

Desarrollo de un sensor portable para la determinación de la Actividad Biológica en suelos

Santiago U. Junquera ¹, Solange E. Milesi ¹, Diego G. Fainstein ¹, Nicolas Indelangelo ¹, Albano Peñalva ², Luis P. Schierloh ^{1,2}, Matías R. Siebenlist ¹, María L. Menghi ¹, Martín Á. Zalazar ^{2,3}, María G. Di Barbaro ⁴, Juan Reta ², Daniel A. Zapata ¹, Matías Machtey ¹

Autoras/es: ¹ Laboratorio de Salud y Bienestar Integral - Facultad de Ingeniería - Universidad Nacional de Entre Ríos. ² Laboratorio de Prototipado Electrónico y 3D - Facultad de Ingeniería - Universidad Nacional de Entre Ríos. ³ Instituto de Investigación y Desarrollo en Bioingeniería y Bioinformática - CONICET/UNER. ⁴ Facultad de Ciencias Agrarias - Universidad Nacional de Catamarca.

Contacto: matias.machtey@uner.edu.ar

DOI: <https://doi.org/10.33255/1621/2750>

Resumen

La salud y el bienestar de los seres humanos están inseparablemente vinculados a la salud de otros componentes del ecosistema, como el suelo, las plantas y los animales. El suelo es un recurso viviente, dinámico y vital para diversos ecosistemas y el mantenimiento de la calidad ambiental. En estos últimos años, la caracterización de los suelos se redujo al análisis físico-químico, y escasamente a indicadores biológicos. Entre éstos últimos, se destaca un método, la hidrólisis de diacetato de fluoresceína, que determina la actividad de diversas enzimas, considerándose un indicador de la actividad microbiológica del suelo. En el presente proyecto, se desarrolló una metodología analítica que permite monitorear la calidad biológica del suelo en campo a partir de simplificar esta metodología de referencia que hasta el presente sólo pueden realizarse en un laboratorio. La misma monitorea el avance de una reacción enzimática de forma continua y asistida por un celular que registra fotográficamente el interior de una caja oscura; para su posterior análisis digital. Las pruebas de conceptos, demuestran su capacidad para estimar semicuantitativamente la calidad biológica de suelos de forma robusta, portable, rápida, colaborando en la comunicación y entendimiento de los procesos biológicos del suelo y los usos del mismo.

Palabras claves: Calidad biológica del suelo, Sensor portable, teléfono móvil, fotómetro.

Objetivos

Objetivos generales

Prototipar sensores capaces de determinar la calidad biológica de suelos de manera portable y (semi)cuantitativa.

Objetivos particulares

- OP1:** Evaluar el grado de hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA) a través de inspección visual de color en soporte papel y establecer su potencial para una determinación semi-cuantitativa.
- OP2:** Diseñar y fabricar prototipos de sensores basados en papel que den cuenta del grado de hidrólisis de FDA monitoreando cambios electroquímicos en la reacción.
- OP3:** Realizar pruebas de validación en campo contrastando los resultados provistos por los prototipos a desarrollar y la técnica de referencia.
- OP4:** Trabajar con organizaciones socio ambientales y/o instituciones de manera de acercar una herramienta que permita mapear calidad biológica en distintos suelos.

Objetivos cumplidos

Se cumplió con el objetivo general. Sin embargo, en relación a los objetivos particulares y en función de los resultados alcanzados con las actividades relacionadas al OP1, se decidió desarrollar otra estrategia analítica no basada en papel ni en transductores electroquímicos. El papel se mantuvo únicamente como soporte cualitativo preliminar para alícuotas, pero se descartó como sensor analítico cuantitativo final. Así, se logró:

- Desarrollar y prototipar herramientas y metodologías que faciliten la evaluación de la calidad biológica de suelos brindando: portabilidad, accesibilidad, análisis rápido, que minimice el uso de reactivos, insumos y equipamientos costosos.
- Evaluar el grado de hidrólisis de FDA adaptando una metodología de laboratorio a otra más robusta por inspección visual asistida por un celular estándar, de forma semicuantitativa y en campo.
- Diseñar y construir un SetUp experimental semi estandarizado que permita registrar imágenes asistido por un celular y procesamiento digital que permita monitorear reacciones cinéticas fluorimétricas.
- Realizar pruebas de conceptos que permitan convalidar el uso pretendido y posibles readaptaciones requeridas por productores y organizaciones sociales interesadas.

Marco teórico y metodológico (síntesis)

La actividad microbiana del suelo

La seguridad sanitaria debe entenderse desde una perspectiva global y transversal, integrando la salud humana, la sanidad animal, la sanidad vegetal, la salud de los ecosistemas y la biodiversidad. Esta perspectiva se engloba bajo un paradigma denominado “One health” (Una Salud (Destoumieux-Garzón et al. 2018)). El suelo es un recurso viviente, dinámico y no renovable, al menos en una escala de tiempo humano, cuya condición y funcionamiento es vital para los ecosistemas y para el mantenimiento de

la calidad ambiental (Ulloa Larrea 2014). Posee una parte mineral y organismos vivos de diverso tamaño: microorganismos (como bacterias, hongos, protozoarios y nematodos), mesofauna (como ácaros y colémbolos) y macrofauna (como arácnidos, lombrices y hormigas). Estos organismos vivos se pueden reunir en colonias y éstas en consorcios dentro de mega-comunidades. Se puede considerar a los consorcios como la menor “unidad funcional” de un suelo, generando en éste diversos comportamientos. Si bien cada colonia microbiana tiene una función principal bien específica -por ejemplo: solubilizar fósforo, degradar la lignina, fijar nitrógeno, producir humus, construir poros, etc.- jamás lo hacen solas, siempre están relacionadas con otras colonias con las cuales interactúan (Alzate Ramírez y Campiño Arias 2014). Cuanto mayor sea la multitud y la diversidad de estas comunidades aportarán mayor número y calidad de funciones y efectos sobre el suelo, lo cual incide en la cantidad y diversidad de nutrientes disponibles para las plantas. Sus actividades y funciones son muy amplias, incluyen: descomponer la materia orgánica y reciclar nutrientes, fijar nitrógeno de forma simbiótica y en forma libre, nitrificación, solubilización de minerales, control de enfermedades, descomposición de sustancias resistentes, producción de antibióticos con el fin de mantener el equilibrio entre los microorganismos, mejoramiento de la aireación y distribución del agua, mezcla de fracciones orgánicas con minerales, mejoramiento de la estructura edáfica, la degradación de sustancias contaminantes; entre otros (Alzate Ramírez y Campiño Arias 2014).

Situación actual del suelo

La salud del suelo depende de la diversidad de organismos que viven en él. Un suelo saludable contribuye a la mitigación del cambio climático, al mantener o aumentar su contenido de carbono. Los suelos agrícolas están sometidos a la mecanización continua, al monocultivo, al riego, a la aplicación de agroquímicos y fertilizantes de síntesis, a la compactación y a las quemas, todos factores que empobrecen al conjunto de organismos que aloja y por ende afectan su salud y fertilidad. Cuando los elementos y condiciones del entorno se desequilibran, los suelos comienzan a degradarse, reducen su productividad e incluso dejan de prestar servicios ecosistémicos tan valiosos como el secuestro de carbono y la preservación del ciclo del agua, entre otros. Es por eso que es tan preocupante que la degradación de suelos en el mundo esté aumentando a una tasa estimada de 5 a 7 millones de hectáreas cada año (Wilson 2017). En la Argentina los mejores suelos agrícolas (cerca de 47 millones de hectáreas), han sufrido altos niveles de intervención antrópica, por lo que en la actualidad los desarrollos tecnológicos, las políticas públicas y las acciones individuales, deben profundizar estrategias para la producción regenerativa, la recuperación de tierras degradadas, al tiempo que se debe evitar la expansión productiva sobre nuevas tierras (Wilson 2017).

Indicadores de calidad del suelo

Hasta hace pocos años, para determinar la fertilidad de los suelos, se consideraba solamente la productividad de los mismos, basada en la evaluación de parámetros físicos (textura, estructura, densidad, etc) y químicos (pH, contenido de materia orgánica, contenido de nitrógeno, potasio, etc). Se han propuesto diferentes definiciones para el concepto de calidad del suelo, partiendo desde un punto de vista puramente agronómico, hasta algunas con una perspectiva ambiental biofísica integrada (Alzate Ramírez y Campiño Arias 2014). Por lo tanto, no es posible que un solo indicador pro-

vea de información completa. Así, es necesario basarse en indicadores físicos, químicos, biológicos, productivos y sociales para una determinación integral de la calidad y/o salud del suelo (C. Garcia 2003). Entre estos factores hoy se acepta que la actividad de los organismos no solo es un factor clave en la fertilidad del suelo, sino que también lo es en la estabilidad y funcionamiento de ecosistemas naturales como los agro-ecosistemas (Alzate Ramírez y Campiño Arias 2014). Además, la actividad microbiana se desarrolla en función de factores intrínsecos y extrínsecos al sistema suelo, por lo cual constituye un indicador de la dinámica y de la salud del recurso, pues una buena actividad microbiana puede ser el reflejo de óptimas condiciones físicas y químicas que permitan el desarrollo de los procesos metabólicos de bacterias, hongos, algas y actinomicetos y de su acción sobre los substratos orgánicos (Alzate Ramírez y Campiño Arias 2014).

No existe un consenso generalizado respecto de los indicadores de la calidad del suelo. En las distintas eco-regiones de nuestro país se han estudiado distintos parámetros del suelo, y de su estudio surge una tendencia general a no incluir o minimizar a los indicadores biológicos respecto a los físicos y químicos, posiblemente debido a que los parámetros biológicos no tienen una implicancia directa sobre los rendimientos de los cultivos, como sí lo tienen, por ejemplo, los nutrientes disponibles. A pesar de ello, es ampliamente sabido que los microorganismos tienen un papel fundamental sobre la dinámica y funcionamiento de los suelos, y por tanto deberían tener más participación dentro de los indicadores a considerar a la hora de evaluar la calidad de los suelos (Wilson 2017). La biota edáfica responde rápidamente a las prácticas de manejo y cambios de uso del suelo, lo que determina que las propiedades biológicas de la tierra sean muy dinámicas, y sirvan de señales tempranas de degradación o de mejoría del suelo. El monitoreo de estos indicadores permite entender los impactos de la intervención humana, prever futuros problemas y facilitar la toma de decisiones (C. Garcia 2003). Según Hünneimyer et al. (1997, citado en García, 2003), los indicadores deberían permitir:

- Analizar la situación actual e identificar los puntos críticos con respecto al desarrollo sostenible.
- Analizar los posibles impactos antes de una intervención.
- Monitorear el impacto de las intervenciones antrópicas.
- Ayudar a determinar si el uso del recurso es sostenible.

En la actualidad se utilizan diversos indicadores de calidad relacionados con las propiedades biológicas, que responden rápidamente a cambios en el manejo o perturbaciones del sistema. Entre los indicadores biológicos funcionales que aparecen por la actividad de los organismos, como la producción de enzimas extracelulares que bacterias y hongos excretan para catalizar reacciones de descomposición de la materia orgánica y en el ciclado de nutrientes dentro de los ecosistemas. De esta manera, se realizan mediciones de carbono (C) y nitrógeno (N) de la biomasa microbiana, la respiración, el contenido de humedad que mide la actividad microbiana, el N potencialmente mineralizable (C. Garcia 2003), la actividad deshidrogenasa, la evolución de calor determinada por microcalorimetría (Schnürer y Rosswall 1982), la actividad de un conjunto de enzimas como ureasas, celulasas, proteasas, esterases, fosfatasas, la hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA), entre otras (Ulloa Larrea 2014). Una técnica adecuada para medir la actividad microbiana total debe ser inespecífica y sensible, y

cualquier período de incubación necesario debe ser lo más breve posible. La mayoría de los estudios necesarios para determinar los parámetros utilizados, en la actualidad, para la evaluación de la calidad del suelo, requieren de procedimientos complejos, costosos, minuciosos, que demandan tiempos prolongados para la obtención de resultados y que deben llevarse a cabo inevitablemente en laboratorios adecuadamente equipados.

Método óptico estándar

La determinación espectrofotométrica de la hidrólisis del diacetato de fluoresceína [3', 6'- diacetilfluoresceína (FDA)] es un procedimiento rápido, sensible y simple para medir la actividad enzimática de poblaciones microbianas y de este modo pueden proporcionar una evaluación de la actividad microbiana en el suelo (Schnürer y Rosswall 1982). Permite determinar la actividad microbiana total porque son varias clases de enzimas (como lipasas, esterasas y proteasas) las responsables de esta reacción, las cuales están involucradas en la descomposición de diferentes tipos de tejidos, considerándose como un indicador general, o de amplio espectro, de la actividad biológica del suelo (Akram et al. 2015), cuyos costos y requerimientos tecnológicos además son bajos en comparación a la mayoría. La habilidad para hidrolizar FDA está ampliamente extendida, especialmente entre los mayores descomponedores, como son bacterias y hongos (Patle et al. 2018). La fluoresceína, producto de la hidrólisis del FDA, es un compuesto coloreado con propiedades fluorescentes cuya emisión se concentra en torno a los 520 nanómetros. En los procedimientos tradicionales de laboratorio, su concentración se determina a partir de la absorbancia medida a 490 nm, y se compara contra una curva de calibración previamente establecida, lo que permite estimar la actividad microbiana relativa presente en la muestra en un punto final de reacción. Este tipo de análisis requiere equipamiento especializado (espectrofotómetro, centrífugas, incubadoras, filtros, entre otros), e implica transportar las muestras hasta el laboratorio y realizar una serie de pasos técnicos que demandan tiempo y recursos.

Desarrollo de métodos analíticos portables

Los dispositivos portátiles capaces de proveer resultados de manera portable –también conocidos como dispositivos *Point-of-care* (POC)–, son instrumentos que ofrecen información evitando la necesidad de equipo de laboratorios (Land 2019). Estos tienen como horizonte tecnológico su integración en plataformas diagnósticas con formatos compactos que integren distintas funcionalidades y sean portables, que permitan análisis rápidos, minimicen el uso de reactivos y equipamientos costosos, entre otras características. Este relativamente nuevo paradigma tecnológico promete generar nuevas soluciones a problemas del ámbito de la salud, el ambiente y la industria (Geschke et al. 2004; Herold y Rasooly 2009). Estas plataformas diagnósticas pueden clasificarse en ópticos, electroquímicos, piezoeléctricos o térmicos, según el principio de transducción utilizado (Justino et al. 2017; Pandey 2017). A su vez, los colorantes y reacciones enzimáticas representan los elementos más utilizados en metodologías de detección simples (Yetisen et al. 2013).

Propuesta de trabajo

En el presente proyecto, se desarrolló una metodología analítica robusta que permite monitorear la calidad biológica del suelo en campo (brindando portabilidad), a partir de adaptar la metodología de hidrólisis de FDA de referencia, realizada hasta el

momento en un laboratorio. El desarrollo de sensores con estas características podrá brindar información semicuantitativa en el lugar del muestreo, facilitando el mapeo de distintos suelos en campo y diagnósticos que permita, potencialmente, comunicar y colaborar en la toma de decisión respecto a la calidad biológica del suelo y su manejo.

Síntesis de resultados y conclusiones

En este trabajo se presentan los avances logrados en el diseño de una metodología alternativa, semicuantitativa y portátil, orientada a facilitar el diagnóstico de la calidad biológica de suelos sin necesidad de recurrir a laboratorios convencionales. El proceso de diseño y evaluación del sensor portátil para medir actividad biológica en suelos se desarrolló en dos fases .

1. Inspección visual de reacciones enzimáticas reveladas en soporte papel.
2. Evaluación de reacciones enzimáticas en tubo semitransparente de forma continua, asistida por un celular y posterior procesamiento de imágenes.

1. Inspección visual de reacciones enzimáticas en soporte papel

Para establecer el potencial del papel como soporte en la determinación del grado de hidrólisis de FDA por inspección visual, se realizaron curvas de calibrado del producto puro de hidrólisis del FDA. Las soluciones de fluoresceína (Sigma-Aldrich 46960) se prepararon en buffer fosfato 60 mM (pH 7,6) y se depositaron sobre papel whatman n° 1 de manera de observar en qué rango de concentración se percibe el color a ojo desnudo y asistido por análisis de imágenes fotográficas. A partir de los resultados obtenidos, se definió un rango de concentración del producto de reacción tanto para el papel iluminado con luz visible y con luz UV (explotando las propiedades fluorescentes del producto de reacción, **Fig. 1-2**). De dichas experiencias se extrae que el análisis del color de las reacciones expuestas a luz UV permite un menor límite de detección, y acercamiento a las concentraciones estequiométricas del reactivo FDA utilizada en la metodología de laboratorio estándar (Adam y Duncan 2001a; Schnürer y Rosswall 1982).

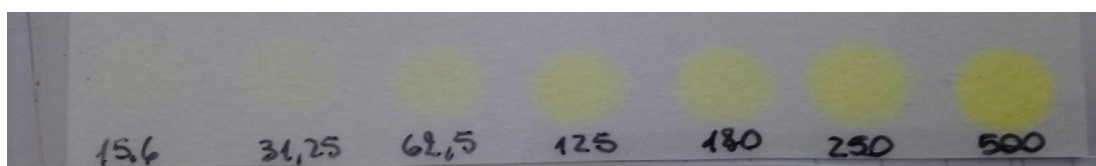


Figura 1: Curva de calibrado a diferentes concentraciones de fluoresceína con luz visible. La leyenda indica concentraciones en unidades de $\mu\text{g/mL}$

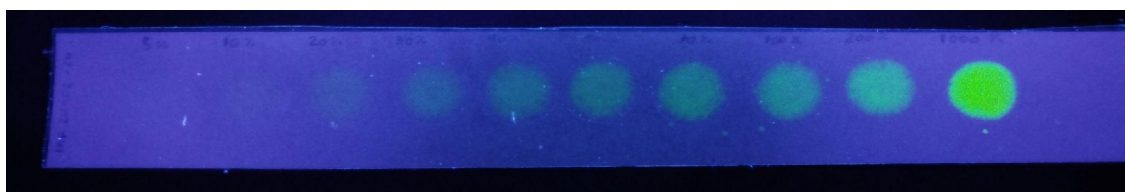


Figura 2: Curva de calibrado a diferentes concentraciones de fluoresceína expuesta a luz UV en un rango de 11 - 1595 $\mu\text{g/mL}$

A partir del límite de detección (LDD) del producto fluoresceína, se definió la concentración del sustrato FDA necesaria para que la reacción enzimática pueda evaluarse desde al menos un ~5% conversión de FDA al producto de hidrólisis (fluoresceína).

Se evaluó la actividad enzimática para un mismo suelo con tres tratamientos distintos:

- **Muestra A (suelo sin tratar):** Se tomó una muestra superficial de suelo (< 5 cm de profundidad) proveniente de un sector de baja intervención antrópica, bajo la sombra de árboles y arbustos. La misma se homogeneizó mediante molienda hasta que la granulación fuera homogénea. Se depositaron 5 g en un Erlenmeyer con 20 mL de buffer fosfato.
- **Muestra B (macerado):** Otros 5 g del mismo suelo fue incubada con 20 mL del buffer de reacción a 30 °C durante 45 min agitando de forma manual y periódicamente. Pasado este tiempo se filtró la solución utilizando un filtro de café doble, removiendo las partículas de tierra, y depositando el extracto en un nuevo erlenmeyer.
- **Muestra C (control negativo):** Otros 5 g del mismo suelo fueron incorporados a un erlenmeyer con 20 mL de buffer y se hirvió durante 30 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo se lo dejó enfriar, y se repuso el agua evaporada.

Estos tres erlenmeyer fueron utilizados para iniciar tres reacciones de hidrólisis de FDA a 30 °C luego de agregar el reactivo FDA en la concentración definida previamente (**Fig. 3**). Se tomaron alícuotas con micropipetas semiautomáticas de 10 µl de cada medio de reacción cada 5-10 min. Para esto, las reacciones en erlenmeyer se agitaron previamente para homogeneizar y rápidamente se depositaron las alícuotas sobre un rectángulo de papel whatman n°1 (**Fig. 3**). En el centro se observa un punto negro que corresponde a la tierra que por cromatografía no puede migrar como así lo hace la fase líquida.

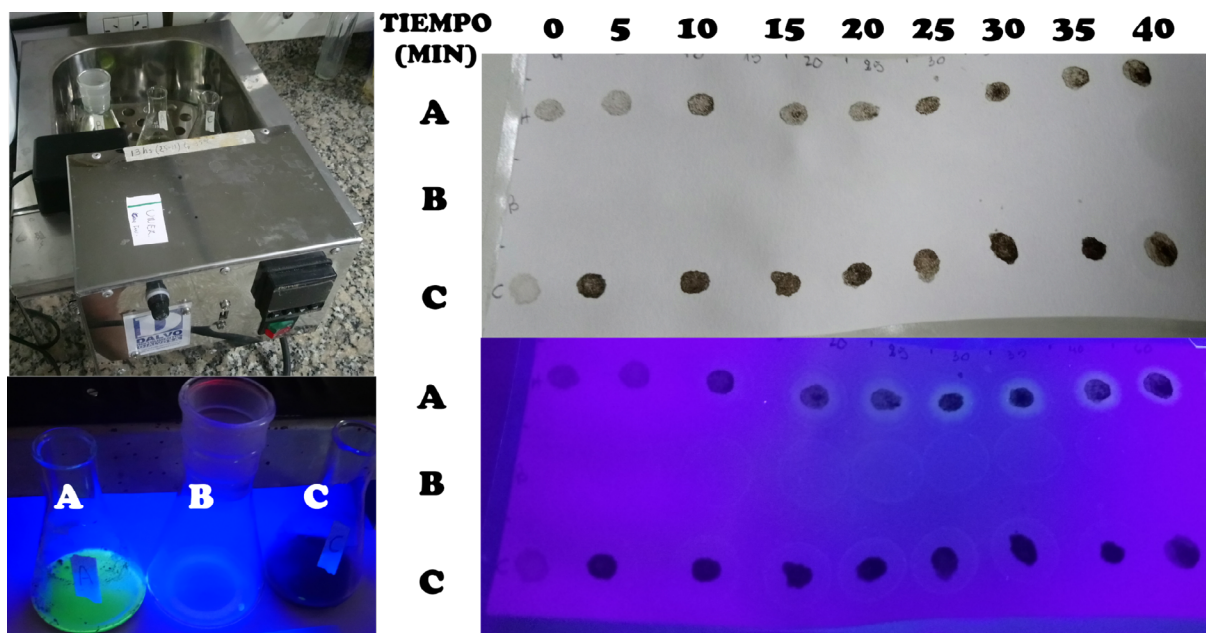


Figura 3: Análisis del grado de hidrólisis de FDA en el tiempo para muestras de suelo: sin tratar -A-, macerado -B- y hervido previamente -C-. Arriba a la izquierda: incubación de las tres reacciones en incubadora a 30 °C. Abajo a la izquierda: Reacción luego de 2h de reacción iluminadas con luz UV. Arriba a la derecha: Alícuotas de las 3 reacciones en papel whatman n°1 a cada tiempo iluminadas con luz visible. Abajo a la derecha: mismo papel que arriba pero iluminado con luz UV.

Estos resultados permiten sacar algunas conclusiones parciales:

Se pudo monitorear el avance de reacción por inspección visual de alícuotas de reacción en soporte papel sin la necesidad de detenerla con solvente como lo hace la técnica de referencia (Adam y Duncan 2001a; Schnürer y Rosswall 1982); sino por secado y evaporación en el mismo papel. Esto se refuerza al analizar el papel seco luego de los sucesivos días y no observar cambios en la intensidad de color.

A ojo desnudo se puede percibir que a los 15 min de reacción, para la muestra A se percibe un aro de fluoresceína cuando es estimulado con luz UV que aumenta hasta el final de la reacción.

El papel iluminado con luz visible no permite ver una tonalidad percible a ojo desnudo, para estas concentraciones y/o grado de hidrólisis alcanzado.

Se observa que tanto el control negativo (muestra C) como el macerado (muestra B) en los 40 min de reacción analizados no logran un grado de hidrólisis percible cómo si se observa en la muestra A.

El hecho de que el macerado de suelo no haya adquirido el mismo grado de hidrólisis en el mismo tiempo que la muestra de tierra sin tratar, da indicios de que las enzimas que degradan el FDA no lograron extraerse en medio líquido (al menos en las condiciones ensayadas). A partir de este resultado preliminar, podemos determinar que no parece una opción recomendable desarrollar reacciones enzimáticas sin la presencia conjunta de la tierra y el FDA en el mismo medio de reacción. Esto restringe posibles simplificaciones de diseño como puede ser el uso de tiras reactivas (con FDA inmovilizado previamente en papel) y el uso de extractos de suelo, evitando el desarrollo de la reacción en el mismo papel.

Hasta el momento el papel funcionó como soporte para poner en evidencia el color de reacciones líquidas desarrolladas en erlenmeyer a distintos tiempos. Dado que en campo se requiere una simplificación de los procedimientos, se evaluó y diseñó una metodología alternativa que pueda ajustarse mejor a mediciones en campo.

2.Evaluación de reacciones enzimáticas de forma continua

La metodología de referencia de hidrólisis de FDA requiere del transporte y procesamiento de muestras, incubación a una temperatura controlada durante 50 min, la detección química de la reacción, posterior centrifugación y filtración; y cuantificación por espectrofotometría de muestras vía interpolación en una curvas de calibrado (Adam y Duncan 2001a; Schnürer y Rosswall 1982). En esta nueva fase del proyecto se desarrolló y ensayó un formato de la reacción en tubos transparentes que prescinde de estos pasos dependiente de laboratorio y equipos.

Para determinar la sensibilidad del sistema, se realizaron pruebas con estándares de fluoresceína, registrando su comportamiento bajo exposición a luz azul similar a lo que se hizo en soporte papel, pero ahora directamente en los tubos. A partir de esas curvas, se definió un umbral mínimo detectable visualmente, lo que orientó la selección de la concentración inicial de FDA para las pruebas reales. Se estableció así una formulación que permitiera identificar reacciones incluso con una conversión del sustrato tan baja como el 5 %. La reacción consiste en tubos eppendorf de 1,5 mL con 1 mL de buffer fosfato (pH 7,6), 50 µL de una solución de FDA en acetona (2 mg/mL, Sigma-Aldrich F7378). La muestra de suelo se toma y dispone en la propia tapa del tubo que oficia de medida volumétrica. La reacción comienza al cerrar los tubos, y agitar manualmente los componentes del sistema.

Desarrollo y validación preliminar con muestras reales en campo

Se construyó un sistema experimental simple (similar a un kit) de rápida implementación. Este montaje, compuesto por una caja oscura de madera, una fuente de iluminación UV (lámpara portátil BLB-T5/4 W, alimentada a baterías) y una gradilla plástica desmontable. Un celular montado sobre la caja capturaba imágenes a intervalos regulares a una distancia de 20 cm de los tubos de reacción (**Fig. 4**). Esta arquitectura se complementa con frascos pequeños del buffer de la reacción y del sustrato FDA en la concentración definida; tubos eppendorf y pipetas pasteur para preparar las reacciones en campo. Una vez depositados los reactivos y las muestras dispuestas en sus respectivos tubos, son cerrados y agitados manualmente. La gradilla se coloca dentro de la caja, donde se monitorea la evolución de la fluorescencia mediante el celular.



Figura 4: Sistema experimental y validación de la metodología en campo. *Izquierda:* Interior de la caja oscura en la que se observa la gradilla con los tubos de reacción desmontable y la fuente de luz UV. *Derecha:* exterior de la caja oscura dónde se dispone un teléfono celular que registra imágenes de las reacciones enzimáticas en el interior de la caja.

Para realizar una prueba de concepto con este diseño se estableció un vínculo con algunas organizaciones y productores agroecológicos, en el marco de diversos proyectos (Acción extensión FIUNER-2023: “Salud y territorio: diálogo de saberes entre diversos actores de Oro Verde y alrededores - Acción extensión 2023 FIUNER” // “Soberanía alimentaria: tejiendo una trama para saber y hacer” (Proyecto Integralidad Funciones UNER-2023-2024 Res CS N° 323/23). A partir de ellas, se participó de una jornada taller con productores agroecológicos interesados en caracterizar la calidad de distintos suelos (**Fig. 5**). En dicha jornada, se ensayaron con la metodología aquí desarrollada seis muestras de suelos (pertenecientes a sistemas productivos de Entre Ríos, Argentina), previamente caracterizados con otros indicadores. Las muestras se diferencian por el tipo de cultivo, profundidad de extracción y grado de intervención antrópica. Entre ellas se incluyeron: suelos de pradera (a dos profundidades), suelos cultivados con soja y vicia, y una muestra de suelo no intervenido como referencia (prístino).



Figura 5: Taller “Cromatografía de Suelos: Una herramienta para evaluar la vitalidad de nuestros agroecosistemas” a cargo de los Ing. Agrónomos Maximiliano Nissero y Nicolas Indelangelo, junto a productores agroecológicos de Entre Ríos - Argentina. Jornadas en las que se analizaron muestras de suelos por la metodología aquí desarrollada.

Aunque el sistema experimental admite cualquier celular con cámara, en estas experiencias, las imágenes, se adquirieron con un smartphone *Xiaomi Mi 10T Lite* de forma manual con parámetros calibrados y fijos (ISO 700, velocidad de obturación 1/50 s, apertura f/1.8, enfoque macro). El análisis digital posterior consistió en procesar las imágenes capturadas por el celular, mediante el software ImageJ (FIJI) separando los canales de color (RGB), con interés en el canal verde, correspondiente al pico de emisión de fluorescencia (~520 nm). Se definieron regiones de interés (ROI) rectangulares constantes para cada tubo de reacción, permitiendo cuantificar la intensidad media de píxeles en función del tiempo (**Fig. 6**).

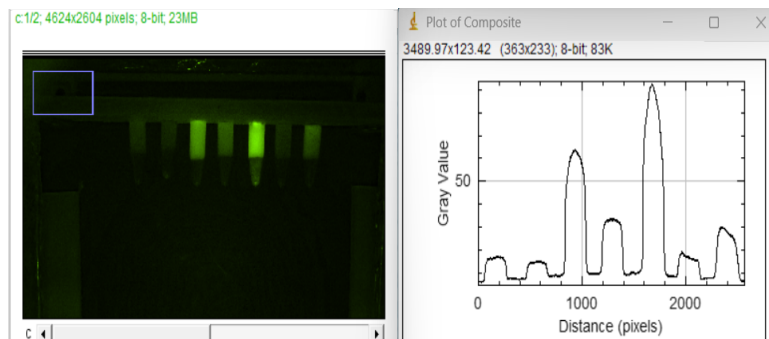


Figura 6: Análisis digital con el software ImageJ (FIJI) de las imágenes adquiridas por el smartphone de las reacciones de FDA con suelos reales. Izquierda: Selección de la región de interés de cada fotograma a un tiempo determinado de reacción. Derecha: gráfica de intensidad del canal verde vs. la posición en ‘x’ de cada imagen.

A partir de los datos de intensidad promedio para cada tubo de reacción y tiempo, se construyó un análisis temporal que permitió comparar la evolución de la fluorescencia entre suelos (**Fig. 7**). Los resultados mostraron diferencias consistentes. Los suelos más superficiales con cobertura vegetal activa y el suelo de referencia (prístino) mostraron una mayor intensidad de fluorescencia y una velocidad (relación intensidad/tiempo) de reacción más pronunciada entre los 15-30 min de iniciada las reacciones. Por el contrario, las muestras tomadas a 25 cm de profundidad y la superficial de cultivo de soja (con alta intervención antrópica) mostraron señales más tenues (de acumulación del producto fluorescente) y velocidades más bajas.

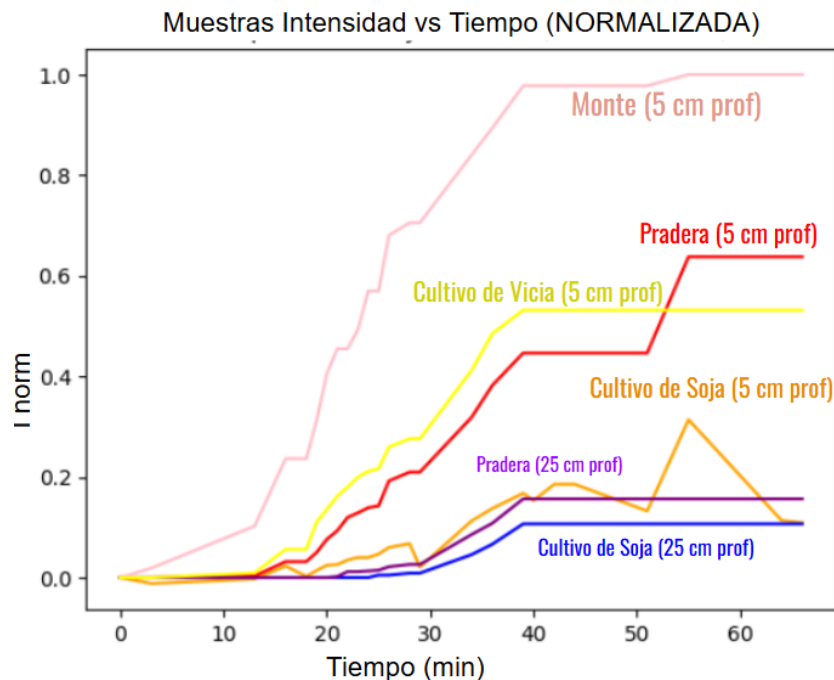


Figura 7: Avance de reacción de hidrólisis de FDA (Intensidad de color vs. el tiempo) para 6 muestras de suelo distintos de sistemas productivos de Entre Ríos, Argentina. Los valores de intensidad se normalizaron sobre el valor máximo de intensidad (100% de hidrólisis).

Cabe destacar que el objetivo no fue replicar con exactitud las condiciones del laboratorio, sino establecer una metodología comparativa entre muestras medidas en una misma condición que permita, en simultáneo y con recursos mínimos, diferenciar suelos en función de su vitalidad microbiana relativa. Estos resultados preliminares demuestran que las adaptaciones y simplificaciones realizadas al método de referencia (incluso evitando la incubación de las reacciones a temperatura controlada) es sensible a las condiciones del suelo y su historial (**Fig. 7**). Las diferencias entre capas superficiales y profundas, así como entre tipos de cultivo, fueron captadas por el sistema, validando su capacidad para discriminar actividad microbiana relativa en condiciones reales de trabajo y convalidada por los propios productores y otros indicadores utilizados durante la jornada (**Fig. 5**).

En función de esta experiencia, y con objetivo de brindar mayor portabilidad, autonomía y automatización en el procesamiento digital de las imágenes, se decidió desarrollar e incorporar mejoras en el diseño óptico y geométrico del dispositivo, ajustando la iluminación, el proceso de captura de imágenes y automatizando completamente el análisis digital de los datos. Estas modificaciones contribuyeron a incrementar tanto la sensibilidad como la precisión del prototipo.

Rediseño experimental y optimización del análisis digital

Basado en las limitaciones y hallazgos de la primera etapa, se emprendió una fase de rediseño para mejorar la precisión instrumental y la calidad del análisis. Esta nueva versión incorporó una gradilla impresa en 3D, diseñada específicamente para contener los tubos en una disposición óptica eficiente, evitar interferencias lumínicas y mejorar la reproducibilidad de la captura de imágenes. Se reemplazó la lámpara UV por LEDs

azules, colocados en un capuchón superior que iluminaba los tubos desde arriba. Esta disposición aseguró una excitación uniforme y redujo la variabilidad introducida por fuentes externas de luz. Además, al utilizar PLA negro como material de impresión, se maximizó el contraste entre la fluorescencia y el fondo, simplificando la detección digital (**Fig. 8**).



Figura 8: Diseño e implementación de la nueva gradilla experimental. Izquierda: vista posterior del modelo de la gradilla en Autodesk Fusion 360. Centro: vista anterior de la gradilla sin capuchón impresa en PLA negro con dos tubos de reacción. Derecha: gradilla impresa con capuchón y LEDs azules encendidos.

El registro fotográfico se mantuvo manual, pero con parámetros controlados (ISO, velocidad de obturación, enfoque), lo cual permitió estandarizar las condiciones de captura. Las imágenes se tomaban cada minuto durante los primeros 30 minutos de reacción, espaciándose progresivamente después de ese punto.

Simultáneamente, se desarrolló un *software* de análisis totalmente automatizado en *Python*, pensado para ejecutarse desde Google Colab, sin necesidad de instalaciones locales. Este pipeline es capaz de cargar las imágenes desde una carpeta en la nube, extraer el tiempo de cada captura, localizar automáticamente las regiones de interés, descomponer en los canales RGB y analizar la fluorescencia en el canal verde, convirtiendo los datos a escala de grises en el tiempo (**Fig. 9**).

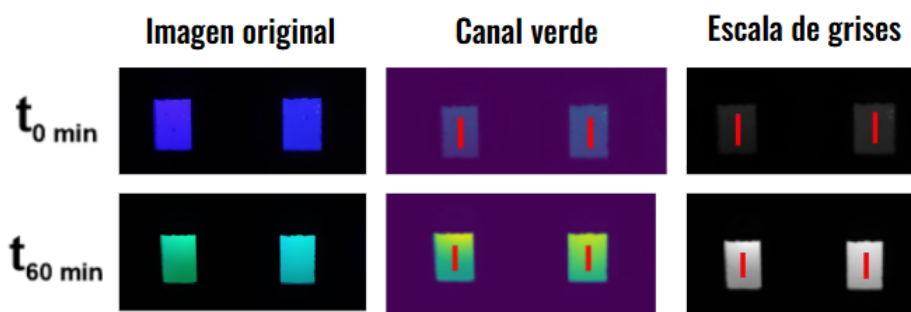


Figure 9: Procesamiento digital en python de las imágenes de dos tubos de reacción. Descomposición en canales de la imagen y conversión a escala de grises para dos tiempos (inicial y luego de 60 min de reacción). En la imagen central de cada ventana se observa la línea roja que incluye los píxeles utilizados para el análisis de la mediana de intensidad.

A través de filtros binarios y suavizado con algoritmos (Savitzky-Golay), el sistema identifica los píxeles relevantes y calcula la mediana de intensidad en cada región analizada. Luego, los valores son normalizados, permitiendo comparaciones entre muestras y condiciones (**Fig. 10**). Finalmente, se aplicaron regresiones lineales en ventanas móviles para estimar la pendiente de la curva en cada tramo, es decir, la velocidad instantánea de reacción (**Fig. 11**). Para poner a prueba el nuevo rediseño, se realizaron pruebas utilizando una misma muestra de suelo, pero variando su masa (50 mg y 100 mg). Las curvas obtenidas mostraron que la muestra con mayor cantidad de suelo alcanzaba niveles más altos de fluorescencia en menos tiempo, lo que se tradujo en mayores velocidades de reacción (**Fig. 10**). Esta diferencia fue coherente con el principio de que la actividad enzimática es proporcional a la cantidad de enzimas y por tanto a la cantidad de suelo en la reacción.

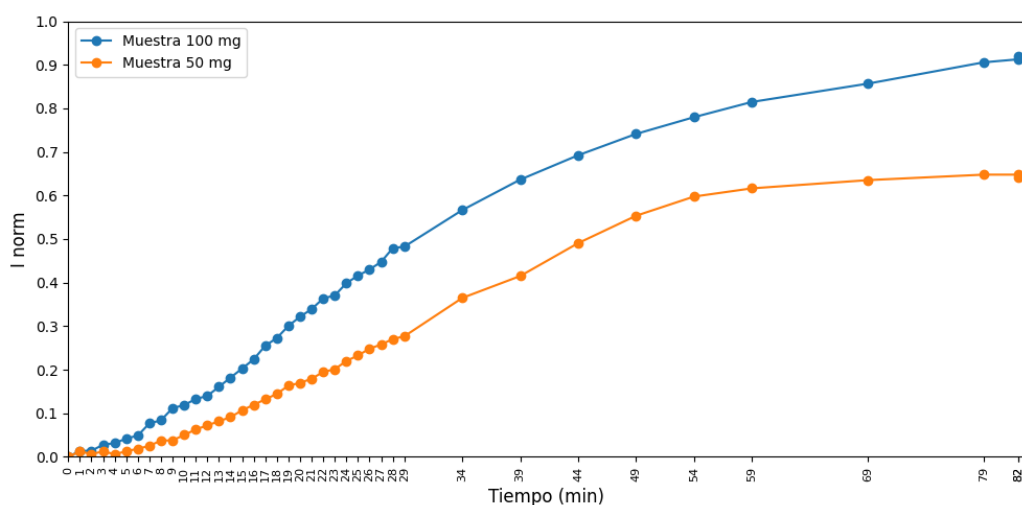


Figure 10: Curvas de intensidad normalizada vs. tiempo para una muestra de suelo, utilizando 50 mg (naranja) y 100 mg (azul).

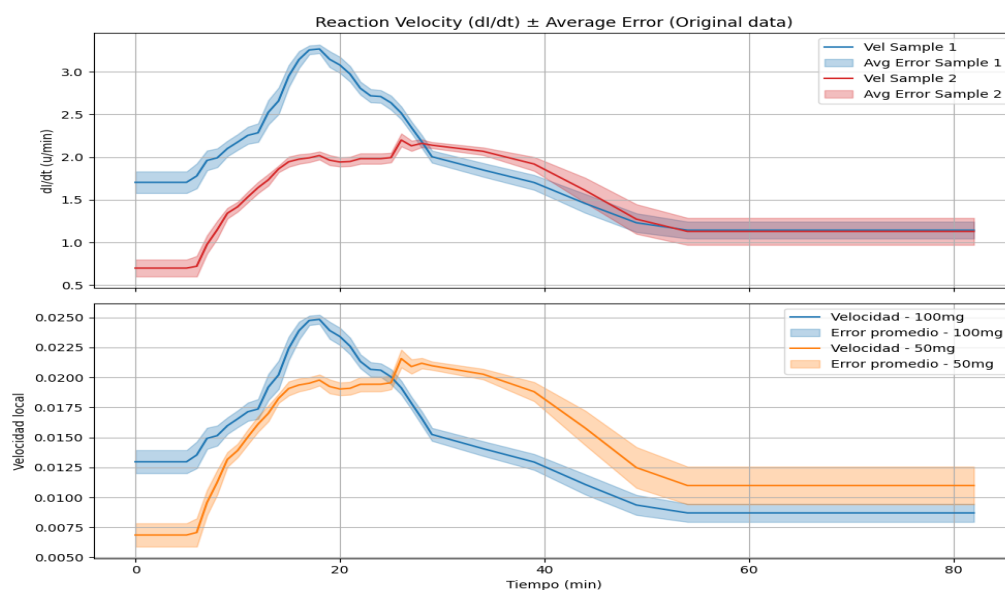


Figura 11: Velocidades locales vs. tiempo. El valor de la velocidad corresponde al valor de la pendiente.

La proporcionalidad observada en las velocidades de reacción entre ambas masas fue cercana al doble, lo que refuerza la capacidad del sistema para brindar información semicuantitativa fiable (**Fig. 11**). Además, se observó que las velocidades no eran constantes a lo largo del tiempo, sino que aumentaban hasta un máximo y luego disminuían, describiendo un perfil cinético dinámico. Este comportamiento puede estar relacionado con múltiples factores: acción de diversas enzimas con diferentes tasas de reacción agotamiento del sustrato, limitaciones de difusión del sustrato o el producto, sedimentación progresiva del suelo o incluso interferencias geométricas. No obstante, el sistema demostró ser suficientemente sensible y preciso como para estimar con bajo error las velocidades máximas, convirtiéndose en una herramienta robusta para evaluar actividad biológica de forma rápida y comparativa. Además, esta etapa demostró la capacidad del sistema para filtrar digitalmente la señal de fondo proveniente de los propios LEDs azules, evitando que la luz de excitación interfiera con la medición de fluorescencia. Esta característica amplía el rango dinámico del dispositivo y lo hace más confiable para su uso en condiciones variables.

La automatización del análisis no solo redujo la carga operativa del usuario, sino que permitió sistematizar el procesamiento de datos y generar curvas cinéticas de forma casi inmediata. La portabilidad del análisis y la independencia del laboratorio se consolidaron como ejes centrales del diseño. El valor diferencial del enfoque propuesto reside en su capacidad de capturar información dinámica de la reacción, abriendo la posibilidad de reducir significativamente el tiempo requerido para obtener resultados. Mientras que el método convencional necesita 50 minutos para alcanzar el punto final (Adam y Duncan 2001b; Schnürer y Rosswall 1982), el sistema aquí descrito permite identificar el momento óptimo de máxima actividad mucho antes, optimizando la eficiencia del diagnóstico. A su vez, esto demuestra que la velocidad enzimática no es constante durante los 50 min, y esta información puede tener un valor en la caracterización biológica de los suelos que el método de referencia estaría eclipsando.

El hecho de que el análisis pueda ejecutarse en plataformas web abiertas, como Google Colab, sin requerir instalaciones específicas, y que las imágenes puedan ser tomadas con un celular común, refuerza la aplicabilidad del sistema para usuarios no técnicos.

Entre las proyecciones a futuro, se destacan: la expansión de la base de datos con distintos tipos de suelos; la incorporación de patrones fluorescentes que permitan calibraciones internas y comparaciones entre experimentos; la optimización de la frecuencia de muestreo; y el desarrollo de una aplicación móvil que integre captura, análisis y visualización en un único entorno amigable.

Conclusiones finales

La magnitud que tiene la intervención antrópica en los suelos a través de los modos de producción intensivos tiene consecuencias que deben conocerse para luego poder encarar procesos de regeneración de ecosistemas y agro-ecosistemas. Por esto, surge la necesidad de desarrollar herramientas tecnológicas que asistan a los productores, instituciones y organizaciones sociales, y permitan monitorear la salud del suelo. Es fundamental, que quienes trabajan la tierra puedan conocer el impacto que tienen su intervenciones, de modo tal que puedan tomar decisiones para mejorar su estado y/o realizar un seguimiento de los procesos de recuperación, evitando recurrir a costosos análisis de laboratorio. En este contexto, el grupo de trabajo logró desarrollar y

adaptar una metodología de referencia de laboratorio (dependiente de equipamiento especializado) en una metodología semicuantitativa que evalúa la actividad microbiana total de muestras de suelos en campo. El desarrollo al día de hoy, acerca un procedimiento analítico junto con un Kit, que incluye reactivos, una caja capaz de acoplarse a un celular estándar para el monitoreo de reacción enzimáticas y su posterior análisis digital por *software online*. La misma es capaz de evaluar la actividad microbiana total de los suelos mediante el seguimiento visual y digital de reacciones fluorimétricas en el tiempo, sin necesidad de detener la reacción, separar fases, ni realizar análisis espectrofotométricos. A su vez, el aporte hace foco en: la portabilidad, la accesibilidad, el análisis rápido y robusto; y una minimización del uso de reactivos, insumos y equipamientos costosos. Se demostró que el sistema es capaz de distinguir entre muestras con diferente nivel de intervención antrópica y sensibilidad a la cantidad de suelo. La optimización geométrica de la gradilla, el uso de luz LED y el script desarrollado se tradujo en una mejora en la resolución, sensibilidad y automatización del análisis. También, al ser más compacto podrá permitir reemplazar en un futuro la caja de madera por una más pequeña y de plástico.

Es importante contemplar que si bien existe una fuerte correlación entre la salud del suelo, la actividad enzimática y la presencia de microorganismos, el resultado que pueda aportar la metodología aquí descrita, constituye un indicador que se complementa con otros, necesarios para la comprensión integral de las dinámicas que en el suelo se desarrollan. Con el desarrollo alcanzado, se logró realizar pruebas de concepto acercando la metodología a un grupo de productores, sirviendo también como una instancia comunicacional que correlaciona fácilmente el estado del suelo, el uso del mismo y los procesos biológicos que explican dicha correlación.

Indicadores de producción

Desarrollo de una metodología adaptada que permite evaluar calidad biológica de suelos de forma portable, accesible, rápido, minimizando el uso de reactivos, insumos y equipamientos costosos.

Diseño y prototipo de un sistema experimental que registra imágenes asistido por un celular y procesa digitalmente reacciones cinéticas fluorimétricas en el tiempo. Resultados de pruebas de conceptos que convalidan el uso pretendido con productores y organizaciones sociales interesadas.

Presentación de otro proyecto de investigación científica, desarrollo e innovación tecnológica (PID-UNER) título: "Estudio de tecnologías y metodologías fotométricas robustas y portables para aplicaciones en educación, salud y ambiente" (en evaluación). El mismo se profundizará en el diseño de un fotómetro que busca expandirse a otras aplicaciones fotométricas robustas de forma portable.

Los resultados del presente proyecto se compartieron en:

- **XXV Congreso Argentina de Bioingeniería (2025) y publicación en IFMBE proceedings de Springer** (aceptado para publicación). *Development of a portable sensor for the semi-quantitative determination of biological activity in soils*. Junquera, Santiago Ulises; Milesi, Solange Elizabeth; Fainstein, Diego German; Indelangelo, Nicolas; Peñalva, Albano; Zalazar, Martín Ángel; Di Barbaro, María Gabriela; Reta, Juan; Zapata, Daniel Adrián; Machtey, Matías.

- **1° Congreso Provincial de Agroecología realizado en la Universidad Nacional de Luján** (8 y 9 de noviembre de 2024). "Desarrollo de un sensor portable para la determinación de la actividad biológica en suelos" Junquera Santiago Ulises; Milesi, Solange Elizabeth; Zapata, Daniel Adrián, Indelangelo, Nicolas; Di Barbaro, Maria Gabriela; Fainstein, Diego German; Schierloh Luis Pablo; Zalar Martin Ángel; Machtey, Matías.
- **2° Congreso Provincial de Agroecología - Buenos Aires** (noviembre del 2026). "TC-5-193 Prototipado de un sensor portátil para la determinación en campo de la actividad microbiológica total en suelos" Junquera Santiago Ulises; Indelangelo, Nicolás; Romero Pompar, Franco; Zapata, Daniel Adrián; Fainstein, Diego German; Peñalva, Albano; Osella, Esteban; Machtey, Matías.

Bibliografía

- Adam, Gillian, y Harry Duncan. 2001a. «Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils». *Soil Biology and Biochemistry* 33 (7-8). [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00244-3](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00244-3).
- Adam, Gillian, y Harry Duncan. 2001b. «Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils». *Soil Biology and Biochemistry* 33 (7-8). [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00244-3](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00244-3).
- Akram, A. C., S. Noman, R. Moniri-Javid, et al. 2015. «Development of an automated ballast water treatment verification system utilizing fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of treatment efficacy». *Water Research* 70. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.12.009>.
- Alzate Ramírez, Juan David, y Daniela Campiño Arias. 2014. *Actividad microbiana de suelos con manejo orgánico y convencional*.
- C. Garcia. 2003. *Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana*. Mundi-Prensa. España.
- Destoumieux-Garzón, Delphine, Patrick Mavingui, Gilles Boetsch, et al. 2018. «The One Health Concept: 10 Years Old and a Long Road Ahead». *Frontiers in Veterinary Science* 5 (febrero). <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00014>.
- Geschke, Oliver, Henning Klank, y Pieter Telleman. 2004. *Microsystem Engineering of Lab-on-a-chip Devices*. <https://doi.org/10.1002/3527601651>.
- Herold, Keith E., y Avraham Rasooly, eds. 2009. *Lab on a Chip Technology: Volume 1: Fabrication and Microfluidics Illustrated*. Caister Academic Press.
- Hünemeyer, Anne-Juliane, de Camino, y Sabine Ronnie Müller. 1997. *Análisis del desarrollo sostenible en Centroamérica: indicadores para la agricultura y los recursos naturales*. IICA/GTZ.
- Justino, Celine I L, Armando C Duarte, y Teresa A P Rocha-Santos. 2017. «Recent Progress in Biosensors for Environmental Monitoring: A Review». *Sensors* 17 (12).
- Land, Kevin. 2019. *Paper-based Diagnostics Current Status and Future Applications: Current Status and Future Applications*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-96870-4>.
- Pandey, Chandra. 2017. *Biosensors: Fundamentals and Applications*.

- Patle, P. N., N. P. Navnage, y P. K. Barange. 2018. «Fluorescein Diacetate (FDA): Measure of Total Microbial Activity and as Indicator of Soil Quality». *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 7 (06): 2103-7. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.706.249>.
- Schnürer, Johan, y Thomas Rosswall. 1982. «Fluorescein Diacetate Hydrolysis as a Measure of Total Microbial Activity in Soil and Litter». *Applied and Environmental Microbiology* 43 (6): 1256-61. <https://doi.org/10.1128/aem.43.6.1256-1261.1982>.
- Ulloa Larrea, Gustavo Adolfo. 2014. *hidrólisis de fluoresceína diacetato y actividad de las enzimas proteasa, celulasa, nitrato reductasa y ureasa del suelo en bosque prístino, sur de chile*. (Valdivia-Chile).
- Wilson, Marcelo German, ed. 2017. *Manual de indicadores de calidad del suelo para las ecorregiones de Argentina*. Ediciones INTA.
- Yetisen, A K, M S Akram, y C R Lowe. 2013. «Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices - Lab on a Chip (RSC Publishing) DOI:10.1039/C3LC50169H». *Lab on a Chip*.

PID 6244

Denominación del Proyecto:

Desarrollo de un sensor portable para la determinación de la Actividad Biológica en suelos

Unidad de ejecución

Universidad Nacional de Entre Ríos

Dependencia

Facultad de Ingeniería

Cátedra, Área o disciplina científica

Grupo de Investigación en Microfluídica (GIM-FIUNER) Departamento de Fisicoquímica (FI-UNER). Disciplina: Ingenierías y Tecnologías, Salud Humana

Instituciones intervinientes

Convenio: FING-UER 015/2022: puesta a punto de un potencióstato open-hardware, propiedad de la FI-UNER, para su aplicación en técnicas electroquímicas con fines analíticos.

Contacto: matias.machtey@uner.edu.ar

Integrantes del proyecto

Director

Matías Machtey

Codirector/a:

Martin Zalazar

Integrantes internos/docentes UNER

Fainstein, Diego Germán; Zapata, Daniel Adrián;

Colaboradoras/es: Avetta, Valentina Denise; Escobar Guardia, Alejandro Alberto; Hereñu, María Del Huerto; Menghi, María Laura; Schierloh, Luis Pablo; Siebenlist, Matías Román

Becarias/os vinculadas al PID: Santiago Ulises Junquera

Fecha de inicio y finalización efectivas

01/07/2023 y 30/06/2025

Aprobación del Informe Final mediante resolución C.S. N° 108/26 (02/07/2026)