalías geobotánicas. Muchas de estas anomalías se muestran como un “halo apical” sobre la fuente de hidrocarburos (Fig. 2) (Schumacher et al., 2003; Augusto et al., 2005; Batista García, 2010; Naudé et al., 2011; Miqueletto et al., 2011).

1.3. Prospección microbiológica

El método de prospección microbiológica para investigación y exploración de hidrocarburos (MPOG, por sus siglas en inglés) se basa en la premisa de que los hidrocarburos de cadena corta migran hacia la superficie desde las acumulaciones subterráneas, y son utilizados por diversos microorganismos especializados en el ecosistema del suelo. Estos microorganismos son principalmente metanótrofos, etanótrofos, propanótrofos y butanótrofos, es decir, que emplean hidrocarburos gaseosos como fuente de carbono (Batista García, 2010; Xu et al, 2013). Grupos filogenéticamente variados utilizan los hidrocarburos de cadena corta para su desarrollo, entre ellos: *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas* y *Rodococcus* (Rasheed et al., 2013, Wu et al, 2014).

Si bien las bacterias son organismos ubicuos, una constante suplementación de hidrocarburos en el suelo, resulta en una mayor

concentración de aquellas bacterias capaces de utilizar dichas cadenas hidrocarbonadas para su crecimiento (Powell et al., 2006; Rasheed et al., 2012). De esta manera, la colonización de microorganismos oxidantes de hidrocarburos en sitios donde ocurre la filtración, resulta en densidades más altas que las densidades normalmente encontradas para los mismos microorganismos en zonas donde no ocurre flujo de hidrocarburos (anomalía). Por este motivo, es necesario establecer o considerar valores normales en sitios donde no ocurre tal flujo de hidrocarburos (Hubert y Juud, 2010).

Algunos autores toman un valor normal (*background*) definido estadísticamente, como punto de corte para establecer lo que podrían ser prospecto positivos y negativos, según el recuento se encuentre por encima o por debajo del valor de base, respectivamente (Rasheed et al., 2013).

La detección de distribuciones anómalas de estos microorganismos en muestras de suelo puede ser utilizada para estimar la existencia de depósitos de petróleo y gas (Zhang et al., 2010).

Warner y colaboradores han señalado que el número de bacterias oxidantes de hidrocarburos en muestras de suelo que reciben microfiltraciones de hidrocarburos se encuentra en el rango de las 10^3 - 10^6 ufc/g de muestra, dependiendo de las condiciones ecológicas (Wagner, 2002).

Finalmente, conviene destacar que a pesar de que la detección de microorganismos involucrados en la metabolización del metano podría pretender la ocurrencia de una acumulación de hidrocarburos en el subsuelo, la abundancia de metano en la superficie puede deberse a altos índices de metanogénesis microbológica. Por otro lado, los hidrocarburos de cadena corta de más de un carbono, (C₂-C₄) son generalmente considerados de origen termogénico y por lo tanto resultan mejores indicadores de la existencia de un reservorio en el subsuelo (Hubert y Judd, 2010).

El aislamiento y la enumeración de bacterias oxidantes de hidrocarburos en muestras de suelo es una valiosa herramienta complementaria en la exploración petrolera. Una relación positiva entre la población de estos microorganismos y la concentración de hidrocarburos en el suelo ha sido observada en varios yacimientos productores a nivel mundial (Batista García, 2010; Brian Jeremy Chan, 2011; Turkewicz, 2011; Veena Prassana et al., 2013; Xu et al., 2013; Zhang et al., 2014).

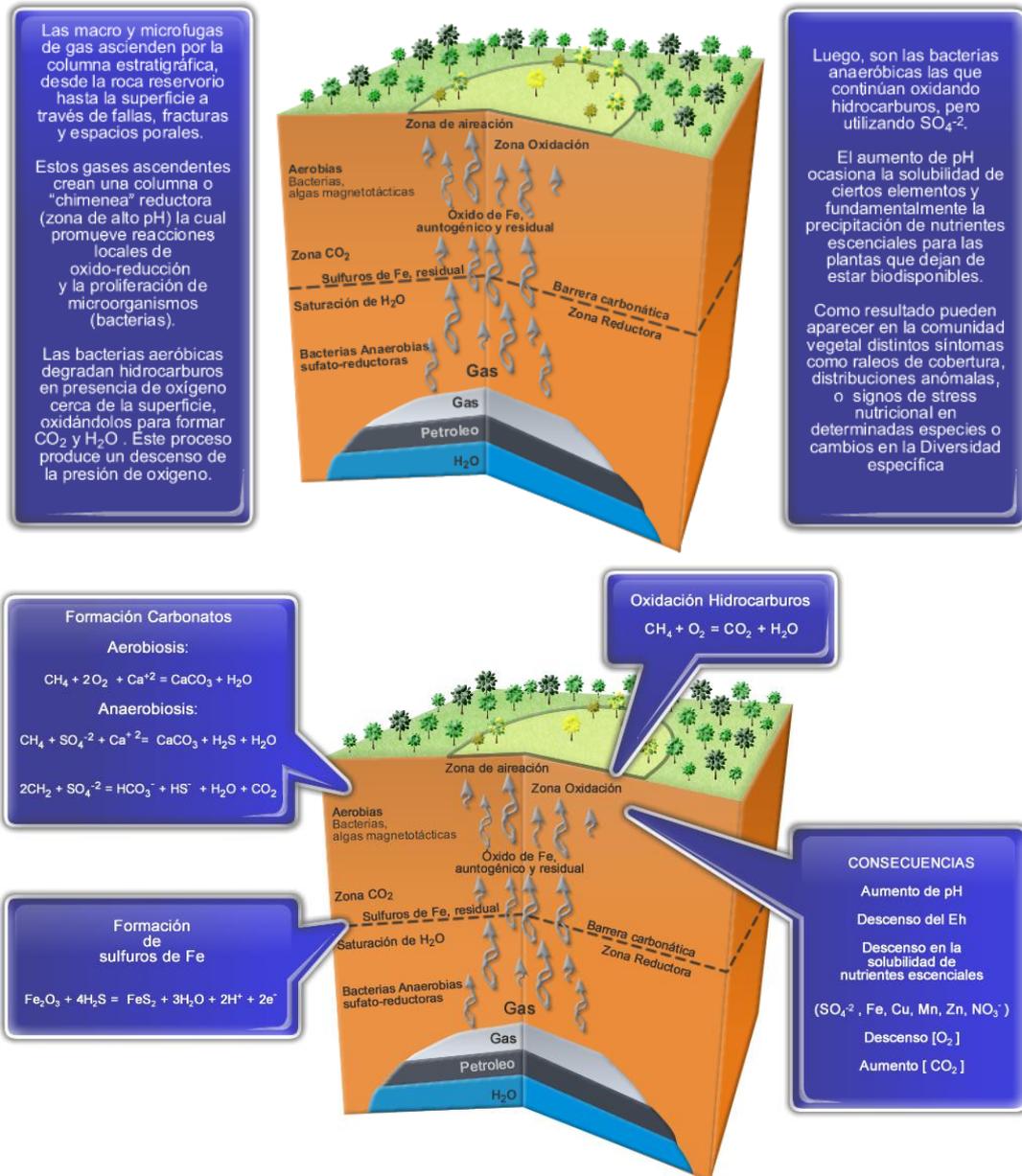


Figura 2: Modelo geoquímico orgánico de las microfugas de hidrocarburos. Tomado de Larriestra Geotecnologías. <http://www.larriestra.com/LARWeb/servlet/com.larriestra.web.Contenido?pag=433> [Consulta: 25 de noviembre de 2015].

La técnica de prospección microbiológica para gas y petróleo es un método exploratorio de superficie que ha sido utilizado desde hace aproximadamente siete décadas. Este método puede ser integrado con métodos geofísicos, geológicos y geoquímicos para evaluar la prospección de hidrocarburos de un área y priorizar la localización de las perforaciones, reduciendo de esta manera los riesgos y costos de la perforación y logrando por tanto mayor éxito exploratorio. De esta manera se abre una línea de investigación nueva, económicamente viable y de baja complejidad (Miqueletto et al., 2011; Rasheed et al., 2013; Veena Prassana et al., 2013).

1.4. Estudios anteriores realizados en el país

En la Cuenca Norte de nuestro país, ANCAP ha seleccionado áreas piloto de exploración con el objetivo de realizar estudios geológico-estructurales que permitan evaluar la prospección de hidrocarburos en nuestro territorio (Fig. 2). La Cuenca Norte cubre una superficie de 90.000 Km² y pertenece a la Cuenca Paraná, que con 1.400.000 km² se extiende por el sur de Brasil, noreste de Argentina y sur de Paraguay (De Santa Ana et al., 2006).

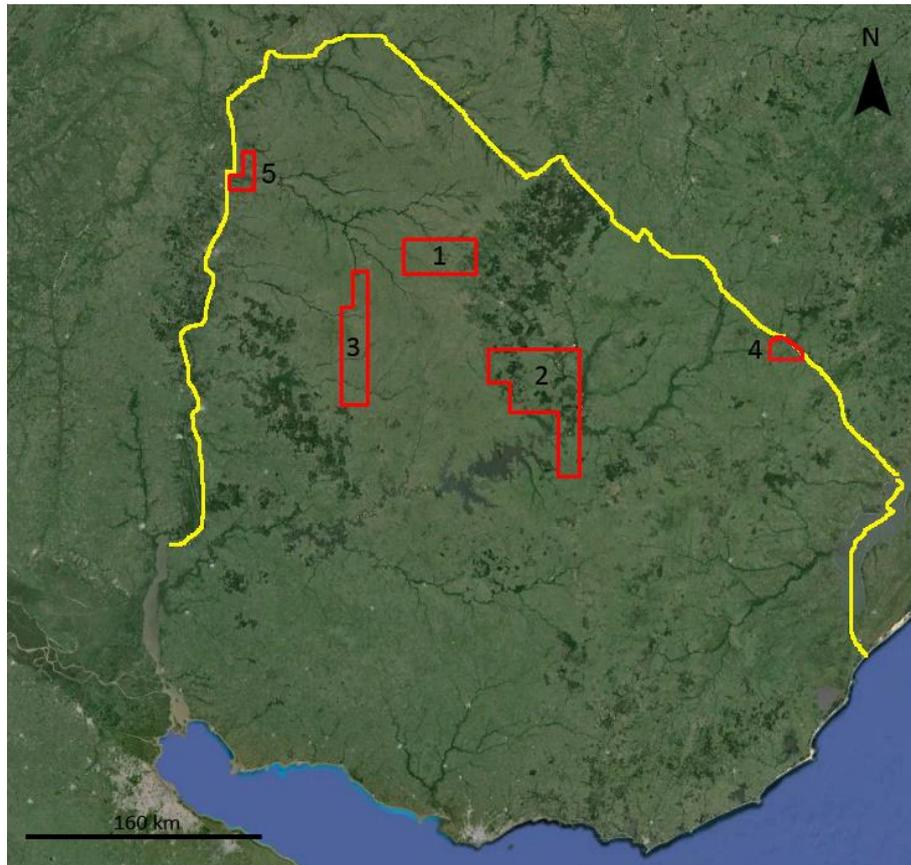


Figura 2. Ubicación de los bloques piloto de ANCAP. Referencias: 1, Pepe Nuñez. 2, Clara. 3, Cuchilla del Queguay. 4, Cañada de los Burros. 5, Constitución. Tomado de: <http://www.rondauruguay.gub.uy/MenuVertical/ANCAPCOMOOPERADOR/ONSHORE.aspx>

Entre los estudios de prospección de hidrocarburos que ANCAP ha realizado en la Cuenca Norte de nuestro país, se destaca la búsqueda y recuento de bacterias oxidantes de butano, realizado en 2011 por la empresa argentina Larriestra Geotecnologías S.A. Los resultados obtenidos en aquella campaña revelaron la presencia de anomalías en los recuentos de estas bacterias tanto para las regiones central, como centro-este y oeste de la Cuenca Norte (Larriestra Geotecnologías S.A., 2011). Los valores obtenidos en ese trabajo fueron realmente alentadores, obteniéndose anomalías incluso mayores que en zonas de otros países

donde está probada la existencia de importantes yacimientos subterráneos (Soto, 2014). Estos resultados sugerían fuertemente la existencia de un suministro continuo de hidrocarburos en los suelos de nuestro territorio, lo que llevaría a pensar en la existencia de una acumulación de hidrocarburos, o bien una roca generadora de éstos ya madura.

Hacia el año 2013, ANCAP inició estudios en el Bloque Clara, considerado clave para la validación de métodos exploratorios, ubicado en la región centro-sur de la Cuenca Norte (Conti et al., 2013; Soto et al., 2014). Se realizaron varios pozos exploratorios que confirmaron la presencia de rocas potencialmente generadoras en nuestra Cuenca Norte. Todos los pozos se declararon secos, y en la mayoría de los casos la roca se encontró térmicamente inmadura, sin embargo en áreas profundas de la cuenca y en áreas afectadas por diques y *sills* se han constatado condiciones de madurez (Soto, 2014).

Por lo expuesto anteriormente resulta fundamental la comprensión de esta técnica microbiológica como método prospectivo, para lograr una correcta interpretación de los resultados e integración con otros métodos de estudio. Asimismo, resulta de interés poder realizar los mismos estudios a nivel nacional.

1.5. Hipótesis

Si en el área en estudio, Bloque Clara, existen acumulaciones de hidrocarburos en el subsuelo y estructuras que permiten su migración, entonces es posible mediante la técnica descrita por Larriestra et al. (2010), detectar concentraciones anómalas de microorganismos oxidantes de hidrocarburos en el suelo superficial.

1.6. Objetivo

1.6.1. Objetivo general

Reproducir la técnica microbiológica empleada previamente por Larriestra Geotecnologías S.A. para investigar la presencia de hidrocarburos en el Bloque Clara, en una zona más acotada del mismo bloque.

1.6.2. Objetivos específicos

- Demostrar la validez de la técnica.
- Evaluar la posibilidad de reproducir esta técnica en laboratorios nacionales.
- Comparar los resultados de este trabajo, con resultados obtenidos en la campaña 2011.
- Discutir posibles aportes metodológicos a la técnica.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo para la extracción de muestras y procesamiento de las mismas en el laboratorio que se utilizó en este trabajo se basó en el procedimiento desarrollado por Larriestra Geotecnologías S.A. y utilizado previamente para analizar la misma zona de estudio en el año 2011 (Larriestra Geotecnologías S.A., 2011).

La metodología se basa en poner en contacto los microorganismos presentes en el suelo con una atmósfera mayoritaria de butano. Este gas es la única fuente de carbono agregada al sistema.

De esta manera, es esperable que solamente puedan desarrollarse aquellas bacterias capaces de metabolizar este hidrocarburo y utilizar sus carbonos para el crecimiento. Luego, el recuento de las unidades formadoras de colonia por gramo (ufc/g) de muestra se utiliza como aproximación para detectar distribuciones anómalas en el suelo.

Finalmente, en caso de ser detectada una anomalía en la densidad poblacional de estas bacterias, la misma puede considerarse como un indicador indirecto de la microfiltaciones de hidrocarburos desde el subsuelo (Larriestra et al., 2010; Wu et al., 2013; Rasheed et al., 2015).

2.1. Extracción de muestras

2.1.1. Materiales

- Barreno manual tipo Edelman
- GPS
- Frascos estériles
- Contenedor adecuado para transporte de las muestras refrigeradas

2.1.2. Procedimiento para la extracción de muestras

El muestreo se realizó conjuntamente con profesionales de Exploración y Producción de ANCAP. La recolección de todas las muestras se llevó a cabo durante los días 7 y 8 de abril de 2015, en el departamento de Tacuarembó, Bloque Clara (Figs. 3 y 4).

Los puntos de muestreo del bloque Clara se ubicaron en una transecta (Fig. 4) que se extendió desde el vértice suroeste medio del Bloque Clara, hasta la localidad de Clara, en las cercanías de la ruta 59. Los mismos se detallan en la Tabla 1 (Anexo 2).

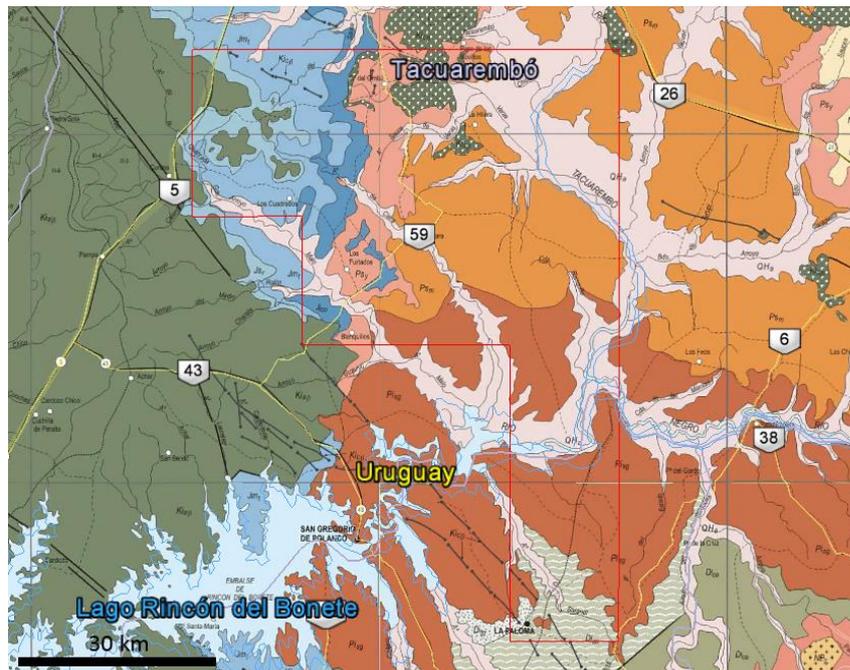


Figura 3: Mapa geológico del Bloque Clara. Tomada de: Soto *et al.* (2014).

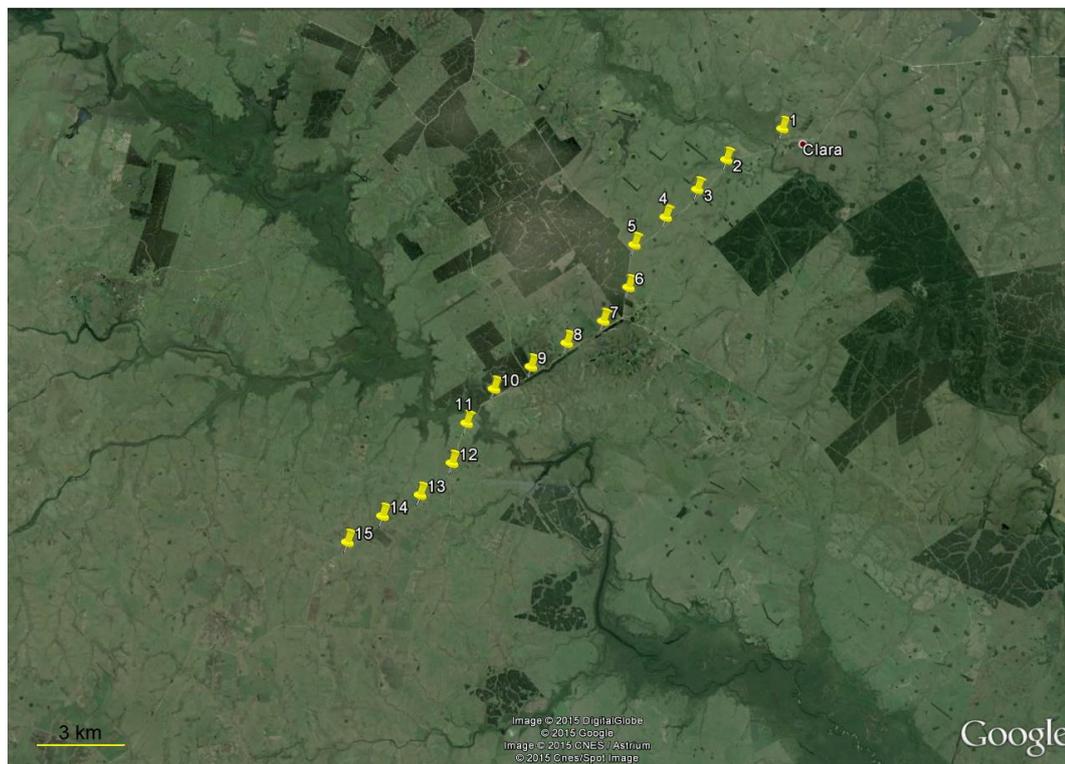


Figura 4: Ubicación de los sitios de extracción de muestras en el bloque Clara. Imagen tomada de Google Earth.

Se recolectó un total de 15 muestras de suelo de aproximadamente 100gr cada una para análisis microbiológico. Para la extracción de las mismas se utilizó un barreno manual tipo Edelman, alcanzando una profundidad de entre 25 y 30 cm. En algunos casos la muestra se extrajo del perfil de suelo. Aquellos sitios en donde el área se encontró disturbada o excavada, contaminada con desechos de animales o cubierta de agua, fueron evitados para el muestreo. Todas las muestras se almacenaron en frascos estériles y se conservaron entre 2°C y 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio microbiológico (Tabla 1, figs.5 y 6).



Figura 5: Izquierda: barreno manual tipo Edelman. Medio: realización de pozo para extracción de muestra con barreno. Derecha: toma de muestra de perfil de suelo.



Figura 6: Fotografía tomada durante la perforación de un pozo con barreno manual tipo Edelman.

El control negativo se extrajo en el departamento de Florida, a varios metros de la Ruta Nacional N° 5 (ver Anexo 2). También se utilizó como control negativo una muestra de tierra extraída de una maceta del laboratorio. Los controles positivos incluyeron una muestra recolectada de la refinería de ANCAP en La Teja (ver Anexo 2) y una muestra de suelo de una estación de servicio proporcionada por el Laboratorio de Medio Ambiente de ANCAP (LAMA), previamente analizada por este laboratorio, y que presentaba una concentración muy alta de hidrocarburos.

Tanto las muestras como los controles permanecieron refrigeradas a 4°C desde su extracción hasta el procesamiento en el laboratorio.

2.2. Procesamiento de muestras en el laboratorio microbiológico

2.2.1. Materiales

a) Equipos

- Estufa de cultivo de $35,0^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$.
- Bomba de Vacío.
- Equipo para preparación de atmósfera.
- Flujo Laminar.
- Balanza granataria con 0,1 g de sensibilidad.
- Balanza analítica 0,1 mg de sensibilidad.

b) Insumos

- Bolsas de muestreo estériles (Nostoc)
- Membranas negras de filtración de $0,45\ \mu\text{m}$ de poro y de 48 mm de diámetro
- *Pads* de filtración.
- Pinza de acero inoxidable.
- Monitores para filtración
- Kitasato.
- Mechero

c) **Medios de Cultivo**

- Mineral Salts Medium Agar (MSMAgar)
- Agua destilada estéril
- Gas Butano (puede ser una mezcla de n-butano e isobutano) mín. 95%.

2.2.2. Procedimiento general de trabajo

A igual que la extracción de las muestras, el procesamiento de las mismas se realizó siguiendo el procedimiento desarrollado por Larriestra y colaboradores (Larriestra et al., 2010). El mismo se llevó a cabo durante los meses de mayo y junio en el Laboratorio Proanálisis, Buenos Aires, Argentina.

a) **Preparación del homogenato:**

Utilizando una balanza de mesada se colocó en bolsa Nostoc entre 45 y 50gr de agua destilada estéril. Para realizar la dilución 1/10, el valor masado de agua se dividió entre 0,9. Con ayuda de espátula previamente esterilizada, se colocó la muestra de suelo hasta alcanzar la masa deseada. Cuidadosamente se disolvieron los grumos, y se agitó vigorosamente durante 20 segundos (Fig. 7).



Figura 7: Bolsas Nostoc conteniendo los homogenatos (dilución 10^{-1})

b) Realización de diluciones:

Todas las muestras se diluyeron a $1/20$. Un mililitro del homogenato se resuspendió en nueve mililitros de agua destilada estéril (Fig. 8).



Figura 8: Preparación de las diluciones

c) **Preparación de monitores**

En todos los monitores de filtración se colocó previo a la membrana, un *pad* previamente esterilizado para retener las partículas más gruesas que pueda contener la muestra.

d) **Filtración**

Se colocó en cada monitor entre 30 y 40ml de agua destilada estéril. Se homogenizó la muestra diluida por inversión y vortex y se descargaron 100µl dentro de cada monitor. Se homogenizó cuidadosamente. Se colocó el monitor en el kitasato y se filtró con ayuda de bomba de vacío (Figs. 9 y 10). Cada muestra se procesó por duplicado.



Figura 9: Monitores.



Figura 10: Filtración.

e) **Sembrado**

Luego del filtrado, se retiró el monitor del kitasato y el *pad* se descartó. La membrana de filtración se colocó sobre placa de petri de 60mm conteniendo medio MSM-Agar, cuidando que la misma quede con la menor cantidad de aire englobado (Fig. 11).

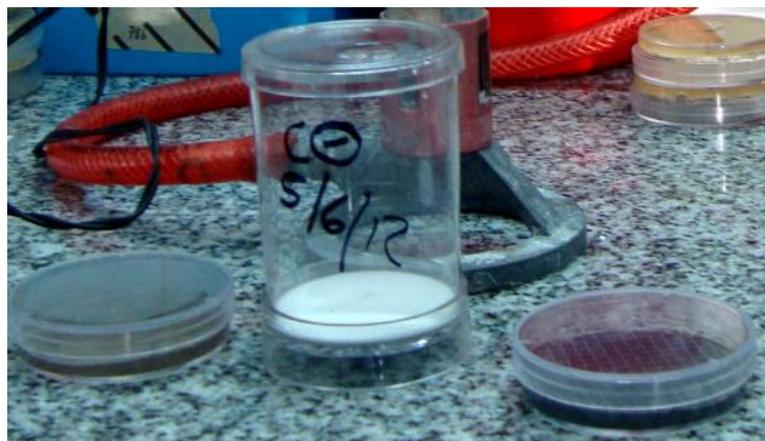


Figura 11: Siembra de filtro en medio MMS

f) Generación de atmósferas de incubación

Atmósfera con butano

Las placas con la membrana inoculada se colocaron en jarra de anaerobiosis con válvula. El contenedor se cerró herméticamente y se conectó a equipo generador de vacío con vacuómetro. Primeramente se generó vacío hasta que la presión en el contenedor cayó un 40% respecto de la presión atmosférica, y posteriormente se inyectó gas butano hasta restablecer la presión atmosférica. (La atmósfera generada tuvo una concentración final de 40% butano aproximadamente) (Fig.12).

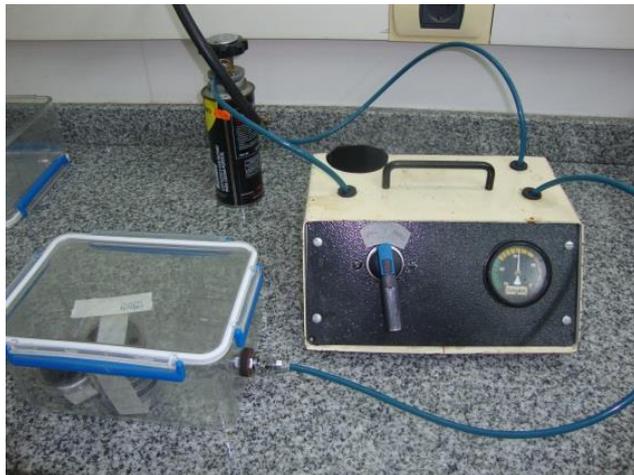


Figura 12: Generación de atmósfera de butano

Atmósfera sin butano

Para evaluar la posibilidad de que las bacterias metabolizaran otra fuente de carbono diferente al butano, se realizó un control paralelo en atmósfera sin butano. De la misma manera que en el punto anterior, las

placas sembradas se disponen en jarra de anaerobiosis con válvula. El contenedor se cierra herméticamente y se conecta a equipo generador de vacío. Se generó vacío hasta que la presión en el contenedor cayó un 40% respecto a la presión atmosférica.

g) Condiciones de Incubación

Ver 2.2.3. Plan de trabajo.

h) Observación macro y microscópica de los microorganismos

En algunos casos fue necesaria la observación microscópica para no incluir en el recuento escasas colonias fúngicas que se desarrollaron sobre las membranas.

i) Interpretación de resultados

Finalizada la incubación se realizó el recuento estimativo del número de ufc/g de muestra y se promediaron los valores de cada duplicado.

2.2.3. Plan de trabajo

En base a los resultados obtenidos en el primer ensayo se entendió necesario procesar nuevamente las muestras, con la realización de

controles adicionales no incluidos en el protocolo original. Los mismos se detallan a continuación.

a) **Primer ensayo**

En este primer ensayo se procesaron las 15 muestras extraídas en el Bloque Clara, el control LAMA, el control extraído en la refinería de La Teja y el control extraído en Florida. También se incubó como control una cepa aislada perteneciente al género *Pseudomonas* proporcionada por el laboratorio.

Todas las muestras y los controles se incubaron en atmósfera con butano, en condiciones de oscuridad a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 9 días (Fig. 13).

b) **Segundo ensayo**

El segundo ensayo incluyó el procesamiento de las 15 muestras extraídas en el Bloque Clara, el control LAMA, el control extraído en la refinería de La Teja, el control extraído en Florida y un control extraído de una maceta del laboratorio. Nuevamente se incubó como control la misma cepa aislada perteneciente al género *Pseudomonas*. En esta ocasión se creyó pertinente realizar un control paralelo en atmósfera sin butano e incubar las muestras por menos días.

Incubación en atmósfera con butano

Todas las muestras y los controles se incubaron en atmósfera con butano, en condiciones de oscuridad a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 5 días (Fig. 13).

Incubación en atmósfera sin butano

Como control se utilizó: una muestra del bloque Clara, el control LAMA, el control extraído en Florida y la *Pseudomonas sp.* Estas muestras se incubaron en atmósfera sin butano, en condiciones de oscuridad a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 5 días.

En todos los ensayos las muestras y los controles se procesaron por duplicado. Se realizó un control de materiales utilizando un blanco sólo con agua destilada (sin inoculación de muestra).



Figura 13: Incubación de muestras

3. RESULTADOS

3.1. Primer ensayo

Luego de la primera incubación en atmósfera con butano, todas las placas exhibieron abundante desarrollo con recuentos que se encontraron entre 10^5 y 10^6 ufc/g de muestra (Fig. 14).

Asimismo, se pudo constatar macro y microscópicamente que la composición de las comunidades era variable; sin embargo, no se encontró ninguna correlación evidente con la procedencia de las muestras.

Mientras el blanco no exhibió crecimiento, el control negativo extraído en Florida no mostró diferencias evidentes en cuanto al número de ufc/g de muestra respecto a los controles positivos. Al igual que las muestras, los controles exhibieron un desarrollo de entre 10^5 y 10^6 ufc/g. La cepa control de *Pseudomonas sp.* se desarrolló regularmente.

Los resultados duplicados fueron coherentes en todos los casos.



Figura 14: Crecimiento de las colonias luego de 9 días de incubación en atmósfera con butano.

3.2. Segundo ensayo

3.2.1. Incubación en atmósfera con butano

Si bien pudo observarse diferencias macro y microscópicas en la composición de las comunidades, no se observaron diferencias de orden en la cantidad de colonias desarrolladas, ni entre las muestras ni entre los controles.

Todas las muestras exhibieron abundante desarrollo luego de 5 días de incubación en atmósfera de butano. El número de colonias promedió entre 10^5 y 10^6 ufc/g de muestra para cada una de ellas. Todos los controles ya probados anteriormente y el control negativo extraído de la maceta desarrollaron promediamente entre 10^5 y 10^6 ufc/g.

El blanco no exhibió crecimiento y la cepa control de *Pseudomonas sp.* exhibió un desarrollo regular.

Los duplicados fueron coherentes entre ellos.

3.2.2. Atmósfera sin butano

Las cuatro muestras incubadas en vacío (muestra número 7 extraída sobre la transecta, la *Pseudomonas sp.*, el control positivo LAMA y el control negativo Florida) exhibieron similar desarrollo en número y morfología de las colonias a su contraparte incubada en atmósfera de butano. El recuento para el control LAMA, control negativo Florida y la muestra número 7 fue nuevamente de entre 10^5 y 10^6 ufc/g de muestra.

4. DISCUSIÓN

4.1. Primer ensayo

Durante el análisis de resultados de los recuentos bacterianos de la primera incubación, se constató el control negativo extraído en Florida exhibió un número de ufc tan elevado como el control positivo.

Se descarta la posibilidad de que una fractura estuviese filtrando gases desde una posible acumulación en el subsuelo ya que no existe cuenca sedimentaria en esta zona, por estar en un área de basamento cristalino, como se aprecia en el mapa geológico de Uruguay (Bossi y Ferrando, 2001). Sin embargo por el hecho de que la muestra se extrajo en las proximidades de la ruta 5, no tenemos total certeza de que la muestra estuviese ausente de hidrocarburos.

La incubación del blanco, que no exhibió desarrollo alguno, demostró que tanto el agua, como el medio de cultivo y el resto de los materiales se encontraban correctamente esterilizados.

Algunos autores consideran que uno de los problemas de los métodos dependientes del cultivo radica en distinguir aquellos microorganismos que naturalmente consumen hidrocarburos como parte de su metabolismo basal, de aquellos que bajo las condiciones del ensayo son capaces de activar nuevas vías metabólicas (plasticidad fenotípica) (Philp y Crisp, 1981).

En un sistema de cultivo en medio no renovado, se distinguen cuatro fases del crecimiento microbiano: fase de latencia, exponencial, estacionaria y fase de muerte. En la fase de latencia las células, a pesar de tener un metabolismo activo, no se dividen. Esta fase precede la fase exponencial, en la que cada célula se divide para dar origen a dos células, y su duración varía dependiendo de la procedencia del cultivo y de las condiciones de crecimiento. La síntesis del equipo enzimático necesario para la división celular en las condiciones del ensayo, supone un retraso en el crecimiento y en consecuencia una fase de latencia más larga en comparación con aquellas poblaciones que ya poseen los componentes esenciales en esas condiciones (Madigan et al., 2004).

Teniendo en cuenta esto, la duración de esta fase podrá variar entre las poblaciones dentro de la misma muestra dependiendo de si deben o no sintetizar el equipo enzimático necesario para metabolizar el butano. Un rápido pasaje a la fase exponencial (fase de división celular) podría ser indicativo de que el metabolismo de los hidrocarburos ocurre *in situ*.

Por el contrario, la observación de una prolongada fase de latencia antes de la degradación de los hidrocarburos podría indicar que el fenotipo es coincidente y no indicativo de la existencia de hidrocarburos en el ambiente muestreado (Philp y Crisp, 1981, Hubert y Judd, 2010).

Debido a que el recuento del control negativo fue tan elevado como el de los controles positivos, no fue posible validar el ensayo. Se procedió entonces a repetir todo el ensayo.

4.2. Segundo ensayo

El procesamiento de las muestras se realizó exactamente igual que la primera vez. A fin de evitar una prolongada fase de latencia, en lugar de incubar por 9 días, la incubación fue de 5 días. Este segundo ensayo también incluyó un control negativo adicional que no arrojara dudas sobre la posibilidad que estuviese contaminado con hidrocarburos (la muestra se extrajo de una maceta del laboratorio). Finalmente, con el objetivo de descartar la presencia de otra fuente de carbono, la repetición del experimento incluyó una incubación en paralelo en atmósfera sin butano.

4.2.1. Incubación en atmósfera con butano

Los resultados luego de 5 días de incubación, fueron consistentes con la primera incubación y no por haber incubado menor cantidad de días, los recuentos fueron menores. Al igual que en el primer ensayo, no hubo diferencias de orden entre los controles positivos y negativos. En particular el recuento de la muestra tomada de la maceta fue tan elevado como el de la muestra contaminada con hidrocarburos.

4.2.2. Incubación en atmósfera sin butano

El hecho de haber obtenido crecimiento en las muestras que se incubaron sin butano, es inconsistente con el fundamento de la técnica que establece que sólo se desarrollarán aquellas capaces de metabolizar el gas (Larriestra et al., 2010). Cabe mencionar que en este caso los recuentos fueron tan elevados como sus contrapartes incubadas con butano. El control de *Pseudomonas sp.* se desarrolló normalmente. Estos resultados invalidaron definitivamente cualquier otro resultado anterior, y dejaron de manifiesto que en el sistema existía al menos otra fuente de carbono, diferente del butano, que estaba siendo utilizada por los microorganismos.

4.3. Posibles fuentes de carbono

4.3.1. Fuentes inorgánicas

Teniendo en cuenta que en ningún caso las atmósferas generadas en este trabajo estuvieron 100% desprovistas de aire, no podemos descartar que aquellos microorganismos con capacidad de fijar CO₂ atmosférico y utilizarlo para biosíntesis (autotrofia), lo hayan logrado hacer en las condiciones del ensayo (Gallego y Quero, 1949).

Sabiendo que las muestras se incubaron siempre en oscuridad y suponiendo que el medio no contenía materia orgánica, la fuente de energía pudo ser provista por oxidación de compuestos inorgánicos

presentes en el medio de cultivo, el agua o la muestra, con oxígeno como aceptor final de electrones u otro aceptor diferente (por ejemplo: NH_4^+ , H_2 , H_2S , Fe^{+2}) (Tarlera, 2015).

4.3.2. Fuentes orgánicas

Entre las fuentes más comunes que se puede encontrar en la literatura se destaca la presencia de materia orgánica existente en la muestra de suelo (Philp y Crisp, 1981; Larriestra et al., 2010) y la presencia de impurezas en el agar (Corona et al., 2005; Fernández et al., 2006).

Los métodos utilizados para eliminar la materia orgánica en este trabajo fueron la dilución y filtración (Larriestra et al., 2010). Sin embargo, para el caso particular de estas muestras, las diluciones realizadas y la filtración pudieron no haber sido suficientes. Por lo tanto, no se descarta la posibilidad de que restos de materia orgánica contenida en las muestras hayan permanecido hasta la siembra. En este punto, hubiese sido pertinente el repique de las colonias al mismo medio de cultivo y la incubación en iguales condiciones.

Sin embargo, el hecho de la cepa control del género *Pseudomonas* se haya desarrollado con normalidad excluye la posibilidad de que únicamente la materia orgánica contenida la tierra haya servido como fuente de carbono y lleva a pensar en que hubo otra fuente alternativa en el medio de cultivo (y/o en la atmósfera como se discutió en el apartado

anterior). Se ha propuesto que el agar bacteriológico posee impurezas que pueden servir como fuente de carbono para el desarrollo bacteriano (Fernández et al., 2006). Los mismos autores recomiendan la utilización de agar noble por ser de mayor calidad y pureza que el agar bacteriológico.

4.4. Consideraciones para la utilización esta técnica

Dado la aparente baja complejidad de esta técnica y bajos costos económicos, sería posible realizarla en laboratorios nacionales. Sin embargo, para obtener resultados confiables resulta fundamental la clara identificación de la o las fuentes de carbono que fueron responsables del crecimiento bacteriano en este estudio.

Teniendo en cuenta las posibles fuentes de carbono ya discutidas en este trabajo, las acciones a tomar incluirían:

- Extraer la muestra a mayor profundidad, tendiendo hacia una menor concentración de materia orgánica.
- Realizar más lavados para minimizar la cantidad de fuente de carbono soluble.
- Utilizar un *pad* de filtración adicional para retener las partículas más gruesas.
- Utilizar agar noble en lugar de agar bacteriológico, ya que este último posee mayor contenido de impurezas.

- Generar una atmósfera en la que el butano desplace totalmente al aire, para asegurar la ausencia de bacterias autótrofas.

Asimismo, para asegurar la confiabilidad de los resultados se recomienda, por un lado la inoculación de cepas de referencia oxidantes de hidrocarburos, a modo de control positivo (tal como hicieron Rasheed et al., 2014). De modo similar, la utilización de cepas de referencia no oxidantes de hidrocarburos puede resultar igualmente útil.

Por otro lado, al igual que se hizo en este trabajo, se recomienda incluir en el protocolo de trabajo el control de crecimiento en atmósfera sin butano.

4.5. Consideraciones generales sobre el método de prospección microbiológica

Se han descrito numerosas metodologías similares a la utilizada en este trabajo que, a través de la detección y cuantificación de bacterias oxidantes de hidrocarburos, podrían contribuir al MPOG (Davis et al., 1958; Brown Lewis, 1962; Gonzales-Prevatt y Munnecke, 1992). Recientemente, se han desarrollado métodos que incluyen técnicas moleculares enfocadas a detectar aquellas poblaciones capaces de metabolizar cadenas cortas de hidrocarburos, las cuales están estrechamente vinculadas a la prospección de gas y petróleo (Sleat y Hatton, 2010; Chan, 2010; Zhang et al., 2010; Xu et al., 2013; Zhang et

al., 2014a; Rasheed et al., 2015). Sin embargo, la escasa abundancia de genes catabólicos en la naturaleza sumado al complejo genético del *background* en el cual se encuentran, son un obstáculo a la hora de trabajar con estos métodos (Miqueletto et al., 2011).

Finalmente, al igual que con los métodos convencionales, la plasticidad fenotípica es un problema a la hora de interpretar los resultados. Si bien se han descrito técnicas dirigidas a monitorear la expresión de genes involucrados en la degradación de hidrocarburos (Yergeau et al., 2009) que podrían contribuir al MGOP, quedaría aún por definir el origen de los gases que pudiesen estar promoviendo la expresión de los genes. La emisión de compuestos orgánicos volátiles por parte de las plantas (Laothawornkitkul et al., 2009), el origen microbiológico de los mismos (Hinrichs et al., 2006) y las interacciones ecológicas que con ellos ocurren en el suelo (Wenke et al. 2010) terminan por dificultar aún más la aplicación de estos métodos. Por este motivo pareciera poco probable que sólo con la prospección microbiológica pudiese alcanzarse resultados confiables.

La contraparte de la búsqueda de bacterias en suelo, consiste en la identificación y cuantificación directa de los hidrocarburos gaseosos de cadena corta adsorbidos en suelo superficial. Esta técnica permite además de conocer la existencia de gases en suelo, determinar si los hidrocarburos detectados en la superficie están genéticamente relacionados, estuvieron afectados secundariamente durante su migración

desde el subsuelo, y si han sido generados termogénicamente (Srinivas et al., 2012). Los mapas integrados de las anomalías en concentración de los gases y bacterias oxidantes de hidrocarburos han mostrado tendencias inversas. Se ha observado que la existencia de bacterias oxidantes de hidrocarburos sobre una acumulación de estos, provoca la disminución de la concentración de gases en suelo superficial debido a que los mismos son consumidos por estos microorganismos (Rasheed et al., 2008; Naudé et al., 2011; Rasheed et al., 2014.)

5. CONCLUSIONES

A pesar de que se logró reproducir con exactitud la técnica microbiológica utilizada previamente para el análisis de muestras de suelo en nuestro territorio, no se pudo validar el experimento y por lo tanto no fue posible detectar bacterias oxidantes de butano en suelo superficial del Bloque Clara.

Por este motivo, no fue posible la comparación de los resultados obtenidos en este trabajo, con aquellos informados durante la campaña 2011.

Este trabajo arroja dudas sobre los recuentos de bacterias butanotróficas obtenidos anteriormente con la misma técnica, que sugerían la existencia de hidrocarburos en la zona de estudio. Sin embargo, en base a los resultados aquí obtenidos no se puede sugerir ni la existencia ni la ausencia de los mismos en dicha zona (Bloque Clara).

Esta técnica no debería ser utilizada como método prospectivo sin antes ser puesta a punto teniendo en cuenta las condiciones ecológicas locales (suelo, clima, etc.) del territorio uruguayo.

Este trabajo pone en evidencia la importancia de realizar controles cada vez que realizamos una técnica. Los mismos deben incluirse siempre, ya que cada experimento es diferente.

A raíz de los resultados de este trabajo, la técnica se encuentra en revisión por parte del Laboratorio Proanálisis S.A.

Finalmente, el origen biológico de compuestos volátiles en suelo sumado a la plasticidad fenotípica de los microorganismos, que sin duda dificultan la especificidad de esta técnica, llevan a pensar que sería poco probable que el método de prospección microbiológica se convierta en una herramienta confiable para la exploración petrolera.

6. BIBLIOGRAFÍA

Anadón, E. (2013). El abecé de los hidrocarburos en reservorios no convencionales. Instituto Argentino del Petróleo y del Gas. Buenos Aires.

Augusto V.A., Souza-Filho C.R., Almeida-Filho R. *Caracterização de Exsudações de Hidrocarbonetos na Bacia do São Francisco-MG por meio de Imagens ASTER*. En: XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, 2005, Goiânia. Actas: 1733-1740.

Batista-García, R. A., Quesada-Quintero, A. L., Sánchez-Reyes, A., López-Guerra, S., y Domínguez-Sardiñas, Z. *Microbiología y biotecnología aplicadas a la exploración y producción petroleras*. Revista CENIC. Ciencias Biológicas, 2011; 42:35-41.

Bossi, J., y Lorenzo, F. Carta geológica del Uruguay: a escala 1/500.000. Versión 2.0 2001.

Brown Lewis, R. Hydrocarbon prospecting. Patente US 3033761. Google Patents. 1962. Tomado de: <https://www.google.com/patents/US3033761> [Consulta: 12 de octubre de 2015].

Chan, B. J. (2011). *PCR Primers for the Detection of Propane and Butane-Oxidizing Microorganisms*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas.

Facultad de California, Universidad Politécnica del Estado, San Luis Obispo. 2011:1-65.

Conti, B.; Soto, M.; Rodríguez, P.; Marmisolle, J.; Morales, E.; de Santa Ana, H. *Primeros resultados geológicos-geoquímicos en la región central de la Cuenca Norte, Uruguay*. VII Congreso Uruguayo de Geología, Montevideo, Uruguay 2013.

Corona, M., Bonilla, M., y Soubes, M. *Respuesta de microorganismos a los contaminantes ambientales el ejemplo de la Pseudomonas putida ML2*. Agrocienca. 2005; 9:259-268.

De Santa Ana, H., Goso, C., Daners, G.. Cuenca norte: estratigrafía del Carbonífero–Pérmico. En: Veroslavsky, G., Ubilla, M., Martínez, S. *Cuencas Sedimentarias de Uruguay. Geología, Paleontología y Recursos Naturales*. Montevideo, Uruguay, DIRAC.2006: 147-208.

Fernández Linares, L. C., Rojas Avelizapa, N. G., Roldán Carrillo, T. G., Ramírez Islas, M. E., Zegarra Martínez, H. G., Uribe Hernández, R., Reyes Ávila, R. J. Flores Hernández, D. y Arce Ortega, J. M.. *Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados*. Instituto Mexicano del Petróleo, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, México. 2006: 180p.

Gallego y Quero, F. *Compendio de microbiología del suelo. Segunda parte: bacterias del suelo*. Instituto forestal de Investigaciones y experiencias. Madrid, 1949. Tomado de: http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/fondo/pdf/4904_1_2_all.pdf [Consulta: 20 de noviembre de 2015].

Gonzales-Prevatt, V. y Munnecke, D. M. *Microbiological oil prospecting*. Google patents. Patente US 5093236. 1992. Tomado de: <https://www.google.com/patents/US5093236> [Consulta: 10 de octubre de 2015].

Hinrichs, K. U., Hayes, J. M., Bach, W., Spivack, A. J., Hmelo, L. R., Holm, N. G., Jhonson C. G. y Sylva, S. P. *Biological formation of ethane and propane in the deep marine subsurface*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006; 103: 14684-14689.

Hubert, C., y Judd, A. Using microorganisms as prospecting agents in oil and gas exploration. En: *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. BerlinHeidelberg, Springer-Verlag. 2010: 2711-2725.

Laothawornkitkul, J., Taylor, J. E., Paul, N. D., y Hewitt, C. N. *Biogenic volatile organic compounds in the Earth system*. New Phytologist. 2009; 183: 27-51.

Larriestra Geotecnologías. 2011a. *Exploración geoquímica superficial. Propuesta técnica*. [Informe Interno ANCAP]

Larriestra Geotecnologías. 2011b. Geoquímica Superficial. Tacuarembó, Pepe Núñez y Belén Salto. Cuenca Noroeste. República Oriental del Uruguay, ANCAP. Informe Final. 2011:32 p [Informe Interno ANCAP]

Larriestra, F., Larriestra C., Lanussol D. , y Davies N. Search and Discovery Article. Surface Geochemical Exploration Using Bacterial and Plant Bioindicators, Northern Neuquen Basin, Argentina. Search and Discovery Article. 2013 Tomadp de: http://www.searchanddiscovery.com/documents/2013/41194larriestra/ndx_larriestra.pdf [Consulta: 15 de febrero de 2015].

Larriestra, F., Vecchio, M., Ferrer, F., y Larriestra, C. *A Modified Method of Microbial Analysis for Oil Exploration and its Application on Five Basins of Southern and Western Argentina*. Search and Discovery Article. 2010. Tomado de: http://www.searchanddiscovery.com/documents/2010/40672larriestra/ndx_larriestra.pdf [Consulta: 2 de febrero de 2015].

Madigan, M. T., Martinko, J. M., y Parker, J. *Crecimiento Microbiano*. En: Madigan, M. T., Martinko, J. M., y Parker, J. *Brock. Biología de los microorganismos*. 10^{ed}. Madrid, Pearson. 2004:137-165.

Magoon, L. B., y Beaumont, E. A. Petroleum Systems. Adaptado y revisado para presentación on line de: Magoon L. y Beaumont E. A. Petroleum Systems. En: Edward A. *Exploring for Oil and Gas Traps*. Treatise of Petroleum Geology, Handbook of Petroleum Geology.

Beaumont y Norman H. Foster, eds., 1999, Cap.3. Tomado de <http://www.searchanddiscovery.com/pdfz/documents/beaumont02/images/beaumont02.pdf.html> [Consulta: 10 de setiembre de 2015].

McCarthy, K., Rojas, K., Niemann, M., Palmowski, D., Peters, K., y Stankiewicz, A. *Basic petroleum geochemistry for source rock evaluation*. Oilfield Review, 2011; 23: 32-43.

Miqueletto, P. B., Andreote, F. D., Dias, A. C., Ferreira, J. C., dos Santos Neto, E. V., y de Oliveira, V. M. *Cultivation-independent methods applied to the microbial prospection of oil and gas in soil from a sedimentary basin in Brazil*. AMB express. 2011; 1: 35.

Naude, Y., Van Rooyen, M. W., y Rohwer, E. R. *Evidence for a geochemical origin of the mysterious circles in the Pro-Namib desert*. Journal of arid environments. 2011; 75: 446-456.

Philp, R. P., y Crisp, P. T. *Surface geochemical methods used for oil and gas prospecting—a review*. Journal of Geochemical Exploration. 1982; 17: 1-34.

Powell S.M., Ferguson S.H., Bowman J.P., Snape I. *Using real-time PCR to assess changes in the hydrocarbon-degrading microbial community in Antarctic soil during bioremediation*. Microb Ecol.; 2006; 52:23-32.

Prasanna, M. V., Rasheed, M. A., Patil, D. J., Dayal, A. M., & Reddy, B. R. *Geo-microbiological studies in conjunction with different geo-scientific*

studies for the evaluation of hydrocarbon prospects in Proterozoic Vindhyan Basin, India. Journal of Petroleum Science and Engineering. 2013;108: 239-249.

Rasheed, M. A., Dayal, A. M., y Patil, D. J. Microbial Techniques for Hydrocarbon Exploration. En: Vladimir Kutcherov y Anton Kolesnikov. *Hydrocarbon*. 2013: Cap. 9.

Rasheed, M. A., Hasan, S. Z., Rao, P. S., Boruah, A., Sudarshan, V., Kumar, B., & Harinarayana, T.. *Application of geo-microbial prospecting method for finding oil and gas reservoirs.* Frontiers of Earth Science. 2015; 9: 40-50.

Rasheed, M. A., Lakshmi, M., Kalpana, M. S., Dayal, A. M., y Patil, D. J. *The microbial activity in development of hydrocarbon microseepage: an indicator for oil and gas exploration.* Geosciences Journal, 2013; 17: 329-338.

Rasheed, M. A., Lakshmi, M., Rao, P. L. S., Patil, D. J., Dayal, A. M., y Sudarshan, V. *Relevance of Pentane-and Hexane-Utilizing Bacterial Indicators for Finding Hydrocarbon Microseepage: A Study from Jamnagar Sub-basin, Saurashtra, Gujarat, India.* Natural resources research. 2012; 21: 427-441.

Rasheed, M. A., Lakshmi, M., Rao, P. S., Kalpana, M. S., Patil, D. J., y Dayal, A. M.. *Evaluation of Petroleum Prospects using Geo-microbial*

prospecting method from Seabed Sediment Samples of Gulf of Mannar, Kerala-Konkan offshore Basin, India. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 2014; 3: 281-295.

Rasheed, M. A., Veena Prasanna, M., Satish Kumar, T., Patil, D. J., y Dayal, A. M.. *Geo-microbial prospecting method for hydrocarbon exploration in Vengannapalli village, Cuddapah Basin, India.* Current Science. 2008; 95: 361-366.

Schumacher, D., Malizia, D., y Prestia, G. *Exploración geoquímica de superficie para petróleo y gas.* 2003. Tomado de: <http://biblioteca.iapg.org.ar/ArchivosAdjuntos/Petrotecnia/2003-3/Exploracion.pdf> [Consulta: 4 de setiembre de 2015].

Silvana Tarlera. Curso de microbiología general (2015) Clase 1: Metabolismo. Departamento de Biociencias, Cátedra de microbiología, Facultad de Química. UdelaR.

Sleat, R., y Hatton, R. *Microbiological detection method.* Google Patents. 2010. Tomado de: <https://www.google.com/patents/US20100279290> [Consulta: 30 de noviembre de 2015].

Soto, M.; Conti, B.; Morales, E.; Marmisolle, J.; Josefina, M. y de Santa Ana, H. *Primeros resultados geológicos, geoquímicos y estratigráficos en la región central de la Cuenca Norte, Uruguay.* XIX Congreso Geológico Argentino, 2 al 6 de junio de 2014, Córdoba.

Srinivas, C., Madhavi, T., Lakshmi, M., Mani, D., Kalpana, M. S., Patil, D. J., Dayal, M. A., y Raju, S. V.. *Geochemical characterization of adsorbed light gaseous alkanes in near surface soils of the eastern Ganga basin for hydrocarbon prospecting*. *Geochemistry International*. 2014; 52: 68-76.

Turkiewicz, A. *The role of microorganisms in the oil and gas industry*. *Rocznik Ochrona Środowiska*, 2011; 13: 227-239.

Wagner, M., Wagner, M., Piske, J., y Smit, R. Case histories of microbial prospection for oil and gas, onshore and offshore in northwest Europe. En: *Surface exploration case histories: Applications of geochemistry, magnetics, and remote sensing*. Dietmar Schumacher y Leonard A. LeSchack. *AAPG Studies in Geology*. 2002; 11: 453-479.

Wenke, K., Kai, M., y Piechulla, B. *Belowground volatiles facilitate interactions between plant roots and soil organisms*. *Planta*, 2010; 231: 499-506.

Wu, X. Y., Xu, X. M., Wu, C. F., Fu, S. Y., Deng, M. C., Feng, L., Yuan J. P. y Wang, J. HResponses of microbial communities to light-hydrocarbon microseepage and novel indicators for microbial prospecting of oil/gas in the Beihanzhuang oilfield, Northern Jiangsu, China. *Geomicrobiology Journal*. 2014; 31: 697-707.

- Xu, K., Tang, Y., Ren, C., Zhao, K., y Sun, Y. *Diversity and abundance of n-alkane-degrading bacteria in the near-surface soils of a Chinese onshore oil and gas field*. Biogeosciences. 2013; 10: 2041-2048.
- Yergeau, E., Arbour, M., Brousseau, R., Juck, D., Lawrence, J. R., Masson, L., Whyte, L. G., Greer, C. W. *Microarray and real-time PCR analyses of the responses of high-arctic soil bacteria to hydrocarbon pollution and bioremediation treatments*. Appl Environ Microbiol. 2009; 75:6258-6710.
- Zhang, C. Y., He, Z., Zhang, S., Yin, M. Y., Ning, Z., y Liu, Y. C. (2014b) *Quantitative significance of functional genes of methanotrophs and propanotrophs in soil above oil and gas fields, China*. Journal of Petroleum Science and Engineering. 2014; 120:170-176.
- Zhang, C. Y., He, Z., Zhang, S., Yin, M. Y., Ning, Z., y Liu, Y. C (2014a) *Oil-gas exploration method based on anomaly of light hydrocarbon oxidizing bacteria*. Patente CN 201410249530. Google Patents. 2014. Tomado de: <https://www.google.com/patents/CN103981277A?cl=en> [Consulta: 10 de octubre de 2015].
- Zhang, F., She, Y., Zheng, Y., Zhou, Z., Kong, S., y Hou, D. *Molecular biologic techniques applied to the microbial prospecting of oil and gas in the Ban 876 gas and oil field in China*. Applied microbiology and biotechnology. 2010; 86: 1183-1194.

ANEXO I

Composición y preparación del medio de cultivo

Medio Mineral Salado (MMS)

Composición por litro

| | |
|--|--------|
| Na ₂ HPO ₄ | 4.0 g |
| KH ₂ PO ₄ | 1.5 g |
| NH ₄ Cl | 1.0 g |
| MgSO ₄ . 7H ₂ O | 0.2 g |
| Ferric ammonium citrate..... | 5.0 mg |
| Solución Hoagland modificada de elementos traza..... | 1.0ml |

Solución Hoagland modificada de elementos traza

Composicion para 3.6 litros

| | |
|---|--------|
| H ₃ BO ₃ | 11.0 g |
| MnCl ₂ . 4H ₂ O | 7.0 g |
| AlCl ₃ | 1.0 g |
| CoCl ₂ | 1.0 g |
| CuCl ₂ | 1.0 g |
| KI..... | 1.0 g |
| NiCl ₂ | 1.0 g |
| ZnCl ₂ | 1.0 g |
| BaCl ₂ | 0.5 g |
| KBr..... | 0.5 g |
| LiCl..... | 0.5 g |
| Na ₂ MoO ₄ | 0.5 g |
| SeCl ₄ | 0.5 g |
| SnCl ₂ . 2H ₂ O | 0.5 g |
| NaVO ₃ . H ₂ O | 0.1 g |

Preparación de la solución modificada de elementos traza

Se prepara cada componente como una solución separada. Se disuelve cada sal en aproximadamente 100ml de agua destilada. Se combinan todas las soluciones y se lleva a 3.6 litros con agua destilada. Agitar antes de usar.

Preparación del medio

Agregar todos los componentes a agua destilada y llevar a 1 litro. Mezclar. Autoclavar por 15 minutos a 121°C y 1 atm. Ajustar pH a 7 ± 2 a 25°C.

ANEXO II

Ubicación geográfica de los sitios de muestreo

Tabla II-1: Referencia de muestreo.

| N° | X | Y | Z | Tipo de suelo | Tipo de muestreo | Referencia geográfica |
|----|--------|---------|-----|---------------------------------------|------------------|--|
| 0- | 569297 | 6245961 | 83 | Mixto, consolidado, sobre granito | Común | Ruta 5 Km 117 |
| 0+ | 570191 | 6140705 | 9 | Mixto, poco profundo | Perfil de suelo | Refinería de La Teja |
| 1 | 618762 | 6434073 | 107 | Arcilloso, consolidado | Común | Sobre transecta, en el pueblo Clara |
| 2 | 616750 | 6432954 | 109 | Arcilloso, consolidado | Común | Sobre transecta |
| 3 | 615698 | 6431879 | 127 | Arcilloso, muy consolidado | Común | Sobre transecta |
| 4 | 614564 | 6430877 | 128 | Arcilloso, consolidado | Común | Sobre transecta |
| 5 | 613448 | 6429890 | 134 | Arcilloso, consolidado | Común | Sobre transecta |
| 6 | 613222 | 6428371 | 127 | Arcilloso, consolidado | Común | Sobre transecta |
| 7 | 612326 | 6427179 | 117 | Arcilloso, consolidado | Común | Sobre transecta |
| 8 | 611046 | 6426409 | 125 | Arenoso, poco consolidado | Perfil de suelo | Sobre transecta |
| 9 | 609794 | 6425587 | 120 | Arenoso, poco consolidado | Perfil de suelo | Sobre transecta |
| 10 | 608506 | 6424820 | 108 | Arenoso, poco consolidado | Común | Sobre transecta |
| 11 | 607557 | 6423632 | 104 | Arenoso, poco consolidado | Común | Sobre transecta |
| 12 | 607055 | 6422249 | 106 | Mixto, poco consolidado | Perfil de suelo | Sobre transecta |
| 13 | 605963 | 6421157 | 125 | Mixto, consolidado, con carbonatos | Perfil de suelo | Sobre transecta |
| 14 | 604677 | 6420446 | 135 | Mixto, consolidado, con carbonatos | Común | Sobre transecta |
| 15 | 603483 | 6419561 | 144 | Mixto, consolidado | Común | Sobre transecta |

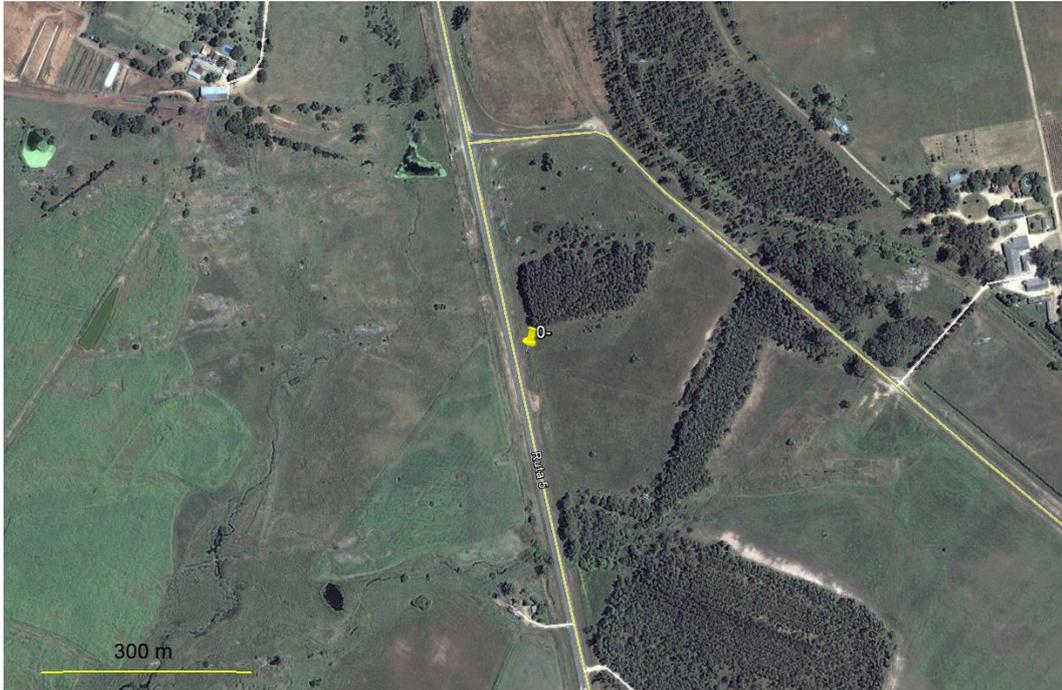


Figura II-1. Arriba: Sitio de extracción del control negativo, departamento de Florida. Abajo: Sitio de extracción del control positivo, refinería de La Teja (ANCAP), Montevideo. Imágenes tomadas de Google Earth.

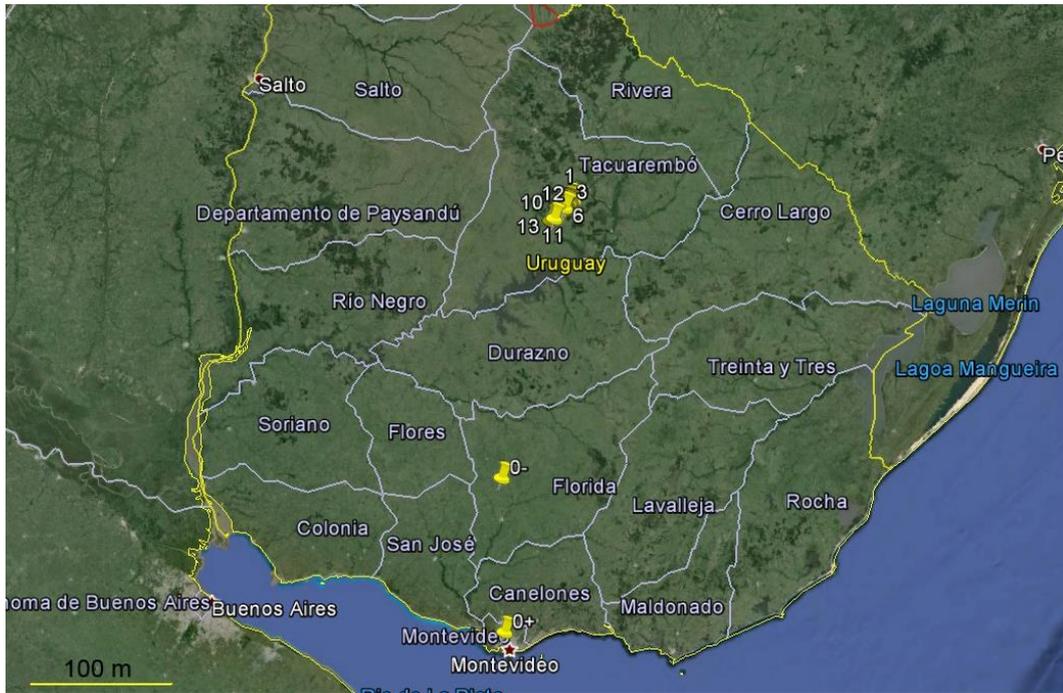


Figura II-2. En el mapa se observan todos los sitios muestreados del territorio uruguayo de los que se extrajo muestras para procesamiento en el laboratorio. Imagen tomada de Google Earth.