

Detección temprana de bacterias sulfato reductoras (SRB) por métodos potenciométricos

Robledo, Alejandro Javier* / Busalmen, Juan Pablo / Massazza, Diego Ariel**

INTEMA (CONICET/UNMdP) - Mar del Plata - Buenos Aires – Argentina

*Mail: *arobledo@patora.fi.mdp.edu.ar; ** diegomassazza@gmail.com*

Sinopsis

Las bacterias reductoras de sulfato (SRB, por sus siglas en inglés) son un grupo de microorganismos que utilizan el sulfato como aceptor final de electrones durante el metabolismo, lo que lleva a la generación de aniones de sulfuro.

Industrias como la producción del petróleo y del gas sufren enormes pérdidas económicas como consecuencia del crecimiento de SRB y la producción consecuente de sulfuro, debido a su participación en la corrosión influenciada microbiológicamente (MIC, por sus siglas en inglés).

El método prevalente para la detección de SRB en la industria es el ensayo del Número Más Probable (NMP), que puede requerir hasta 28 días para obtener resultados. En las últimas décadas, se han desarrollado diversos métodos (técnicas de microscopía, técnicas de biología molecular, técnicas enzimáticas, técnicas microbiológicas) con diferentes complejidades, costos y demandas de tiempo para identificar y monitorear SRB en entornos industriales. Sin embargo, el uso de equipos tecnológicamente avanzados y la necesidad de profesionales altamente calificados han obstaculizado su aplicación práctica en el campo en comparación con la técnica de NMP.

Este estudio presenta una metodología para la detección altamente sensible de la actividad metabólica de SRB en medios acuosos, basada en el seguimiento de cambios en el potencial de equilibrio de un electrodo de Ag/Ag₂S, causados por la presencia de sulfuro biogénico.

Se construyó el electrodo de Ag/Ag₂S y se evaluó su respuesta bajo diferentes condiciones de pH, medios de crecimiento y metabolismo microbiano. Evaluamos el sensor tanto como una unidad externa para pruebas de cultivo como un sensor de cultivo interno para monitoreo continuo. Se encontró que, en todos los tiempos de detección, el sensor se anticipó al NMP.

A través de ensayos de respuesta temporal, se vinculó efectivamente el crecimiento de un cultivo de SRB con los datos entregados por el sensor en un medio inoculado con un recuento celular cercano a extinción (10^2 SRB mL⁻¹), cuya actividad pudo identificarse en menos de 24 horas. Con estos datos, establecimos una estimación cuantitativa de SRB basada en las lecturas del sensor para un cultivo de laboratorio, que podría ser aplicable para una rápida estimación de microorganismos SRB en el campo.

Este enfoque innovador puede ser utilizado en campo con requisitos técnicos, profesionales y de equipos mínimos. El método puede disminuir el tiempo necesario entre los eventos de detección y la aplicación de medidas preventivas, como la dosificación de biocidas.

Introducción

Los microorganismos sulfato reductores (SRB) son un grupo de organismos anaerobios que se encuentran comúnmente en hábitats anóxicos. Estos microorganismos utilizan sulfato como aceptor final de electrones, resultando en la producción de sulfuro a través de la reducción disimilatoria del sulfato (Rabus et al., 2013). Junto con bacterias oxidantes de sulfuro, los SRB son cruciales para los ciclos globales del carbono y el azufre, contribuyendo en cerca del 50% de la mineralización del carbono orgánico en sedimentos marinos (Jørgensen, 1982). Además, los SRB son utilizados en aplicaciones biotecnológicas para tratar contaminantes industriales, recuperar metales preciosos y reducir sulfato en aguas y desechos industriales (Barton & Fauque, 2009; Hussain et al., 2016).

Los SRB son considerados organismos primordiales del planeta, estimándose su evolución hace 3.5 mil millones de años según las mediciones de isótopos de sulfuro (Shen & Buick, 2004). Este largo proceso evolutivo ha dotado a los SRB de características que les permiten habitar prácticamente todos los ecosistemas acuáticos, independientemente de la temperatura o salinidad (Rabus et al., 2013). En la reducción, los SRB requieren un donante de electrones, incluyendo azúcares, aminoácidos, alcoholes y aniones de ácidos orgánicos (acetato, butirato, fumarato, succinato, lactato, etc.), así como compuestos aromáticos y crudo de petróleo (Barton & Fauque, 2009; Hussain et al., 2016). Los SRB muestran una mayor afinidad por compuestos de bajo peso molecular como el lactato, ampliamente utilizado en experimentos de laboratorio (Serrano et al., 2020).

El sulfuro generado por estos microorganismos es relevante en diversas industrias, especialmente en petróleo y gas. Recientemente, Puentes-Cala et al. (2022) identificaron 52 trabajos relacionados con la caracterización de la población bacteriana en la industria del Oil & Gas, encontrando SRB en el 96% de los casos. El sulfuro en forma de H_2S es un tóxico letal comparable al cianuro (Patnaik, 2007). A concentraciones superiores a 20 ppm, su olor se vuelve imperceptible por fatiga olfativa, y exposiciones por encima de 300 ppm pueden ser mortales al impedir la respiración aeróbica y conducir a la asfixia (Aventaggiato et al., 2020). La administración de seguridad y salud ocupacional establece una cantidad máxima para la exposición aguda a este gas de 50 ppm por un tiempo máximo de 10 minutos (OSHA, s. f.).

Si bien existe una multitud de técnicas y métodos para detectar y cuantificar al sulfuro (Fig. 1), se ha remarcado desde hace varios años la necesidad de métodos simples que puedan usarse fácilmente en muestras “sucias” o en entornos de campo. Una de las posibles soluciones podría encontrarse en las técnicas electroquímicas para resolver este desafío (Lawrence, 2000).

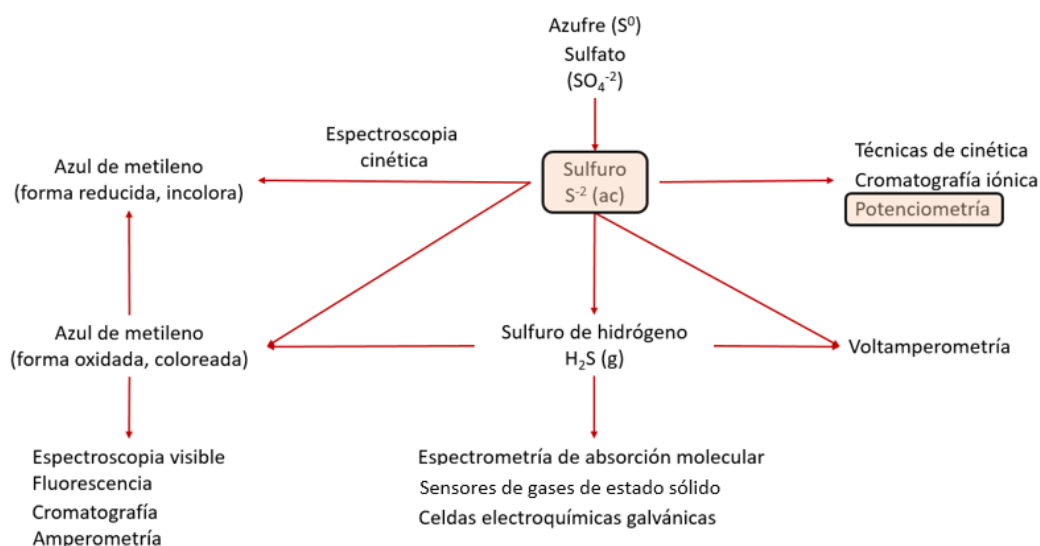


Fig. 1: Técnicas analíticas para la detección del sulfuro en sus distintas especies, se muestran resaltadas aquellas de interés en este trabajo. Traducido del inglés desde el trabajo de Lawrence et al. (Lawrence, 2000).

La problemática del sulfuro en la industria ha generado la realización y diseño de múltiples herramientas de diversas complejidades, costos y tiempos para la identificación y monitoreo de las SRB. La necesidad de la industria requiere de métodos que sean económicos, precisos, simples de utilizar y puedan ser realizados a campo con técnicas de baja complejidad (Puentes-Cala et al., 2022). Las herramientas que se han desarrollado hasta el momento pueden diferenciarse en cinco categorías de métodos indicadores de la presencia de MIC en la industria: *i) Técnicas de microscopía; ii) Técnicas de biología molecular; iii) Técnicas enzimáticas; iv) Técnicas microbiológicas; v) Sensores*

i) Técnicas de microscopía: Utilizadas en biología y metalurgia para observar y cuantificar células en superficies metálicas e identificar patrones de corrosión microbiológica. Incluyen técnicas de caracterización superficial (SEM-EDS, Raman, DRX) para identificar biofilms y productos de corrosión asociados a bacterias como el sulfuro de hierro (II) (FeS) (Puentes-Cala et al., 2022). Estas técnicas son semicuantitativas, requieren análisis ex situ, personal capacitado y equipos avanzados.

ii) Técnicas de biología molecular: PCR, qPCR y RT-qPCR son capaces de identificar bacterias reductoras de sulfato y otros grupos corrosivos. Son precisas y proporcionan resultados cualitativos y cuantitativos, pero requieren condiciones estériles, equipos especializados y personal capacitado. Pueden demorar de 15 a 30 días y no ofrecen información sobre el estado del sistema ni la tasa metabólica bacteriana. Su aplicación es limitada debido a su costo y requerimientos específicos (Al-Humam et al., 2021; Madrid et al., 2008; Upreti et al., 2015).

iii) Técnicas enzimáticas: Destaca la medición de Adenosín Trifosfato (ATP) mediante luminometría indica la actividad metabólica, aunque no diferencia entre bacterias corrosivas y otras del consorcio microbiano, ni entre bacterias activas e inactivas. Es menos costosa y proporciona resultados en horas. Puede realizarse in situ con equipo de complejidad media (N.-C. Yang et al., 2002).

iv) **Técnicas microbiológicas:** Principalmente, el método del número más probable (NMP) estima la presencia de SRB mediante cultivo en diluciones seriadas hasta extinción. Es frecuente en la industria para monitorear la MIC y guiar estrategias de control, pero demora 28 días en obtener resultados (NACE TM0194, 2014). Es menos costoso, pero su precisión es limitada y no asocia resultados con el daño al metal.

v) **Sensores:** Dispositivos para la detección temprana de SRB basados en la medición del sulfuro (S^{2-}) producido por su metabolismo. Utilizan cambios en las propiedades químicas, ópticas, electroquímicas y fotoelectroquímicas del sulfuro. Algunos dispositivos combinan nanotubos de óxido de zinc (ZnO) con cationes de cadmio (Cd^{+2}) para detectar SRB, formando sulfuro de cadmio (CdS) detectable fotoelectroquímicamente (Z. Yang et al., 2018a). Otros usan gel de agarosa con sulfato de cadmio que cambia de color en presencia de SRB (Z. Yang et al., 2018b). También existen dispositivos fotoelectroquímicos con complejos fluorescentes que se apagan en presencia de sulfuro, aunque el plomo (Pb^{+2}) es tóxico y susceptible a interferencias (Zheng et al., 2019). Se han explorado métodos químicos, como la separación de metabolitos de SRB mediante centrifugación y filtrado, aplicando azul de metileno bajo luz UV para detectar sulfuro mediante fluorescencia (Qi et al., 2012).

Estas soluciones técnicas varían en precisión, capacidad de análisis in situ y requerimientos de equipo y personal, lo que influye en el tiempo de obtención de resultados y su aplicabilidad.

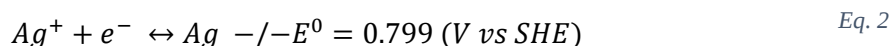
Por lo expuesto es clara entonces la necesidad de un método de detección temprana, que sea capaz de ser implementado in situ, cuyo requerimiento de experiencia técnica sea bajo y que permitan la resolución en un tiempo corto, sin la utilización de equipamiento costoso o de alta tecnología. Es deseable además que permitan detectar bajos niveles de actividad de los microorganismos, para disminuir el tiempo muerto entre el momento del monitoreo o la toma de muestras y la aplicación de las técnicas preventivas.

En este trabajo, desarrollamos un dispositivo sensor capaz de seguir la actividad metabólica de cultivos mediante la utilización de técnicas electroquímicas, específicamente de las técnicas potenciométricas como método auxiliar para la evaluación de parámetros biológicos de interés (sulfato consumido y crecimiento bacteriano).

Desarrollo

I) Química del sensor

En la potenciometría, se utiliza el potencial de circuito abierto (OCP) y su variación como un indicador de un proceso de interés, asociado con el elemento/situación que ha generado el cambio. En este caso, la reacción de interés se da entre el sulfuro y la plata siguiendo la ecuación 1, impulsada por la reacción de reducción del ion plata (Eq. 2) (Speight, 2016).



Como el potencial de equilibrio se encuentra determinado por la ecuación de Nernst, el OCP dependerá principalmente de la actividad del ion plata y el ion sulfuro. En la mayoría de los sistemas experimentales asociados a las SRB no se adiciona, ni es común encontrar plata soluble en los medios a sensar. Las concentraciones de las especies de interés estarán dadas por la Eq. 3:

$$K_{PS}(Ag_2S) = [S^{-2}][Ag^+]^2 \quad Eq. 3$$

El valor de K_{PS} para la sal de Ag_2S es muy pequeño, registrándose en 6.3×10^{-50} entre $18^\circ C$ y $25^\circ C$ (Speight, 2016) lo cual nos asegura que la sal generada no se disolverá significativamente en el medio a sensar y, que la cantidad de iones plata disueltos será despreciable para la mayoría de situaciones. Por lo anterior, el principal movilizador en el potencial registrado será la concentración de sulfuro. Este sulfuro aumentará en los ensayos a medida que se genere por la acción metabólica de los microorganismos sulfato reductores.

Si consideramos la química de la disolución del sulfuro, sabemos que al ser disuelto en un medio acuoso se genera la aparición de dos nuevas especies químicas el bisulfuro (HS^-) y el sulfuro de hidrógeno (H_2S) (Eq. 4).

$$S_{Tot}^{-2} = H_2S + HS^- + S^{-2} \quad Eq. 4$$

Si bien estas tres especies coexisten en todo momento, la fracción que representan cada una sobre el total se encuentra determinada por el pH del medio. La representación de esta especiación se muestra en la Fig. 2. La presencia de la especie sulfuro libre (S^{-2}) sobre el total de sulfuro disuelto (S_{Tot}^{-2}) que llamaremos fracción de sulfuro libre (S_{Libre}^{-2}) disminuye de manera logarítmica a medida que el pH se encuentra por debajo de 10.

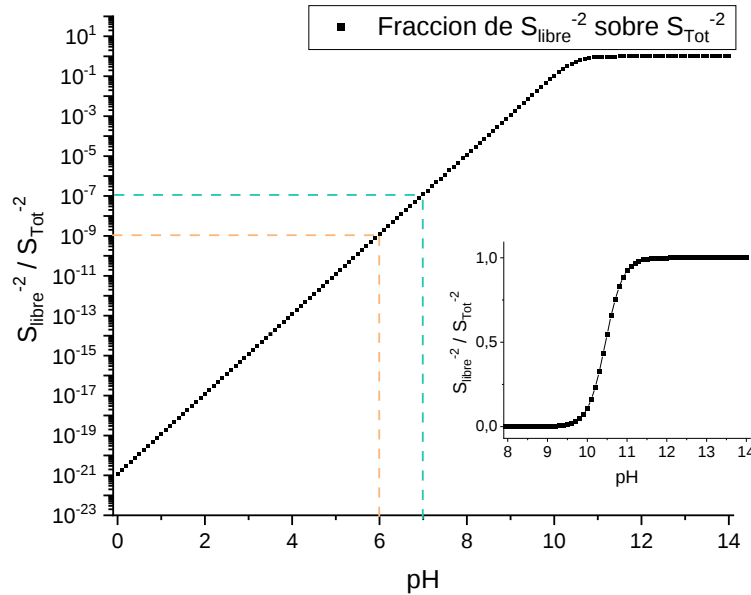


Fig. 2: Fracción del sulfuro libre (S_{Libre}^{-2}) sobre el sulfuro total (S_{Total}^{-2}), en función del pH para soluciones acuosas. En pequeño se muestra la zona no logarítmica de la ecuación. En color y punteado se muestran los pH de interés para este trabajo, siendo pH 6 (anaranjado) y pH 7 (azulado).

Esta especiación es aprovechada por los electrodos comerciales de Ag/Ag_2S , como el "Orion Silver/Sulfide Electrode" para el sensado analítico del sulfuro. Estos electrodos deben ser utilizados en un buffer SAOB (*Sulphide anti-oxidant buffer*), con un pH mayor a 12 y en

concentraciones de sulfuro superiores a 10^{-5} mol L⁻¹. El medio SAOB es un *buffer* de pH alcalino basado en NaOH que contiene un secuestrante de oxígeno (ácido ascórbico) para evitar la oxidación del sulfuro (S⁻²) y, por lo tanto, prevenir errores en la medición (Bock & Puff, 1968; Thermo Corporation, 2003).

Estas estrategias, como la eliminación del oxígeno del medio y/o la adición de secuestrantes de oxígeno, han sido utilizadas en bibliografía para reducir el límite de detección hacia valores de sulfuro total de $10^{-6}/10^{-5}$ mol L⁻¹ (Crombie et al., 1975). En presencia de concentraciones bajas del analito (S⁻²), el sensor requiere de un tiempo más prologando para encontrar el valor estable de potencial. Durante este periodo, la concentración de la especie disminuye al ser oxidada y, por lo tanto, aumenta la incertidumbre de las mediciones (Crombie et al., 1975; Enning, 2012; Müller & Stierli, 1999; Thermo Corporation, 2003).

Este proceso de oxidación se produce en la especie libre (S⁻²), la cual suele ser mayoritaria a los pH de bibliografía (pH>12), forzando a eliminar la molécula de O₂ del medio a evaluar. Ahora bien, si se trabaja en rangos de pH en donde la fracción de S⁻² es muy baja en comparación con las otras dos especies (H₂S y HS⁻), se produce un efecto *buffer* que continuamente repone la cantidad de sulfuro oxidado debido a la disociación de las especies mayoritarias. Esto permite realizar la medición en los pH usuales de un medio de cultivo para SRB (entre 6 y 8), sin preocuparnos por el oxígeno del entorno. A este pH, sin embargo, la fracción de sulfuro libre que es capaz de interactuar con el electrodo disminuye varios ordenes de magnitud (desde pH 12) por la especiación de la especie (recordar la Fig. 2) y es posible obtener pérdida de sulfuro total (S_{Tot}⁻²) en forma de H₂S gaseoso (Müller & Stierli, 1999).

Encontramos entonces la combinación de dos limitaciones para el sensado de medios biológicos. En primer lugar, los pH fisiológicos se encuentran alejados de la alcalinidad necesaria para el sensor (pH > 12) cayendo en el rango de pH entre 6 y 8, lo cual nos fuerza a medir una fracción muy baja de la especie libre y no su totalidad. Actualmente, en la mayoría de los medios de cultivo aplicados para el desarrollo de los SRB, tales como los medios Postgate utilizados en la determinación por el método del NMP, la concentración de sulfato es menor a 3×10^{-2} mol L⁻¹. Por lo que las concentraciones a sensar, si se pretende utilizar el S⁻² como indicador en un medio biológico, son extremadamente bajas.

Otra consideración que debemos tener en cuenta es la toxicidad del sulfuro para los microorganismos, incluso para los sulfatos reductores. Se ha demostrado la inhibición del metabolismo de los SRB en concentraciones de sulfuro por encima de 2.1×10^{-2} mol L⁻¹, obteniendo así un límite superior a la concentración de la especie libre S⁻² que podríamos esperar en un cultivo en *batch* que cae por debajo del rango analítico o Nernstiano (Reis et al., 1992).

Este panorama no permitiría, a priori, trabajar con el sensor de Ag/Ag₂S en el rango analítico para evaluar la cantidad de metabolito producido por los microorganismos. Sin embargo, en la región no analítica o 'no Nernstiano', es posible obtener grandes diferencias de potencial ante pequeñas cantidades de S⁻². Esto permite la detección temprana del metabolismo microbiano de reducción de sulfato, aunque se resigne la precisión cuantitativa de la técnica.

II) Construcción del sensor

El electrodo de plata – sulfuro de plata (Ag/Ag₂S) también fue generado a partir de un alambre de plata cuya superficie fue lijada y enjuagada. El proceso para generar el depósito de

Ag_2S fue realizado mediante la inmersión del alambre en una solución de Na_2S (0.1 mol L^{-1}) durante 5 minutos. Posteriormente fue sumergido en agua destilada por un par de horas y almacenado en seco.

III) Calibración

Se construyó una curva de calibración para el sensor, en la figura 3 se presenta el OCP entregado por el sensor en función de la concentración del sulfuro total del medio. Se evaluó el sensor en dos pH comúnmente asociados al crecimiento de SRB, mediante soluciones *buffer* fosfato con pH 6.2 y 7.

En ambos casos se observa una buena correlación con curvas de bibliografía (Harsányi et al., 1984). Se presenta una caída abrupta desde concentraciones no detectables de sulfuro hasta el ingreso en el rango analítico, en donde cumple la predicción de la ecuación de Nernst. Se observó un desplazamiento de dos órdenes de magnitud en la respuesta del sensor con el aumento del pH en el medio. Este resultado indica que es necesario agregar casi 100 veces más sulfuro total a la solución para obtener la misma respuesta cuando trabajamos a pH 6.2 en lugar de pH 7.

Este aumento en dos órdenes de magnitud se correlaciona bien con el gráfico de la fracción libre del sulfuro presentado en la Fig. 2 (observar líneas guías). Como previamente, el sensor solo puede detectar la fracción libre de sulfuro (S^{2-}) y no la cantidad total ($\text{S}_{\text{Tot}}^{2-}$). Esto significa que es posible obtener otros rangos de medición al variar el pH del medio. Otro aspecto importante a tener en cuenta es que la curva de calibración se construyó en condiciones atmosféricas, sin eliminar el oxígeno del entorno.

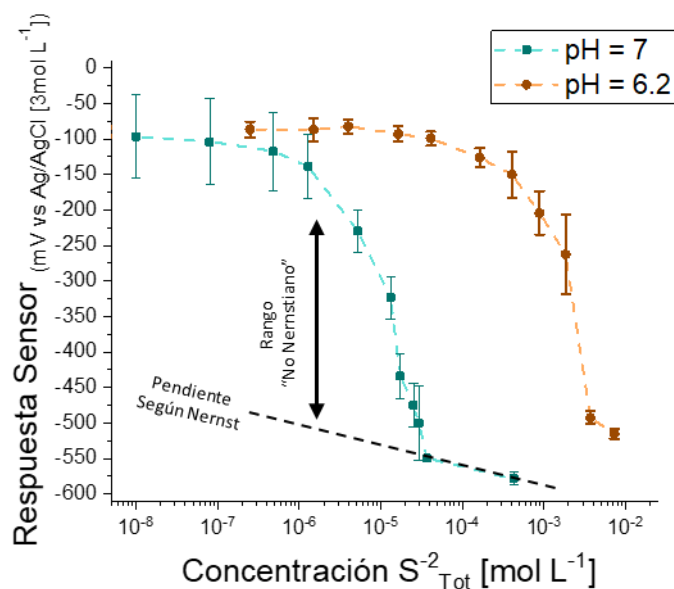


Fig. 3: Gráficos de potencial vs concentración de sulfuro (logarítmica), en azul se informa el valor promedio con el desvío estándar de los electrodos de $\text{Ag}_2\text{S}/\text{Ag}$ ($n=3$) para pH 7 (azulados) y pH 8 (anaranjados). La línea punteada se corresponde con la pendiente de Nernst teórica y la línea con doble flecha informa la desviación del rango Nernstiano.

Al considerar nuevamente un ensayo *batch* de microorganismos sulfato reductores, el límite para la cantidad de sulfuro total se encuentra dado por la condición de toxicidad y gira en torno a los $2.1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{S}_{\text{Tot}}^{2-}$) (Rabus et al., 2013). En este punto, observamos que el sensor

es capaz de detectar la presencia de sulfuro incluso en concentraciones varios órdenes de magnitud por debajo de los valores inhibitorios, tanto a pH 7 como a pH 6.2. Por lo tanto, se considera factible su utilización para el análisis de un sistema *batch* de microorganismos sulfato reductores (SRB).

IV) Ensayos en batch

A continuación, en la figura 4, evaluamos el funcionamiento del sensor en las condiciones experimentales de un medio de cultivo simulando agua utilizada en la industria. El primer punto para destacar fue la buena estabilidad que presentó el dispositivo sensor tanto en condiciones abióticas como en presencia de microorganismo durante los 21 días que duró el ensayo.

En cuanto a su funcionamiento, la respuesta del sensor ante el crecimiento de las SRB fue evidente a diferencia de lo observado en condiciones abióticas. Esta respuesta fue visualizada por una caída progresiva en el potencial a medida que iban transcurriendo los días (Fig. 4).

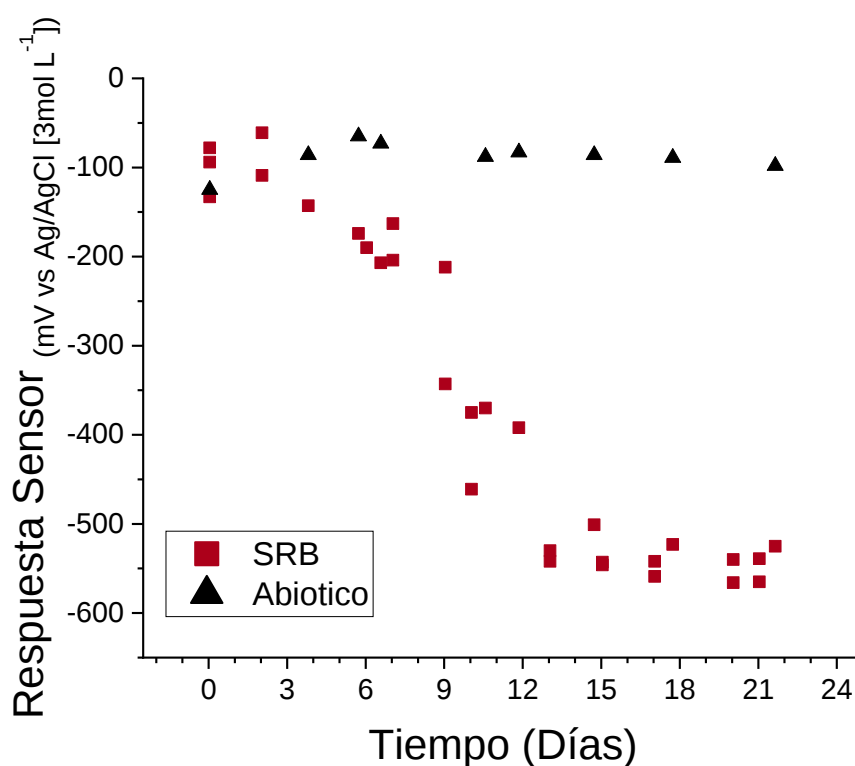


Fig. 4: Respuesta del sensor de $\text{Ag}_2\text{S}/\text{Ag}$ para sistemas abióticos (gris) o en presencia de bacterias sulfato reductoras (rojo) a través de los días.

Cuando relacionamos este cambio en el potencial en el sensor con la cantidad de bacterias presentes en el medio de cultivo, ambas curvas, crecimiento bacteriano y evolución del potencial detectado por el sensor, se correlacionaban. Esto quiere decir que los cambios de potencial registrados por el sensor siguen la curva de crecimiento bacteriano (fase *lag*, exponencial y estacionaria) (Fig. 5).

Durante la fase *lag* que presenta cualquier cultivo bacteriano, el sensor es capaz de detectar concentraciones de sulfuro total ($\text{S}_{\text{Tot}}^{-2}$) cercanas a $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (umbral de detección en pH 7 detectado en la Fig. 2) que se traducen a cambios en el potencial de aproximadamente 100 mV. Cuando el cultivo entra en la fase exponencial el sensor presenta una respuesta "no

Nernstiana". Es aquí donde se produce una abrupta caída de potencial estabilizándose en los -550 mV. Una vez que entra el cultivo en la fase estacionaria el sensor presenta un comportamiento Nernstiano en donde ha disminuido la amplitud de la respuesta en función de los cambios en el sulfuro libre (S^{-2}) que se detectan.

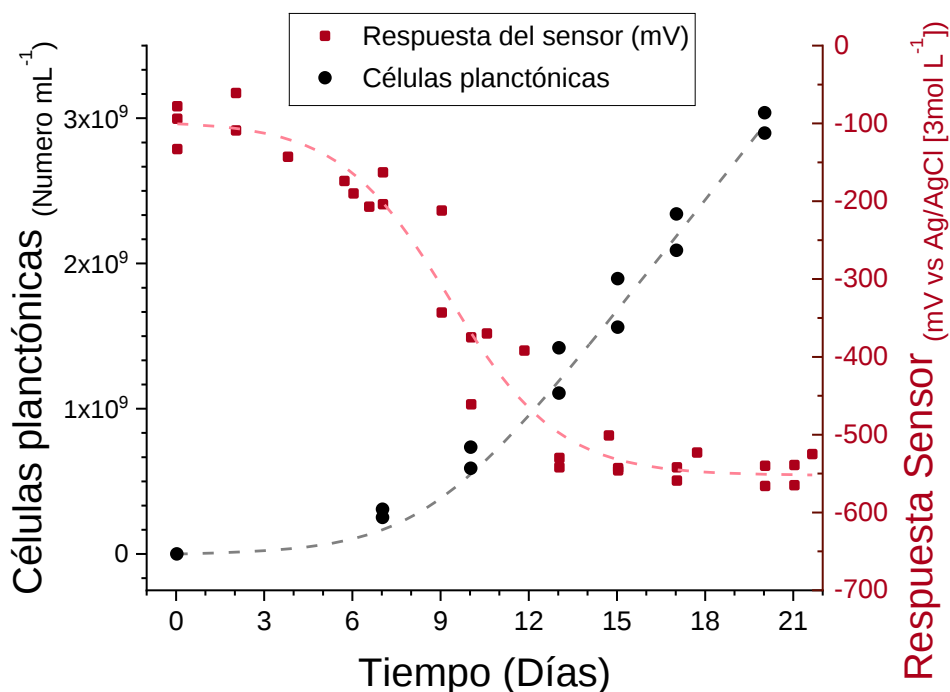


Fig. 5: Evolución de la curva de crecimiento bacteriano (Izquierda, en negro) y de la respuesta del sensor de Ag_2S/Ag (derecha, rojo) a través de los días.

V) Relación entre el sulfuro sentido y el número de bacterias

A partir de estos resultados podemos suponer que el cambio de potencial estaría estrechamente relacionado con el número de bacterias presentes en el medio de cultivo. Para establecer esta relación convertimos los mV detectados por el sensor en mol L^{-1} de sulfuro total en el medio de cultivo (S_{Tot}^{-2}) mediante el uso de la curva de calibración (Fig. 3). Esto nos da como resultado una relación lineal entre ambos parámetros que nos permite estimar la cantidad de bacterias presentes en el medio de cultivo a partir de la lectura de potencial del sensor electroquímico (Fig. 6).

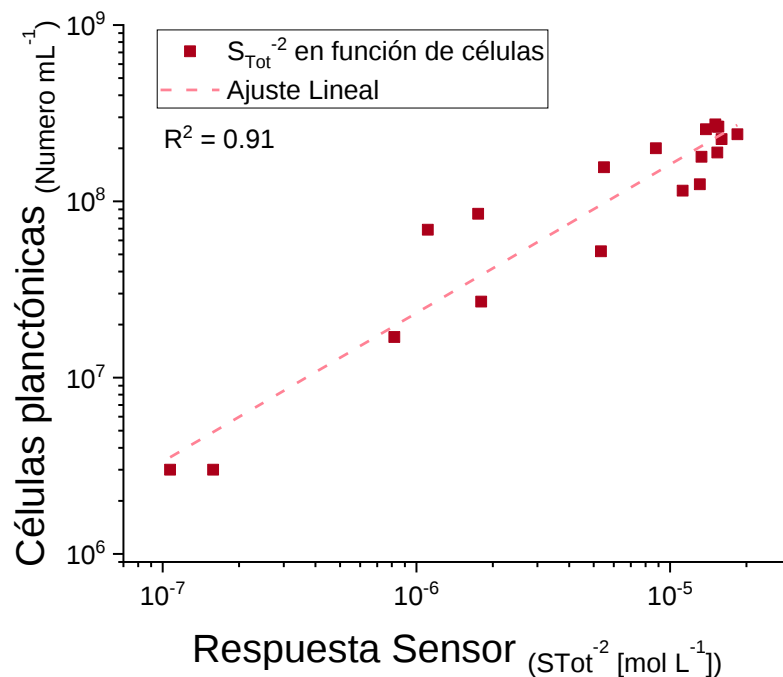


Fig. 6: Respuesta del sensor medida como concentración de sulfuro total (S_{Tot}^{-2}) en función de la cantidad de bacterias planctónicas encontradas para el momento de la medición (rojo). En línea punteada, se presenta la regresión lineal de los datos y su R^2 .

Estos hallazgos permiten considerar el uso del electrodo sensor de Ag/Ag₂S como una herramienta para medir la actividad metabólica de microorganismos sulfato reductores. Esta aplicación facilitaría el seguimiento de los cultivos de laboratorio de una manera más eficiente, económica y rápida en comparación con los métodos tradicionales que implican el consumo de sulfato y la medición del crecimiento bacteriano (como la turbidimetría y la lectura de OD-600).

Es importante destacar que a priori, cualquier sistema biológico compuesto por microorganismos sulfato reductores, cuyo pH no varíe sensiblemente con el crecimiento bacteriano (y/o sea plausible medir este cambio) es posible de ser evaluado mediante la aplicación del sensor Ag/Ag₂S desarrollado en el marco de esta tesis doctoral.

VI) Validación del sensor electroquímico en comparación con la técnica del Número más Probable y monitoreo continuo *in-situ*

En la industria del petróleo la técnica de referencia utilizada para la detección de las SRB es la del número más probable (NMP). Como se mencionó anteriormente es una técnica que consiste en el cultivo de microorganismos a partir de diluciones seriadas en un medio específico, con un tiempo de demora de 28 días para poder obtener los resultados definitivos.

De este modo, se compararon la sensibilidad y los tiempos de detección del sensor desarrollado contra una de las técnicas más utilizadas para la detección de las SRB como el NMP.

El medio de cultivo utilizado fue el PostGate B recomendado y utilizado para el crecimiento de las SRB por normas de la industria (NACE TM0194, 2014).

En el NMP, la identificación de crecimiento bacteriano en las diferentes diluciones seriadas es detectado visualmente mediante un cambio de color del medio de cultivo de incoloro a negro, debido a la formación de sulfuro de hierro (II) (FeS) (Fig. 7). Para comparar los resultados de esta técnica con el sensor electroquímico, se tomaron alícuotas de cada una de las diluciones del NMP y se registró el potencial del sensor electroquímico para 0, 36 y 72 horas.

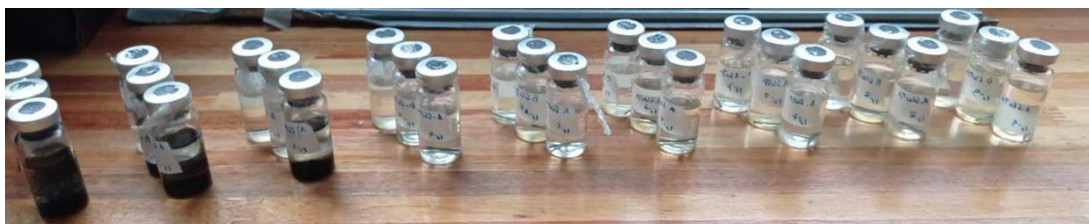


Fig. 7: Diluciones seriadas por la técnica de NMP para un cultivo de SRB (2×10^8 Nro. mL^{-1}). De izquierda a derecha se disminuye la cantidad de células en diluciones 1:10. Se considera positiva para detección visual las que presenten un color negro.

El dispositivo fue capaz de sensor a las 36 hs la presencia de bacterias en los viales del número más probable correspondiente a las tres primeras diluciones (-1,-2,-3) mientras que la detección visual (cambio de color del medio) se registró a las 72 hs. Para las cinco diluciones posteriores (viales nro. -4, -5, -6, -7 y -8) el sensor entregó un resultado positivo a las 72 hs del ensayo (Fig. 8). Es importante remarcar que, en estos últimos viales detectados por el sensor, el medio de cultivo permanecía incoloro, y solo fue visible el cambio de color entre los 18 y 25 días de realizado el ensayo.

Estos resultados demuestran la capacidad de nuestro sensor para detectar tempranamente, en un periodo de tiempo corto (72 hs), que por otra técnica suele tardar semanas, la presencia de actividad sulfato reductora en un medio de cultivo, en un periodo de tiempo corto.

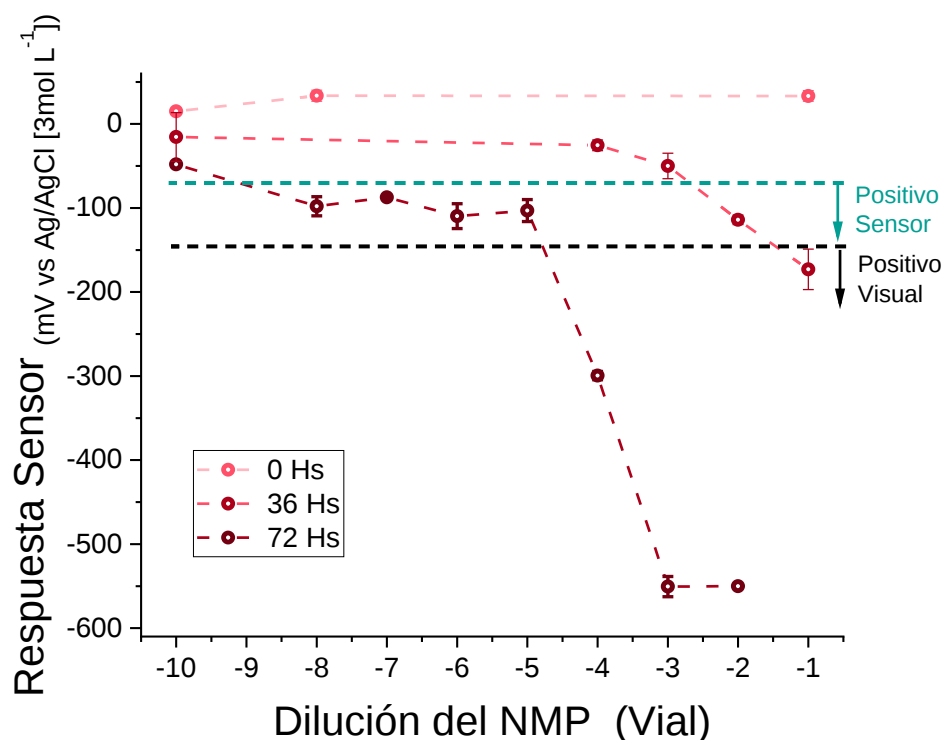


Fig. 8: Respuesta del sensor medida como potencial E_{ocp} en función de la dilución de la técnica de número más probable. En línea punteada se marca el valor de corte para la detección positiva por el sensor (verde) y de manera visual (negro).

Conclusiones

A lo largo de este trabajo, se ha presentado el desarrollo y la evaluación de un sensor electroquímico de sulfuro ($\text{Ag}/\text{Ag}_2\text{S}$). Este sensor fue capaz de detectar la presencia temprana en cuestión de horas de microorganismos sulfato reductores, lo que podría representar un avance significativo en la detección y seguimiento de su actividad metabólica. Este avance podría ser de gran interés para la industria del petróleo y gas, ya que los SRB son los principales involucrados en procesos de corrosión microbiana.

El sensor ha demostrado una alta sensibilidad a la presencia de SRB, permitiendo detectar cambios en el potencial electroquímico asociados a la metabolización del sulfato a sulfuro. Los experimentos revelaron una buena correlación entre la respuesta del sensor y la cantidad de SRB presentes en un medio de cultivo de tipo *batch*, lo que sugiere que este sensor podría ser una herramienta eficaz para el seguimiento de la actividad sulfato reductora y/o el crecimiento de una población bacteriana.

Además, se explicó la química subyacente y se destacó su rango de mediciones posibles, tanto analítico (Nernstiano) como no analítico o "No Nernstiano". La capacidad del sensor para operar en un rango "no Nernstiano" dependiente del pH del medio de cultivo es especialmente relevante. Esto brinda ventajas significativas en comparación con métodos tradicionales, como el Número Más Probable (NMP), que requieren un tiempo prolongado para la detección visual.

Tanto el protocolo diseñado para la medición externa como la posibilidad de utilizar el sensor *in-situ* son técnicas de baja complejidad que podrían ser aplicadas en el campo. Ambas

técnicas permiten la detección cualitativa y/o la semi-cuantitativa temprana de los SRB. Además, la técnica *in-situ* posibilita un seguimiento en tiempo real de su actividad metabólica. La simplicidad en la construcción del sensor y su bajo costo lo hacen destacar entre otras propuestas recopiladas en la bibliografía. En todos los casos el sensor detectó actividad metabólica antes que la técnica estándar de la industria del NMP. Este éxito llevó a la solicitud de una patente de invención (acta 20230102617) por parte de la Universidad Nacional de Mar del Plata y el CONICET. La patente lleva el título de "*Sensor y método electroquímico para la detección temprana de actividad bacteriana*" y fue presentada el 29 de septiembre de 2023.

Aclaración de propiedad intelectual

El desarrollo de este dispositivo ha sido protegido mediante la solicitud de patente de invención (Acta número 20230102617) por parte de la Universidad Nacional de Mar del Plata y CONICET con el título de "*Sensor y método electroquímico para la detección temprana de actividad bacteriana*" presentada el 29 de septiembre del 2023.

Bibliografía

Al-Humam, A. A., Zinkevich, V., Sapojnikova, N., Kartvelishvili, T., & Asatiani, N. (2021).

Biochips and rapid methods for detecting organisms involved in microbially influenced corrosion (MIC) (Patent US11035009B2).

Aventaggiato, L., Colucci, A. P., Strisciullo, G., Favalli, F., & Gagliano-Candela, R. (2020).

Lethal Hydrogen Sulfide poisoning in open space: An atypical case of asphyxiation of two workers. *Forensic Science International*, 308, 110122.

<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.110122>

Barton, L. L., & Fauque, G. D. (2009). Chapter 2 Biochemistry, Physiology and Biotechnology of Sulfate-Reducing Bacteria. En *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 68, pp. 41-

98). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(09\)01202-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(09)01202-7)

Bock, R., & Puff, H.-J. (1968). Bestimmung von Sulfid mit einer Sulfidionen-empfindlichen Elektrode. *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie*, 240(6), 381-386.

<https://doi.org/10.1007/BF00531576>

Crombie, D. J., Moody, G. J., & Thomas, J. D. R. (1975). Observations on the calibration of solid-state silver sulphide membrane ion-selective electrodes. *Analytica Chimica Acta*, 80(1), 1-8. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)84968-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)84968-0)

- Enning, D. (2012). *Bioelectrical corrosion of iron by lithotrophic sulfate-reducing bacteria* [PhD Thesis].
- Harsányi, E. G., Tóth, K., & Pungor, E. (1984). The behaviour of the silver sulphide precipitate-based ion-selective electrode in the low concentration range. *Analytica Chimica Acta*, 161, 333-341. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)85803-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)85803-1)
- Hussain, A., Hasan, A., Javid, A., & Qazi, J. I. (2016). Exploited application of sulfate-reducing bacteria for concomitant treatment of metallic and non-metallic wastes: A mini review. *3 Biotech*, 6(2), 119. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0437-3>
- Jørgensen, B. B. (1982). Mineralization of organic matter in the sea bed—The role of sulphate reduction. *Nature*, 296(5858), 643-645. <https://doi.org/10.1038/296643a0>
- Lawrence, N. (2000). Analytical strategies for the detection of sulfide: A review. *Talanta*, 52(5), 771-784. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(00\)00421-5](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(00)00421-5)
- Madrid, V., Chistoserdov, A., Chapman, M., & Price, B. (2008). *Detection of corrosion-inducing prokaryotes* (Patent CA2673577A1).
- Müller, B., & Stierli, R. (1999). In situ determination of sulfide profiles in sediment porewaters with a miniaturized Ag/Ag₂S electrode. *Analytica Chimica Acta*, 401(1-2), 257-264. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(99\)00490-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00490-0)
- NACE TM0194. (2014). *Field Monitoring of Bacterial Growth in Oil and Gas Systems*.
- OSHA. (s. f.). *Peligros para la salud: Sulfuro de hidrógeno*. Recuperado 29 de febrero de 2024, de <https://www.osha.gov/hydrogen-sulfide/hazards>
- Patnaik, P. (2007). *A comprehensive guide to the hazardous properties of chemical substances* (3rd ed). John Wiley.
- Puentes-Cala, E., Tapia-Perdomo, V., Espinosa-Valbuena, D., Reyes-Reyes, M., Quintero-Santander, D., Vasquez-Dallos, S., Salazar, H., Santamaría-Galvis, P., Silva-Rodríguez, R., & Castillo-Villamizar, G. (2022). Microbiologically influenced corrosion: The gap in the field. *Frontiers in Environmental Science*, 10, 924842. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.924842>

- Qi, P., Zhang, D., & Wan, Y. (2012). *Method for detecting sulfate reducing bacteria in water environment* (Patent CN102507481A).
<https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/046219588/publication/CN102507481A?q=CN102507481A>
- Rabus, R., Hansen, T. A., & Widdel, F. (2013). Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes. En E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, & F. Thompson (Eds.), *The Prokaryotes* (pp. 309-404). Springer Berlin Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-30141-4_70
- Reis, M. A. M., Almeida, J. S., Lemos, P. C., & Carrondo, M. J. T. (1992). Effect of hydrogen sulfide on growth of sulfate reducing bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*, 40(5), 593-600. <https://doi.org/10.1002/bit.260400506>
- Serrano, A., Peces, M., Astals, S., & Villa-Gómez, D. K. (2020). Batch assays for biological sulfate-reduction: A review towards a standardized protocol. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 50(12), 1195-1223.
<https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1644103>
- Shen, Y., & Buick, R. (2004). The antiquity of microbial sulfate reduction. *Earth-Science Reviews*, 64(3-4), 243-272. [https://doi.org/10.1016/S0012-8252\(03\)00054-0](https://doi.org/10.1016/S0012-8252(03)00054-0)
- Speight, J. G. (2016). *LANGE'S HANDBOOK OF CHEMISTRY* (Vol. 17). Mc Graw Hill.
- Thermo Corporation. (2003). *Orion Silver/Sulfide Electrode INSTRUCTION MANUAL*.
- Upreti, SINGH, AMIR QAZI, PURI SURESH, GUPTA ANURAG, RAJAGOPAL, & MALHOTRA. (2015). *RAPID MOLECULAR METHOD FOR QUANTIFYING CORROSION CAUSING MICROBES* (Patent IN2071MU2013A).
- Yang, N.-C., Ho, W.-M., Chen, Y.-H., & Hu, M.-L. (2002). A Convenient One-Step Extraction of Cellular ATP Using Boiling Water for the Luciferin–Luciferase Assay of ATP. *Analytical Biochemistry*, 306(2), 323-327. <https://doi.org/10.1006/abio.2002.5698>
- Yang, Z., Zhang, D., & Wang, Y. (2018a). *Photo-electrochemical detection method of sulfate reducing bacteria (SRB)* (Patent CN107561041A).

<https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/060977340/publication/CN107561041A?q=CN107561041A>

Yang, Z., Zhang, D., & Wang, Y. (2018b). *Visual qualitative detection method of sulfate reducing bacteria* (Patent CN108277258A).

<https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/062810958/publication/CN108277258A?q=CN108277258A>

Zheng, L., Ye, X., Qi, P., Zhang, D., & Sun, Y. (2019). Fluorometric detection of sulfate-reducing bacteria via the aggregation-induced emission of glutathione-gold(I) complexes. *Microchimica Acta*, 186(6), 382. [https://doi.org/10.1007/s00604-019-3427-](https://doi.org/10.1007/s00604-019-3427-4)