

Microelectrodo selectivo de fácil construcción para la determinación de ácido sulfhídrico en un sistema microbiano.

Vierna, Lilia;¹ Baeza, Alejandro²

Resumen

Algunos géneros microbianos realizan transformaciones químicas específicas como el caso de las bacterias sulfato reductoras (BSR) que en condiciones anóxicas realizan un proceso de reducción desasimilatoria de sulfatos, éstos al ser utilizados como aceptores de electrones se reducen a sulfuros. Seleccionamos a estas bacterias como objeto de estudio por su ubicuidad y repercusión económica al causar contaminación de agua y suelo, deterioro de instalaciones industriales, corrosión de ductos, al mismo tiempo son utilizadas en procesos de biorremediación. La identificación rápida de los diferentes géneros de BSR se realiza al comprobar la reducción de los sulfatos a sulfuros. Proponemos un ejercicio interdisciplinario en el que realiza un microcultivo de bacterias previamente aisladas en nuestro laboratorio, se describe un microelectrodo selectivo de sulfuros para comprobar en forma rápida las pruebas de reducción de sulfatos utilizando diferentes donadores de electrones, con poco consumo de reactivos y escasos residuos contaminantes. Se presentan resultados de esta actividad didáctica en el que los alumnos aplicaron conocimientos previos sobre concepto redox, técnicas analíticas y microbiológicas. Con nuestro apoyo lograron adquirir destrezas necesarias para el manejo del equipo, interpretación de los resultados obtenidos con el microelectrodo selectivo, comprobando que se trata bacterias miembros de un consorcio BSR.

¹ Depto de Biología. Facultad de Química, UNAM.

² Depto de Química Analítica. Facultad de Química, UNAM.

Introducción

Son sujeto de estudio las relaciones entre los microorganismos y las transformaciones fisicoquímicas y químicas que ocurren en los diversos ambientes como suelo y agua. Por ser ubicuos y por su diversidad metabólica, los microorganismos son los catalizadores primarios de los ciclos de nutrientes en la naturaleza, participan en la transformación de compuestos de carbono, nitrógeno, azufre y así mantener las condiciones adecuadas para el desarrollo de vegetales y animales. La microbiología ambiental involucra la aplicación de conocimientos químicos, de metodologías analíticas y toxicológicas para la detección de alteraciones por la presencia de contaminantes químicos en el número y variedad de especies que constituyen una biota autóctona, así como en las relaciones que establecen los miembros de dicha biota y la repercusión en fertilidad de suelos y / o la calidad de cuerpos de agua. En el estudio de la actividad microbiana en los diferentes ambientes se utilizan técnicas que incluyen el uso de radioisótopos, isótopos estables y microelectrodos. Las estimaciones que se realizan son el resultado de la actividad fisiológica conjunta de las comunidades microbianas, la técnica FISH-MAR permite una evaluación más específica de la actividad fisiológica. Brock (2009)

Los microsensores constituyen una ayuda para medir *in situ* las transformaciones químicas resultantes de la actividad microbiana y en las alteraciones causadas en ellas, por contaminantes traza, de compuestos organometálicos, metales pesados causantes de ecotoxicidad. Los microsensores se han vuelto indispensables en el desarrollo de programas relacionados con procesos de biorremediación y descontaminación, así como en la rehabilitación de áreas.

Seleccionamos a las Bacteria Sulfato reductoras BSR como objeto de estudio por su ubicuidad y repercusión económica al causar contaminación de agua y suelo al producir H_2S en forma significativa, el cual se comporta como un agente reductor muy fuerte que puede inhibir el crecimiento de algunos microorganismos aerobios. Se integro un grupo de trabajo interdisciplinario, para trabajar los aspectos microbiológicos, analíticos y de técnicas filogenéticos como la técnica FISH (Fluorescente In Situ Hybridization) Hibridación Fluorescente *in situ* y que se considera una tinción filogenética. Consideramos que el tema propuesto es un excelente ejercicio didáctico que pueden realizar los alumnos interesados en cursar la asignatura de Microbiología Ambiental, que forma parte del plan de estudios de la carrera de Química Farmacéutica Biológica e integrarlos para que colaboren en la realización de proyectos de investigación relacionados con la detección, caracterización e identificación rápida de estas bacterias anaerobias de importancia ambiental por los daños que pueden causar y también porque muchas de ellas pueden ser utilizadas en procesos de biorremediación. La clasificación de los diferentes géneros de BSR se realiza por

un número de parámetros, siendo en primera instancia el rasgo mas obvio, la reducción de los sulfatos a sulfuros y el reconocimiento de los diferentes donadores de electrones que mantienen y soportan el crecimiento de estos microorganismos. En el ejercicio que proponemos no solo se trabajan los aspectos microbiológicos, en forma simultánea se refuerza el concepto de compuestos donadores y aceptores de electrones presentes en forma de nutrientes, procesos redox que resultan fundamentales en la enseñanza de la bioquímica de estos sistemas microbiológicos y su asociación con aplicaciones biotecnológicas y de biorremediación tratando de evitar o reducir los daños económicos en suelos agrícolas y por biodeterioro en instalaciones petroleras, sistemas de enfriamiento industriales etc.

En el ejercicio también proponemos el uso de un microelectrodo selectivo de sulfuros para realizar en forma rápida las pruebas de reducción de sulfatos utilizando diferentes donadores de electrones, con poco consumo de reactivos y pocos residuos contaminantes.

Material y métodos

Se utilizaron matraces de tres bocas, de 10 mL de capacidad, en una de ellas se acopla un microelectrodo selectivo para sulfuros diseñado y adaptado por Baeza (2003). Se trata de un microsensar de estado sólido que permite monitorear in situ como aniones tales como el sulfato o el sulfuro para obtener información química directa del proceso interfacial microbiano en matrices complejas como tierra o aguas de desecho Akhtar et al (2003). Para ello se forma en un microalambre de Ag° un electrodepósito de AgS y en un micro alambre de Pb un electrodepósito de PbSO_4 . Cada microISE se conecta a un multímetro junto con un microelectrodo de referencia de $\text{Cu}^\circ|\text{Cu(II)}$. Estos microISE están diseñados para mediciones de volúmenes del orden de microlitros o directamente sobre superficies húmedas. Se calibran los microISE con sendas curvas de calibración de Na_2S en un amortiguador de boratos $\text{pH} = 9.2$, y Na_2SO_4 en medio sulfúrico $\text{pH} = 2$. Como inóculo utilizamos cultivos previamente obtenidos en nuestras investigaciones y cuya identidad se quiere confirmar en esta determinación, por su actividad sulfato reductora. Por el carácter anaerobio de estas bacterias, en otra boca del matraz se inyecta N_2 para mantener dichas condiciones. Se utilizó medio Postgate (1984) cambiando la fuente de carbono: lactato, acetato y etanol, ya que el tipo de fuente de carbono utilizada en la reducción de un aceptor de electrones, varía de acuerdo al género. En las pruebas realizadas participaron alumnos de 5º, 6º y 7º semestre de la Facultad de Química UNAM.

Resultados

La figura 1 muestra el microcultivo y los microsensors de bajo costo construidos en el laboratorio. Se muestra la utilidad de la miniatuización de los electrodos y el cultivo para ahorro de reactivos, materiales y tiempos de operación.

La figura 2 muestra el monitoreo de potencial de los microsensors empleados con un multímetro sencillo de bajo costo. La medición se realiza *in situ* directamente en el medio. La selectividad del microsensor no requiere un tratamiento previo de la muestra ya que no es necesario separar biomasa, proteínas, etc.

La figura 3 muestra una curva de calibración típica de la respuesta del potencial medido con el logaritmo de la concentración de sulfuros en el medio. La respuesta es lineal en un intervalo entre 0.05 y 0.1 mM de acuerdo la recta de calibración relativa:

$$E = -1.2V - 0.9(\log [S^{2-}]), r^2 = 0.9931.$$

La figura 4 muestra una curva de calibración típica de la respuesta del potencial medido con el logaritmo de la concentración de sulfatos en el medio. La respuesta es lineal en un intervalo entre 0.1 y 0.001 M de acuerdo la recta de calibración relativa:

$E = 0.03V - 0.005(\log [S^{2-}]), r^2 = 0.9790$. Se muestra la dispersión típica de este tipo de sensores.

La sensibilidad y precisión de los sensores es diferente dada la naturaleza de cada cristal responsable de la selectividad. En ambos casos se obtiene una respuesta aceptablemente lineal y sobre se corrobora la factibilidad de realizar mediciones selectivas con microsensors de construcción de bajo costo en el laboratorio docente o de investigación.

Discusión

Las técnicas propuestas, microcultivo y microelectrodo, para comprobar la actividad sulfato reductora de bacterias aisladas a partir de una columna de Winogradsky nos permitió obtener resultados rápidos y específicos. Los alumnos requirieron de un periodo de adaptación en el manejo de un microcultivo anaerobio y especialmente de las microtécnicas analíticas. Al participar en la estandarización del sistema microbiano y de los microelectrodos los estudiantes solicitaron el apoyo de los profesores en la aplicación de conocimientos previos y enlazarlos en la interpretación de los resultados obtenidos y con los cambios metabólicos que realizan las BSR. El grado de complejidad de algunas vías metabólicas y los cambios químicos que se producen les resultan confusos, mayormente porque carecen o no recuerdan los conceptos bioquímicos antecedentes.

Conclusiones

Al término de la realización del ejercicio se hizo una evaluación conjunta de los participantes, alumnos y profesores con los siguientes resultados:

- Constituye un ejercicio interdisciplinario, en el que los alumnos aplican conocimientos químicos previamente adquiridos.
- El sistema miniaturizado favorece el rápido crecimiento y evaluación de la producción de sulfuro, por la reducción microbiana de los sulfatos.
- Fue necesario realizar ajustes para el rango de concentración de H₂S producido por las cepas aisladas en nuestro laboratorio y que se encuentran en proceso de identificación de género.
- Al participar en el desarrollo del ejercicio, en la investigación bibliográfica y en el análisis de resultados, los alumnos lograron un aprendizaje conceptual y procedimental.

Agradecimientos

Este proyecto de investigación Papime PE 202209 se realiza gracias al apoyo de fondos aportados por el Programa de Apoyo a Proyectos para la Innovación y mejoramiento de la Enseñanza

Bibliografía

- Akhatar M; V.E. Hernandez; A. Baeza, A.M Qazi y R.N.:** Escobar 2003 Pakistan Journal of Soil Science 22 (2) , 41-46 The use of W^o microsensor to measure the site –specific pH changes in the Rhizosphere of *Lupinus silvestris* with different sources of P.
- Baeza, A.**(2003): “Titulaciones ácido-base Potenciométricas a Microescala Total con microsensores de pH y de referencia de bajo costo”, *Revista Chilena de Educación Científica*.
- Gibson, G.R.** (1990): J. Appl.Bacteriol, **69**,769-797. Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria.
- Madigan, M.T. et al.** (2009): *Brock Biología de los Microorganismos*. Pearson Addison Wesley, Madrid.
- Postgate, J.R.** (1984): *The Sulphate-Reducing Bacteria*, 2nd edn. Cambridge, Cambridge University Press.

Anexo

Figura 1. Microcultivo y los microsensors de bajo costo construidos en el laboratorio: microelectrodo indicador de plata-sulfuro de plata y microreferencia de cobre.



Figura 2. Monitoreo de potencial de los microsensors empleados con un multímetro sencillo de bajo costo. La medición se realiza in situ directamente en el medio de reacción.

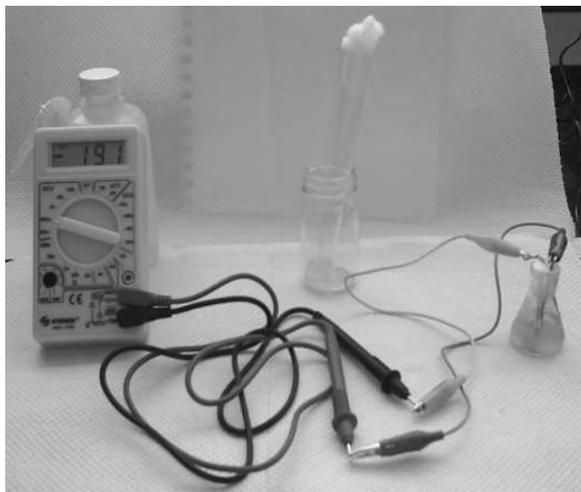


Figura 3. Muestra una curva de calibración típica de la respuesta del potencial medido con el logaritmo de la concentración de sulfuros en el medio.

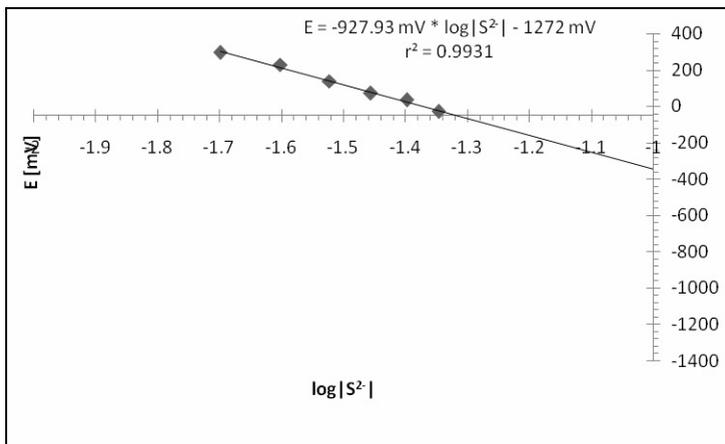
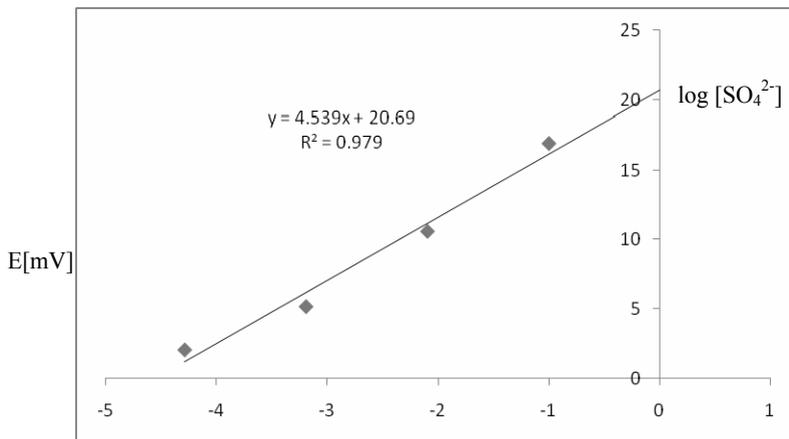


Figura 4. Curva de calibración típica de la respuesta del potencial medido con el logaritmo de la concentración de sulfatos en el medio.



Resumen

Los efectos de la actividad microbiana en ambientes acuáticos y terrestres son vitales, los microorganismos realizan muchas transformaciones fisicoquímicas y químicas en ellos que son trascendentes en el reciclaje de la materia.

Algunos géneros microbianos realizan transformaciones químicas específicas como el caso de las bacterias sulfato reductoras (BSR) que en condiciones anóxicas realizan un proceso de reducción desasimilatoria de sulfatos, éstos al ser utilizados como aceptores de electrones se reducen a sulfuros. Seleccionamos a estas bacterias como objeto de estudio por su ubicuidad y repercusión económica al causar contaminación de agua y suelo, deterioro de instalaciones industriales, corrosión de ductos, al mismo tiempo son utilizadas en procesos de biorremediación. La identificación rápida de los diferentes géneros de BSR se realiza al comprobar la reducción de los sulfatos a sulfuros. Proponemos un ejercicio interdisciplinario en el que realiza un microcultivo de bacterias previamente aisladas en nuestro laboratorio, se describe un microelectrodo selectivo de sulfuros para comprobar en forma rápida las pruebas de reducción de sulfatos utilizando diferentes donadores de electrones, con poco consumo de reactivos y escasos residuos contaminantes. Se presentan resultados de esta actividad didáctica en el que los alumnos aplicaron conocimientos previos sobre concepto redox, técnicas analíticas y microbiológicas. Con nuestro apoyo lograron adquirir las destrezas necesarias para el manejo del equipo, interpretación de los resultados obtenidos del microelectrodo selectivo, comprobando que se trata bacterias miembros de un consorcio BSR.