



Pontificia Universidad Católica del Ecuador
Sede Ibarra

**ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES
“ECAA”**

INFORME FINAL DEL PROYECTO

TEMA:

“CONSTRUCCIÓN DEL BIOSENSOR PARA DETECTAR ARSÉNICO EN AGUA
POR APLICACIÓN TECNOLÓGICA DE LA PUCE-SI”.

**PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERA EN CIENCIAS AMBIENTALES Y ECODESARROLLO**

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Línea 2. Ambiente y Biodiversidad
Sublínea 2.1 Recursos Genéticos

AUTORA: EDITH VERÓNICA MEJÍA SEGOVIA
ASESOR: M.Cs. SANTIAGO XAVIER MAFLA ANDRADE

IBARRA - 2018



Ibarra, 29 Junio del 2018

M.Cs. SANTIAGO XAVIER MAFLA ANDRADE

ASESOR

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final de investigación, el mismo que se ajusta a las normas vigentes en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA), de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI); en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.

(f)

M.Cs. SANTIAGO XAVIER MAFLA ANDRADE

C.C.: 1002658399



PÁGINA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

El jurado examinador, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI):

(f):.....

M.Cs. Santiago Xavier Mafla Andrade

C.C: 1002658399

(f):.....

Ph.D. Paola Elizabeth Ordoñez Vivanco

C.C.: 1103764872

(f):.....

Ph.D Andrea Elizabeth Aguilar Jaramillo


C.C.:1002873576



ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo Edith Verónica Mejía Segovia, declaro conocer y aceptar la disposición del Art.66 del Instructivo de Trabajo de Grado de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI), que en su parte pertinente manifiesta textualmente: "Forman parte del patrimonio de la universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través o con el apoyo financiero, académico o institucional de la universidad"

Ibarra, 29 de Junio del 2018

f) 

C.C.: 1722620877



AUTORÍA

Yo, Edith Verónica Mejía Segovia, portadora de la cédula de ciudadanía N° 1722620877, declaro que la presente investigación es de total responsabilidad del autor, y que se ha respetado las diferentes fuentes de información realizando las citas correspondientes.

A handwritten signature in blue ink, which appears to read "Edith Verónica Mejía Segovia", is centered on the page.

FIRMA

Edith Verónica Mejía Segovia

C.C.: 1722620877



DECLARACIÓN y AUTORIZACIÓN

Yo Edith Verónica Mejía Segovia con CC: 1722620877, autora del trabajo de grado intitulado: " Construcción del Biosensor para detectar arsénico en agua por aplicación tecnológica de la PUCCE – SI" . Previo a la obtención del título profesional de Ingeniera en Ciencias Ambientales y Ecodesarrollo, en la Escuela de Ciencias Ambientales y Agrícolas.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede- Ibarra, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCESI el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Ibarra, 29 de Junio del 2018

(f.) 


Edith Verónica Mejía Segovia

C.C.: 1722620877



**DECLARACIÓN DE COMPORTAMIENTO ÉTICO EN LA ELABORACIÓN,
DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE TRABAJOS DE TITULACIÓN**

Por medio de la presente declaro conocer y aplicar en la elaboración, desarrollo y evaluación del Proyecto de Titulación: "Construcción del Biosensor para detectar arsénico en agua por aplicación tecnológica de la PUCE – SI" , lo propuesto en el Código de Ética de la Investigación y el Aprendizaje de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, aprobado por el Consejo Superior de la PUCE con fecha 15 de Enero del 2018. Para constancia firma:

(f.) 

Edith Verónica Mejía Segovia

C.C.: 1722620877

Ingeniera en Ciencias Ambientales y Ecodesarrollo



DEDICATORIA

Dedico este Trabajo Investigativo a mi Madre Ximena, quien siempre ha sido mi fuerza, mi motivo de superación y ha sabido guiarme, me dio su apoyo absoluto e incondicional para poder culminar mis estudios.

A mi hermana Jacqueline, por estar para mí en todo momento.

A mi abuelito Víctor (en memoria) y mi abuelita Martha por darme su amor y consejos, por ser mi pilar en la vida y mí ejemplo a seguir.



AGRADECIMIENTOS

Principalmente doy las gracias a Dios por haberme guiado y acompañado durante mi carrera, por brindarme una vida llena de experiencias y aprendizajes, por ser mi fortaleza y mi luz en los momentos de debilidad

A mi madre Ximena Segovia por ser una parte muy importante en mi vida, quien ha sabido apoyarme, motivarme para seguir adelante, por ser mi fuente de inspiración para lograr todas mis metas y mis propósitos.

A mi hermana Jacqueline por ayudarme en todo momento, por llenar mi vida de alegría y amor cuando más lo he necesitado

A mis Queridos Abuelitos Víctor (en memoria) y Martha por ser el pilar en mi vida, representando la unidad familiar, por su infinito amor

Gracias infinitas a mi director de Tesis el Magister Santiago Mafla, por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su confianza, su experiencia y su apoyo incondicional, ha logrado en mí que pueda culminar mis estudios con éxito

Al Ingeniero Diego Jáuregui por el valioso tiempo y apoyo brindado para el desarrollo de esta investigación

De igual manera agradecer a mis profesores que fueron parte de mi formación educativa, por haber compartido conmigo sus conocimientos y sobre todo su amistad

A mis amigos por confiar en mí, por haber formado parte de mi etapa universitaria y hacer más divertida esta experiencia. En especial a mi gran amigo Pablo Andrés quien estuvo apoyándome en todo momento, por brindarme su amistad incondicional, sus consejos y compañía en los momentos más difíciles de mi vida, quiero darte las gracias por formar parte de mí y por todo lo que me has brindado



ÍNDICE DE CONTENIDOS

I RESUMEN	1
I ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
1.2. Objetivos	5
1.2.1 Objetivo general	5
1.2.2 Objetivos específicos	5
1.3. Hipótesis	6
1.3.1. Variable independiente:	6
1.3.2. Variable dependiente:	6
ESTADO DEL ARTE	7
2.1. Arsénico (As)	7
2.1.1. Descripción del compuesto químico	7
2.1.2. Toxicidad	7
2.1.3. Límites máximos permisibles según la OMS, la EPA y la Normativa Técnica Ecuatoriana sobre el Arsénico	7
2.2. Biosensor	8
2.2.1. Introducción	8
2.2.2. Características de los biosensores:	9
2.2.3. Ventajas de los Biosensores	9
2.3. Estudios Realizados sobre Biosensores para la Detección de Arsénico	9
2.4. Genes ARS	11
2.5. Técnicas de Medición de Arsénico (As)	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1. Lugar de desarrollo de la Investigación	13
3.2. Método	13
3.2.1. Diseño experimental	13
3.3. Desarrollo del ensayo	13
3.3.1. Identificación de Proteínas resistentes al Arsénico	14
3.3.2. Extracción de proteínas	14



3.3.3. Análisis de las proteínas mediante la técnica SDS-PAGE	15
3.3.4. Elaboración del Plásmido	16
3.3.5. Método Físico Electroporación	17
3.3.6. Transformación celular y preparación del biosensor a diferentes concentraciones	20
3.3.7. Análisis de Arsénico por metodología de Espectrofotómetro de microplacas EPOCH	21
3.3.8. Análisis de Arsénico por metodología de EAA (Espectroscopia de Absorción Atómica)	21
3.3.9. Método de Control – Tinción Gram	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1. Proteína Resistente al Arsénico Identificada	24
4.2. Fabricación del Plásmido para detección de arsénico	26
4.3. Electroporación – Expresión	28
4.4. Cuantificación de As en Espectrofotómetro de microplacas EPOCH y Espectroscopia de Absorción Atómica (EAA)	30
4.5. Análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis	34
4.5.1. Espectrofotómetro de microplacas EPOCH	34
4.5.2. Espectroscopia de Absorción Atómica	37
4.6. Socialización de la Investigación	39
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	41
5.1 Conclusiones	41
5.2 Recomendaciones	42
BIBLIOGRAFÍA	43
CERTIFICACIÓN ANTIPLAGIO	48
ANEXOS	49



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Comparación de Técnicas de medición de As</i>	12
Tabla 2. <i>Descripción de los tratamientos evaluados en la investigación</i>	13
Tabla 3. <i>Preparación de las soluciones stock de SDS - PAGE</i>	15
Tabla 4. <i>Método Utilizado para la lectura de Arsénico</i>	22
Tabla 5. <i>Características de la Secuencia del Gen</i>	26
Tabla 6. <i>Concentración de arsénico por metodología de Espectrofotómetro de microplacas EPOCH y Espectroscopia de Absorción Atómica en Horno de grafito (GFAAS)</i>	31
Tabla 7. <i>Prueba analítica de Homogeneidad de Varianza de concentración de arsénico</i>	34
Tabla 8. <i>Prueba de Kruskal-Wallis comparativa por pares de EPOCH por Tratamiento</i>	36
Tabla 9. <i>Prueba analítica de Homogeneidad de Varianza de absorbancia del EAA</i>	37
Tabla 10. <i>Prueba de Kruskal-Wallis comparables por pares de EAA por Tratamiento</i>	38



ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Esquema de un Biosensor	8
<i>Figura 2.</i> Representación esquemática del operón de resistencia a arsénico, está conformado por tres genes estructurales (ArsA, ArsB, ArsC) y dos genes reguladores (ArsD, ArsR).	11
<i>Figura 3.</i> Electroporador - Neon Transfection System de Invitrogen	19
<i>Figura 4.</i> Curva de calibración del blanco para la lectura de Arsénico.....	22
<i>Figura 5.</i> Ajustes de la lámpara de arsénico.....	23
<i>Figura 6.</i> Electroforesis en gel SDS PAGE con gradiente de denaturalización (10%-40%). Carril 1: Marcador de peso de proteínas (kilodaltons - kDa); carril 2: expresión de proteínas en un medio sin arsénico; carril 3 gen arsB y arsC en un medio con arsénico a 0,01 ppm; la flecha indica la posición de las proteínas y la masa molecular.	24
<i>Figura 7.</i> Mapa esquemático del plásmido pTOP Blunt V2 (3807) Una molécula de topoisomerasa (TOPO) se acopla covalentemente a los 3 extremos dúplex en las posiciones nt 294 y 295 de pTOP Blunt V2. Por lo tanto. pTOP Blunt V2 puede formar un enlace covalente con productos de PCR de los extremos finales mediante Pfu DNA polimerasa. .	27
<i>Figura 8.</i> Cepas Transformadas por método de Electroporación	28
<i>Figura 9.</i> Expresión de luminiscencia a una concentración de 0,08 ppm	29
<i>Figura 10.</i> Determinación de luminiscencia a diferentes concentraciones de As	29
<i>Figura 11.</i> Curva de absorbancia 550 nm por metodología de Espectrofotómetro de microplacas EPOCH de arsénico a diferentes concentraciones	32
<i>Figura 12.</i> Curva de absorbancia por Espectroscopia de Absorción Atómica en Horno de grafito (GFAAS) de arsénico a diferentes concentraciones	33
<i>Figura 13.</i> Residuos de Homogeneidad de concentración de arsénico (EPOCH)	35
<i>Figura 14.</i> Normalidad de cálculo de concentración de arsénico de Shapiro-Wilk. (EPOCH) ...	35
<i>Figura 15.</i> Gráfico de barras de error con 95%	36
<i>Figura 16.</i> Residuos de Homogeneidad de concentración de arsénico (EAA)	37
<i>Figura 17.</i> Normalidad de cálculo de concentración de arsénico de Shapiro-Wilk. (EAA)	38
<i>Figura 18.</i> Gráfico de barras de error con 95%	39

I Resumen

El arsénico es un semimetal que tiene la capacidad de formar diversos compuestos orgánicos e inorgánicos, siendo muy tóxico su forma inorgánica. En la actualidad existen diversos métodos para la cuantificación de arsénico (As) en agua: Espectroscopia de Absorción Atómica, Kits comerciales, entre otros; los cuales poseen un alto poder de resolución, sensibilidad y reproducibilidad, sin embargo su operación puede ser costosa y de difícil operación. Los biosensores bacterianos surgen como alternativa económicamente más accesible, con mediciones potencialmente más rápida. El presente estudio tuvo como objetivo la elaboración de un biosensor bacteriano para la detección de Arsénico utilizando la bacteria *Escherichia coli* modificada. Esta cepa transformada tiene insertado el plásmido pTOP Blunt V2, el cual confiere resistencia a la ampicilina, para la realización del plásmido fueron sintetizados los genes: *lux* y *ars*. Se utilizó la técnica de Electroporación para la transformación y recombinación de células, las cuales fueron sometidas a impulsos eléctricos controlados, posterior a ello, se cultivó en agar LB y se sometió a pruebas de tolerancia de As a concentraciones de 0; 0,01; 0,02; 0,04 y 0,08ppm como única fuente de energía. Se determinó la absorbancia de As por metodología de Espectrofotómetro de microplacas EPOCH y Espectroscopia de Absorción Atómica, dando como resultado la ecuación: $y = 0,0005x + 0,1526$ de la curva con un $R^2 = 0,9975$ con diferentes absorbancias y concentraciones. Finalmente, Se pudo tener un biosensor competente para medir concentraciones de As de 0,01 a 0,08ppm con un error promedio de 2,8% con respecto a medición de Espectroscopia de Absorción Atómica.

Palabras Claves: Biosensor bacteriano, Arsénico, *Escherichia coli* modificada, operón Ars

I Abstract

Arsenic is a semantic element that has the ability to form organic and inorganic compounds, its inorganic form being very toxic. At present there are methods for the quantification of arsenic (As) in water: Atomic Absorption Spectroscopy, commercial Kits, among others; those that have a high power of resolution, sensitivity and reproducibility, however, their operation can be expensive and difficult to operate. Bacterial biosensors emerge as an economically more accessible alternative, potentially potentially faster. The objective of this study was the development of a bacterial biosensor for the detection of arsenic using the modified *Escherichia coli* bacterium. This transformed strain has the plasmid pTOP Blunt V2 inserted, which confers resistance to ampicillin, for the realization of the plasmid the genes were synthesized: *lux* and *ars*. The Electroporation technique was used for the transformation and recombination of cells, which were subjected to controlled electrical impulses, afterwards, it was cultivated on LB agar and subjected to tolerance tests of A at concentrations of 0; 0.01; 0.02; 0.04 and 0.08ppm as the sole source of energy. The absorbance of As was determined by Method of EPOCH Microplate Spectrophotometer and Atomic Absorption Spectroscopy, resulting in the equation: $y = 0.0005x + 0.1526$ of the curve with $R^2 = 0.9975$ with different absorbances and concentrations. Finally, it was possible to have a competent biosensor to measure the As levels from 0.01 to 0.08ppm with an average error of 2.8% with respect to the Atomic Absorption Spectrophotometry measurement.

Key words: Bacterial biosensor, Arsenic, Modified *Escherichia coli*, Ars operon

INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso natural indispensable para el desarrollo de la vida en la tierra. Por eso el tema de contaminación de este recurso hídrico se ha vuelto de gran interés a nivel mundial. (ATSDR, 2007). Actualmente en nuestro país hay un incremento de contaminación al agua debido a varios motivos, uno de ellos, es la explotación minera tanto de forma artesanal como la minería a mayor escala, siendo las mineras artesanales las que más contaminación de metales pesados aporta al ambiente por su falta de control, por esta razón, en los últimos tiempos ha aumentado la contaminación en las fuentes hídricas, debido al incorrecto manejo de las mineras que operan en estos lugares en las aguas residuales procedentes de esta actividad. (Legarreta, 2015)

Las mineras tienen impactos negativos al medio físico, debido a la instalación de la maquinaria necesaria para el cumplimiento de la misma, que destruyen zonas de la naturaleza, como por ejemplo emite material particulado y gases, vertiendo ácido de mina y lixiviados contaminantes sin control. (Legarreta, 2015)

El lixiviado de contaminantes tóxicos como el arsénico, puede empezar en ausencia de condiciones ácidas. En la Guía para Evaluar Proyectos Mineros del 2001 menciona que “La Lixiviación y el drenaje ácido contaminante son los principales para la generación de impactos en el agua con relación a la minería metálica”.

Como explica Earthworks:

“Los metales pesados son peligrosos, debido a que estos, no se destruyen en el ambiente, sedimentándose y persistiendo en el fondo de los lechos de los riachuelos, ríos, por largos periodos de tiempo, formando una fuente de contaminación a largo plazo que afecta directamente a especies que viven ahí.” (Earthworks Fact Sheet, 2000)

El arsénico se lo puede encontrar como un componente natural de la corteza terrestre en forma de un mineral, como sal u otros tipos de compuestos, este puede ser absorbido por las raíces de las plantas, y de esta forma puede unirse a las cadenas tróficas, a su vez se volatiliza hacia la atmósfera (Rooney et al. 2006, Zhao et al. 2006) citado por (Mancilla., et al, 2012).

Este metaloide es muy tóxico en su forma inorgánica. Su mayor amenaza para la salud pública reside en la utilización de agua contaminada para beber, preparar alimentos y regar cultivos alimentarios. El arsénico es considerado como una de las 10 sustancias químicas más preocupantes para la salud pública y el ambiente por la Organización Mundial de la Salud (OMS). (OMS, 2018).

En la actualidad hay diferentes técnicas convencionales para la detección y cuantificación de arsénico, las cuales pueden llegar a ser muy costosas y algunas pueden ser tóxicas. Una de estas técnicas es la Espectrometría de Absorción Atómica, esta técnica analítica es una de las más utilizadas, debido a su alta sensibilidad y poder de resolución. (Metalyser, 2013).

Otras técnicas con “kits” comerciales son: El Arsen-test (Merck), esta técnica trabaja con concentraciones entre $10 \mu\text{g. L}^{-1}$ y $100 \mu\text{g. L}^{-1}$. El Hach es otra técnica que permite la detección de arsénico, este posee una gama de colores más amplia, trabaja con concentraciones entre 10 y $70 \mu\text{g.L}^{-1}$, atrapa el gas arsina que se produce en una determinación mediante los tubos de reacción que tiene la tapa. (Erickson, 2013).

Además, existen nuevas técnicas biotecnológicas que permiten la creación de nuevas alternativas con mayor exactitud, precisión, facilidad de uso, adecuada para trabajar en campo, más rápida y de bajos costo como son los biosensores bacterianos, microorganismos modificados que pueden detectar arsénico en agua, sin la generación de productos tóxicos al ambiente. (Microlab Industrial, 2015)

Por esta razón se propone realizar biosensores por medio de la aplicación de tecnología de los laboratorios de la PUCE – SI, utilizando la bacteria *Escherichia coli* modificada la cual puede ser capaz de detectar la presencia de arsénico en un medio líquido, esta presencia del metal pesado reaccionará en la región promotora del operón ARS el cual expresará proteínas de membrana para metabolismo del arsénico, donde se determinaran cepas de bacterias resistentes a estos metales de los cuales se extraerán la sección de ADN que permite la creación de la proteína que las vuelve resistentes para insertar en un plásmido junto con una hibridación para luminiscencia con luciferasa, este será insertado dentro de una bacteria que será utilizado como kit biológico. (Peña, 2003).

1.2. Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Elaborar un kit en base a biosensores bacterianos para la detección de Arsénico mediante el uso de una bacteria competente.

1.2.2 Objetivos específicos

1. Identificar la proteína resistente al Arsénico en bacterias mediante la técnica “SDS PAGE” la cual servirá para extraer el gen de interés a ser insertado en una nueva cepa.
2. Construir la cepa bacteriana de *E. coli* con el plásmido fabricado para la detección del arsénico, mediante electroporación obteniendo una cepa viable y resistente.
3. Probar el biosensor usando diferentes concentraciones de metales pesados y comparando con una técnica analítica.
4. Socializar los resultados de la investigación mediante una conferencia al personal del ministerio del ambiente, SENESCYT, y personal interesado en el desarrollo de estas tecnologías.

1.3. Hipótesis

Es posible desarrollar un biosensor en base a bacterias resistentes para la detección de arsénico

1.3.1. Variable independiente:

- Concentraciones del Metaloide (arsénico)

1.3.2. Variable dependiente:

- Luminiscencia

ESTADO DEL ARTE

2.1. Arsénico (As)

2.1.1. Descripción del compuesto químico

Número atómico es 33, peso atómico $74\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Tiene 17 nucleídos radiactivos. El arsénico es un semi- metal debido a que conduce solo electricidad pero no calor, es de baja ductibilidad. (Londoño, et al, 2016). (Anexo 1)

Reyes, et al, (2016) en su publicación menciona que “El arsénico puede circular en los diferentes ecosistemas naturales por un periodo de tiempo y puede ser incorporado en el suelo y en el agua”. Este es acumulado por los animales y vegetales, pudiéndose transmitir al ser humano a través del consumo de los mismos. (ELIKA, 2013). (Anexo 2)

2.1.2. Toxicidad

La toxicidad del arsénico es reconocida como carcinogénica, ya que puede causar deformaciones o mutaciones para el ser humano (Morales, et al., 2017), esto depende en gran medida de la forma química (estado de oxidación y del radical al cual está unido) y la cantidad en que sea ingerido. Al contrario de lo que sucede con algunos de los metales, los compuestos inorgánicos de arsénico son más tóxicos que los orgánicos, esto se debe a la capacidad para poder atravesar membranas biológicas y a la mayor solubilidad de los tejidos lipídicos. (García, 2013)

2.1.3. Límites máximos permisibles según la OMS, la EPA y la Normativa Técnica Ecuatoriana sobre el Arsénico

La EPA ha establecido una cantidad límites de arsénico que es liberado al ambiente por fuentes industriales y ha restringido o ha cancelado muchos usos de arsénico en pesticidas, estableciendo un límite máximo permisible de 0.01 ppm para arsénico en agua potable y por ende para consumo humano. (INEN, 2014).

Por otro lado, la Administración de Salud y Seguridad Ocupacional (OSHA) ha establecido límites máximos permisibles de 10 μg de arsénico por metro cúbico de aire en el trabajo ($10 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$) durante jornadas de 8 horas diarias, 40 horas a la semana. (ATSDR, 2007). La Norma técnica Ecuatoriana 1108 en los requisitos de calidad de agua, establece 0,01 ppm como el máximo permisible de arsénico en el agua potable. (INEN, 2014). (Anexo 3)

2.2. Biosensor

2.2.1. Introducción

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) define como “un biosensor es un dispositivo que tiene la capacidad proporcionar una información específica ya sea cuantitativa o semi-cuantitativa, el cual utiliza un elemento receptor biológico, el mismo que está en contacto con un elemento transductor proporcionando una señal”(Peña, 2003).

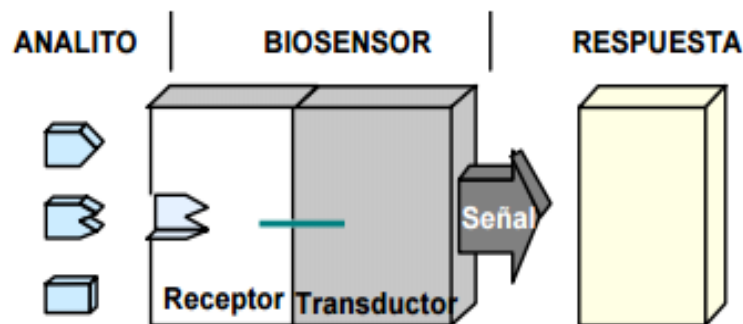


Figura 1. Esquema de un Biosensor

Fuente: (Peña, 2003).

Peña (2003) en su tesis nos menciona un biosensor depende de la inmovilización del sistema de reconocimiento biológico para el buen funcionamiento, permitiendo la conversión de la interacción del analito junto con el receptor emitiendo una respuesta de luminiscencia, que luego será procesada y será relacionada con la concentración del analito.

El objetivo fundamental de la inmovilización del sistema de reconocimiento biológico es permitir el contacto entre el receptor y el transductor manteniendo inalterable la estabilidad del sistema de reconocimiento. Los dispositivos de este tipo deben responder de manera continua al analito de interés sin alterar la muestra, eliminando de esta forma la necesidad de su pre-tratamiento. (Peña, 2003).

2.2.2. Características de los biosensores:

Castro, et al (2007) en su publicación menciona las principales características de los biosensores, como son: su alta sensibilidad, alta selectividad (para que el dispositivo interaccione exclusivamente con el compuesto de interés y no con otros) (Castro, et al., 2007), son de tamaño pequeño, son económicos de producir, cuentan con una gran versatilidad que permite el diseño del dispositivo, la gran portabilidad; lo que permite usar cantidades bajas (micro/nanolitros) de muestra en el análisis, lo cual es de gran importancia debido a que se puede realizar análisis de ADN, de sangre o si la muestra es muy complicada de obtener o a su vez es muy costosa. Además pueden realizar análisis en tiempo real y de una forma directa. (Cortón, 2011)

2.2.3. Ventajas de los Biosensores

- Permiten medir un analito sin purificación previa
- Altamente específicos (enzimas), o más o menos inespecíficos (microbianos)
- La información obtenida es mucho más real que con los métodos analíticos clásicos (biodisponibilidad)
- Mediciones rápidas y equipos portátiles han sido diseñados
- Es necesario, entonces, sistemas analíticos de amplio espectro, inespecíficos (Cortón, 2011)

2.3. Estudios Realizados sobre Biosensores para la Detección de Arsénico

Existen estudios previos donde han elaborado biosensores para la detección de arsénico tomando muestras en diferentes fuentes de abastecimiento de agua, por ejemplo a continuación se citará algunos casos:

- Oliver Valenzuela, (2010) realizó una evaluación de arsénico en agua empleando biosensores microbianos en México, utilizando la bacteria *E. coli* por medio de técnicas que permiten la cuantificación de arsénico en muestras de agua. Se utilizó cepas transformadas de cepas de *E. coli* pMV132-arsR-ABS y *E. coli* pJAMA-arsR-ABS las cuales tienen insertado un plásmido que le concede una resistencia a la ampicilina, codificado para la β - galactosidasa y luciferasa respectivamente. Determinando las condiciones óptimas de operación en base a una serie de modificaciones a métodos por Stocker y Van Der Meer, posteriormente evaluó estos métodos junto con Espectroscopia de Absorción Atómica (EAA) y Wagtech Arsenator digital mediante un análisis estadístico, donde encontró que el EAA y Wagtech Arsenator tiene un intervalo de trabajo amplio, una mayor sensibilidad, y en comparación con otros biosensores probados no tiene ningún efecto matriz.
- Wackwitz, (2008) junto con sus compañeros, realizaron un estudio sobre la Calibración interna de bioensayos de arsenito con la utilización de múltiples líneas de células bioreportadoras, utilizando diferentes *Escherichia coli* que expresan citocromo o β -galactosidasa que fueron construidos tras la inducción de arsenito. Dando como resultado una producción de señal con varias intensidades en la misma concentración de arsenito, lo que les permitió utilizar combinaciones de líneas celulares para definir la concentración de arsenito gamas, en las cuales no dieron señales cualitativas en una o más líneas celulares.
- Stocker, junto con sus compañeros, en una publicación que realizaron en el 2003, sobre un desarrollo de un conjunto de Biosensores bacterianos para la rápida y Cuantitativa Medición de arsenito y arsenato en agua potable, donde utilizaron el mecanismo de resistencia natural de *E. coli* de un laboratorio no patógena contra el arsenito y el arseniato, con tres proteínas reporteras: la luciferasa bacteriana, la β galactosidasa y la Proteína Verde Fluorescente (GFP). Dando como un resultado que el sistema más cuantitativo expresó la luciferasa bacteriana, siendo la proteína informadora, la cual respondió proporcionalmente a rangos de concentraciones más altas.

2.4. Genes ARS

Los biosensores microbianos son una alternativa de uso para la detección de arsénico en agua, para lo cual se utilizó la bacteria gram negativa *Escherichia coli*, esta bacteria tiene un mecanismo de resistencia al arsenito y arsenato; la misma que está codificada con un plásmido, que posee un operón ars, formado a su vez, por genes estructurales como: arsA (produce una ATPasa estimulada por oxidación que acopla la hidrólisis de ATP con la salida de compuestos arsenicales); ArsB (codifica una proteína de la membrana de la célula, donde el arsenito bombea directamente fuera de la misma); así como ArsC. (Daunert et al., 2000).

Además, posee dos genes reguladores que son: ArsR (Codifica una proteína represora la cual regula la expresión de los genes Ars) y ArsD (Controla los máximos niveles de la proteína represora). (Daunert et al., 2000)



Figura 2. Representación esquemática del operón de resistencia a arsénico, está conformado por tres genes estructurales (ArsA, ArsB, ArsC) y dos genes reguladores (ArsD, ArsR).

Fuente: (Valenzuela, 2010)

Valenzuela, (2010) menciona en su tesis que en ausencia del arsenito, el gen represor ArsR está unido al operador y/o promotor del operón ars, evitando de esta manera la expresión de los genes estructurales. Una vez que el arsenito ingresa en la célula por medio del arsenito reductasa, interacciona con ArsR uniéndose a la misma, provocando un cambio en la conformación del represor, dando como resultado la disociación de ArsR del sitio operador/promotor, elevando la expresión de los genes del operón ars.

2.5. Técnicas de Medición de Arsénico (As)

Existen algunas técnicas para la medición de arsénico total, siendo las más comunes la Espectrometría de absorción atómica (EAA), con llama o con cámara de grafito y la espectrometría de fluorescencia, además de estas técnicas existen Kits comerciales que también permiten la medición de arsénico (García, 2013). A continuación compararé la técnica de Espectroscopia de Absorción Atómica en Horno de grafito (GFAAS) con un Kit Comercial “Arsenic-test (Merck)”:

Tabla 1. Comparación de Técnicas de medición de As

	TÉCNICAS	
	Espectroscopia de Absorción Atómica en Horno de grafito (GFAAS)	Arsen-test (Merck)
Rango de medición	Rango de 5 - 40 $\mu\text{g. L}^{-1}$ y, por dilución, mayores concentraciones. (Manay, et al., 2009)	Rango de un mínimo de 0.001 mg. L^{-1} a un máximo de 0.100 mg. L^{-1} (Merck, 2015)
Sensibilidad	Más sensible	Menos sensible
Reproducibilidad	Alta reproducibilidad	Poco reproducibilidad
Ventajas	Posibilidad de trabajar con volúmenes pequeños de muestras, y descender así a ppb los límites de detección para muestras biológicas y ambientales. (Litter, Armienta, & Farías, 2009)	Fácil de manejar. (Valenzuela, 2010)
Desventajas	Menor precisión y el mayor número de interferencias. (Litter, Armienta, & Farías, 2009)	Durante su desarrollo se produce gas de arsina. (Valenzuela, 2010)
Utilidad	Laboratorio	Laboratorio

Fuente: Autora

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de desarrollo de la Investigación

La siguiente investigación se ejecutó en el laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales de la Pontificia Universidad Católica Sede Ibarra.

3.2. Método

3.2.1. Diseño experimental

En la presente investigación se realizó un análisis no paramétrico, usando la prueba de Kruskal-Wallis, además, se realizaron tres repeticiones para cada tratamiento.

Tabla 2. Descripción de los tratamientos evaluados en la investigación

Tratamientos	Concentración de Arsénico	% de Arsénico*
Testigo	0 ppm	0 %
T2	0,01 ppm	100 %
T3	0,02 ppm	200%
T4	0,04 ppm	400 %
T5	0,08 ppm	800 %

Fuente: Autora

Se trabajó con diferentes concentraciones de arsénico (As) tomando como concentración mínima, la concentración máxima permitida para el consumo humano 0,01 ppm (INEN, 2014) y a partir de ello duplicando las concentraciones en un 200%, 400% y 800%, además, estas concentraciones se basaron en la investigación de realizada por (Navarrete, 2017).

3.3. Desarrollo del ensayo

Para la determinación de la variable dependiente y obtención del resultado de la presente investigación se realizaron varios pasos que se describe a continuación:

3.3.1. Identificación de Proteínas resistentes al Arsénico

Del laboratorio de Biotecnología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra se obtuvo la cepa de *E. coli*, la cual se describe en la tesis: “Identificación de Proteínas de membrana de bacterias aisladas en un medio enriquecido con Arsénico (As) mediante la técnica de SDS Page para la Remoción del Metaloide”(Navarrete, 2017). La misma que fue cultivada en caldo LB de LAB a Neogen Company LB Broth, (Luria Bertani) ®, con una concentración de 0,01 ppm de As y sin concentración de As, después del crecimiento bacteriano a las 24 horas se procedió a extraer las proteínas.

3.3.2. Extracción de proteínas

Se realizaron pellets de las muestras a las 24 horas de crecimiento en la Centrifuga Thermo Scientific™ Sorvall™ ST 8 / 8R a 3000 rpm con una temperatura de 4° C para enlentecer los procesos. El procedimiento empleado se basó en el trabajo de Daza, et al., (2016).

Se re-suspendió el sedimento bacteriano en 1 ml de Buffer TEN (50 mM Tris HCL, pH 8.0 – 100mM NaCl – 10mMEDTA –), 20 µL de lisozima y 9 ml de agua destilada fría a una temperatura de 4°C. Se mezcló y se dejó incubar en hielo durante 30 minutos. Una vez finalizada la incubación con ayuda del ultrasonido WiseClean® se procedió a romper las células durante 30 minutos a -30° C, este proceso se repitió tres veces.

Se agregó 100 µl/ml de DNAasa y MgCl₂ 10 mM en concentraciones finales, se mezcló la solución, se incubó en hielo durante 20 minutos y se centrifugó a 30000 x g por 1 hora. Finalmente se eliminó el sobrenadante y se conservó el sedimento.

3.3.3. Análisis de las proteínas mediante la técnica SDS-PAGE

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) es una técnica que en función de su peso molecular permite que se realice la separación de las proteínas. Para realizar este análisis primero, se realiza un gel de acrilamida/bisacrilamida el cual se encarga de formar una red compleja, permitiendo que las proteínas migren una vez que se les aplica la carga eléctrica, después se realiza la incorporación del SDS, el cual es un detergente anfipático que desnaturaliza a las proteínas para que vuelvan a ser lineales, a más de concederles una carga negativa que permite separarlas. El procedimiento empleado se basó en el trabajo investigativo de Navarrete, (2017).

La electroforesis en gel se preparó con una gradiente de desnaturalización 10% - 40% para obtener una separación efectiva de las proteínas. Las soluciones de stock que fueron empleadas se muestran en la Tabla 3.

La técnica electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) se realizó en la cámara de Electroforesis horizontal, la cual fue cargada con un buffer TAE 1X (40 mM Tris-acetato y 1mM EDTA), con un de pH 8.3 a 25°C. El casete que inmoviliza el gel fue bañado en esta solución.

3.3.3.1 Preparación del gel de poliacrilamida en gradiente

Se utilizó 20 ml de cada solución stock en tubos cónicos Falcon™, los cuales fueron envueltos con papel aluminio para evitar una fotorreacción de los reactivos. (Tabla 3).

Tabla 3. Preparación de las soluciones stock de SDS - PAGE

	10%	40%
<i>Acrilamida/ Bisacrilamida</i>	20 ml	9 ml
<i>SDS (1X)</i>	-	7,5 ml
<i>Agua destilada</i>	-	13,5 ml
<i>TEMED</i>	20 µL	10 µL
<i>APS</i>	200 µL	300 µL

Fuente: Autora.

Después de haber colocado las soluciones stock se dejó polimerizar en gel durante 45 minutos. Mediante una jeringa Hamilton®, se insertó 5 μ l del indicador de peso molecular (*BenchMark™ Protein Ladder*) en el primer pocillo del gel, posteriormente se insertó 13 μ L de una mezcla previamente preparada, la cual estaba compuesta por 3 μ L de Blue/Orange Loading Dye, 6X Promega™ (buffer de carga) y 10 μ L de las muestras de proteínas en los pocillos restantes.

Una vez colocadas todas las muestras en los pocillos se tapó la cámara de electroforesis y se colocó los electrodos en la fuente de energía. La corrida de la electroforesis se realizó a un voltaje de 140 voltios y 500 amperios durante 120 minutos.

3.3.3.2 Proceso de tinción del gel

Para este proceso se utilizó 15 ml de azul de Coomassie G-250, mediante una jeringa quirúrgica estéril se esparció la mezcla y se dejó en reposo en la oscuridad durante 60 minutos para que el gel y las bandas puedan absorber el color. Después de este periodo de tiempo, se lavó el gel con agua destilada y fue colocado en el transluminador UV LabNet™ Inc para poder observar las bandas que se formaron en el gel.

3.3.4. Elaboración del Plásmido

Para la elaboración del plásmido se buscó las secuencias de los genes *lux* (permite la emisión de un luminiscencia), y los genes *ars* (transforma el ion arseniato (V) a arsenito As (III), siendo este último expulsado por el sistema de transporte bacteriano) (Marrero, Díaz, & Coto, 2010) en NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Posteriormente se envió a MACROGEN Inc Korea las secuencias para la síntesis de las mismas, dando como producto al plásmido pTOP Blunt V2.

3.3.5. Método Físico Electroporación

El método físico de electroporación empleado se basó en el protocolo estandarizado en la investigación de Moreno, (2018). Para comenzar con el método de electroporación, primero se esterilizó todos los materiales, equipos e insumos a ser utilizados, incluyendo la Cámara de Flujo Laminar N_BIOTEK®, una vez esterilizado todo se preparó Agar LB Luria Bertani - BD® (proporciona nutrientes necesarios para que crezcan y se mantengan vivas las bacteria *Escherichia Coli*) para 5 cajas Petri previamente esterilizadas en el Autoclave ican CLAVE , se dejó en reposo hasta que el agar alcance una temperatura de 37°C (óptima) para poder colocar la ampicilina (Ampibex 250 mg Ampicilina life) en el agar, luego en cada una de las cajas se colocó 20 ml de agar.

Las especificaciones del Agar LB indica que por cada 1000ml de agua destilada se debe usar 40gr de agar, por lo tanto se necesitó 4gr de agar para 100ml total de las 5 cajas Petri. Mientras que la ampicilina (Ampibex) que se usó en este proceso tiene una concentración de 250,00 mol, para saber la cantidad exacta de ampicilina que se necesita para el Agar preparado fue necesario realizar el siguiente cálculo:

$$\frac{\text{Concentración1}}{\text{Volumen1}} = \frac{\text{Concentración2}}{\text{Volumen2}}$$

$$V1 = \frac{C2 * V2}{C1}$$

$$V1 = \frac{100\text{gr} * 100\text{ml}}{250000\text{gr}}$$

$$V1 = 0.04\text{ml}$$

$$0.04\text{ml} * 1000\mu\text{L}$$

$$V1 = 40 \mu\text{L}$$

Una vez solidificado el agar en las cajas Petri se colocó 40 μL de X-Gal (Thermo Scientific™) en cada placa, se agitó ligeramente para esparcir en toda la placa, y se dejó en la incubadora (Thermo Scientific™) por 60 minutos a una temperatura de 37° C. El X-Gal utilizado es de invitrogen, el mismo que cuenta con una cantidad de 100mg, de los cuales se realizó una solución madre, se colocó 40 mg en 1 ml de agua destilada Ultra Pure™ DEPC, como se preparó 5 cajas Petri se necesitó 200 μL de X-Gal (Thermo Scientific™) para los 100ml de agar LB.

Es importante tener en cuenta que las células competentes a ser utilizadas, se encuentran a -20° C en el Congelador (Thermoscientific™) y deben aumentarse lentamente la temperatura hasta que las células competentes se encuentren en estado líquido, para evitar que las células se estresen y por ende mueran.

Se realizó la transformación por medio del equipo Neon Transfection System (Thermo Scientific™), (Figura 3), el cual ayuda a realizar una transformación de la bacteria de manera eficiente. Se usó 20 μL de células competentes, que fueron colocadas en un tubo de eppendorf de 10 a 100 μL , conjuntamente con 5 μL del plásmido. Esta mezcla de células competentes junto con el plásmido se colocó por 2 segundos aproximadamente en la Micro centrifuga a 6000 rpm (2000 x g), para que se mezcle uniformemente.

Inmediatamente se dejó por 2 minutos en hielo, en esta investigación se utilizó la bacteria *Escherichia Coli*, para lo cual fue necesario programar el voltaje, los milisegundos y las pulsaciones a: Voltios: 2500v; 4 Milisegundos; y 2 Pulsaciones.

Una vez programado el equipo, se conectó el Pipeta al Neon Device™ para permitir la transferencia de los impulsos eléctricos. Se colocó 3 ml de Electrolytic Buffer (tampón electrolítico) en la cubeta, previo a esto se dejó el tubo y Electrolytic Buffer a una temperatura de 4°C. (Invitrogen, Neon Transfection System, 2014).

Por medio de la pipeta y la cubeta de 10 μL se tomó la mezcla, es importante tener en cuenta que al momento que se introduce la mezcla a la cubeta (Neon Tips™) no exista ninguna burbuja o espacios de aire presentes, debido a que esto impedirá que la mezcla se electropore. Posteriormente se colocó la pipeta en el Neon Pipette Station™ para comenzar con el proceso de electroporación.

Se sacó la pipeta con la mezcla transformada, se colocó en un tubo falcom®, además se adicionó 1ml de S.O.C. Medium (Thermo Scientific™), se etiquetó y se puso en Incubadora Shaking NB-205L N_BIOTEK® a 37° C, 225 rpm, por una hora.

Finalmente, se dispensó de 100 – 300 μL de la mezcla en las cajas Petri que fueron esterilizadas en el Autoclave ican CLAVE® previo al proceso de electroporación, las cajas fueron selladas con papel parafilm® para evitar una posible contaminación de patógenos, esto se dejó 48 horas en la Incubadora (Thermo Scientific™) a 37° C, temperatura óptima para el desarrollo de las bacterias.



Figura 3. Electroporador - Neon Transfection System de Invitrogen

Fuente: Autora

3.3.6. Transformación celular y preparación del biosensor a diferentes concentraciones

Después de haber transcurrido 48 horas de incubación de las placas, se seleccionó tres colonias con mejores características morfológicas (forma, tamaño, borde, consistencia y estructura), para colocarlas en diferentes concentraciones de As. Se trabajó solo con concentraciones de As de: 0ppm; 0,01ppm (límite máximo permisible para el consumo humano); 0,02ppm; 0,04ppm y 0,08ppm). (INEN, 2014)

Se tomó un frasco boeco en el cual se preparó caldo LB (Luria Bertani) de LAB a Neogen Company LB Broth, (Luria Bertani) ®. Las especificaciones del caldo LB nos dice que por cada 1000 ml se debe usar 25gr de caldo, por lo que se necesitó 0,75 gr para 30ml, esto se mezcla con agua destilada UltraPure™ DEPC hasta que este homogéneo. Al tener preparado el caldo, se colocó 10 ml de caldo en 3 tubos de ensayo, las mismas que fueron tapadas con algodón y esterilizadas en el Autoclave ican CLAVE® a 121°C y 1.5 atm por 45 minutos.

Luego de esterilizar los tubos, se colocó las tres colonias previamente seleccionadas, una en cada tubo, además, se adicionó 0,01ppm de As. Todo el procedimiento se lo realizó cerca del mechero en un ambiente estéril para evitar posible contaminación de los cultivos, los tres tubos fueron incubados a 37° C por 24 horas. Transcurrido este tiempo, se observó que el caldo LB se encontraba turbio, indicando que si hubo crecimiento celular, y por lo tanto, se colocó a los tubos en un transiluminador UV LabNet™ Inc para poder visualizar la luminiscencia.

Una vez que se observó la presencia de color azul fosforescente en los tubos, se preparó caldo LB y se puso 10 ml de caldo en varios tubo para las diferente concentraciones de As, se tapó con algodón y fueron esterilizadas, se esperó unos minutos hasta que los tubos se enfríen y se procedió a colocar en cada tubo 100 µL de bacterias transformadas, se adicionó las concentraciones de arsénico establecidas, además, se colocó en tres tubos diferentes solo bacterias sin transformar, para después hacer una comparación con los resultados, de igual manera todo el proceso fue desarrollado cerca del mechero en un ambiente estéril y se dejó incubando a 37° C por 24 horas.

Transcurrido las 24 horas de incubación se colocó a los tubos en un transiluminador UV LabNet™ Inc para poder visualizar la luminiscencia.

3.3.7. Análisis de Arsénico por metodología de Espectrofotómetro de microplacas EPOCH

Para determinar la concentración y absorbancia del arsénico en el medio líquido se utilizó microplacas de 96 pozos (UltraCruz® Tissue Culture Plates, 96). Se agregó a cada pozo de la micro placa 100µL de: agua destilada (Blanco); caldo LB, Bacterias sin transformar y Bacterias transformadas sin concentraciones de Arsénico (Control); 4 muestras por triplicado con concentraciones de arsénico: 0ppm; 0,01ppm (límite máximo permisible para el consumo humano); 0,02ppm; 0,04ppm y 0,08ppm). (INEN, 2014)

La absorbancia se midió en un Espectrofotómetro de Microplaca Epoch™ de Biotek instruments. Este proceso se realizó por triplicado para cada condición de estudio seleccionada, para cada muestra. Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos por espectroscopia se utilizó el software Gen5™ Software para Análisis de Datos. (BioTek, 2017)

3.3.8. Análisis de Arsénico por metodología de EAA (Espectroscopia de Absorción Atómica)

Para el análisis se trabajó con el espectrofotómetro de Absorción Atómica SensAA© de GBC Scientific Equipment. Debido a la naturaleza del metaloide se utilizó la técnica de absorción atómica (GFAAS) por medio del Sistema 5000 Horno de Grafito GBS.

3.3.8.1. Estándares de calibración para horno de grafito (GFAAS).

El método empleado para la lectura de concentración y absorbancia del arsénico además del tipo de gases utilizados se detalla a continuación:

Tabla 4. Método Utilizado para la lectura de Arsénico

MÉTODO	TEMPERATURA FINAL (°C)	TIEMPO EN RAMPA (minutos)	TIEMPO DE ESPERA (minutos)	TIPO DE GAS
1. Inyección de muestra	-	-	-	-
2.	95	5.0	15.0	Inerte
3.	120	15.0	15.0	Inerte
4.	300	10.0	8.0	Inerte
5.	300	1.0	3.0	No
6. Lectura	2400	1.2	3.0	No
7.	2300	1.0	1.0	Inerte

Tipo de gas: *Inerte: Argón / *Auxiliar: Nitrógeno.

Elaborado por: Autora.

Para la calibración de la curva y el blanco se utilizó el estándar de 100 ppb, a partir del cual el equipo desarrolló 4 estándares; el primero con una concentración de 10 ppb y una absorbancia de 0,192, el segundo con una concentración de 20 ppb y una absorbancia de 0,257, el tercero con una concentración de 40 ppb y una absorbancia de 0,341 y el cuarto con una concentración de 80 ppb y una absorbancia de 0,530. (Figura 4)

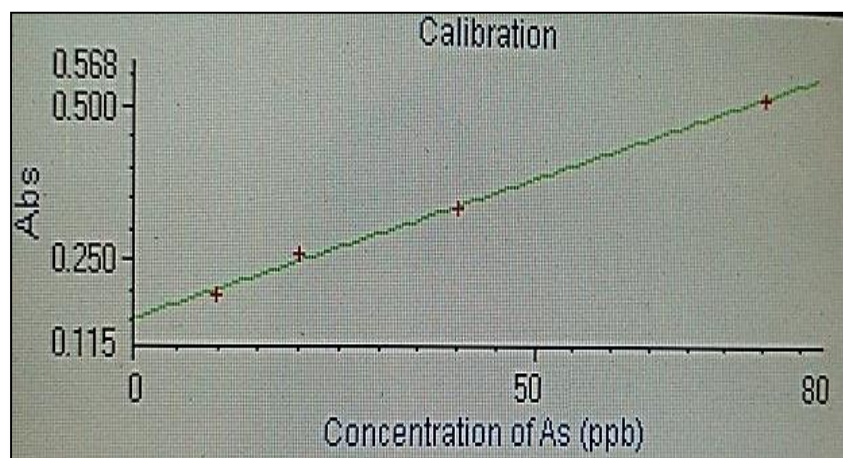
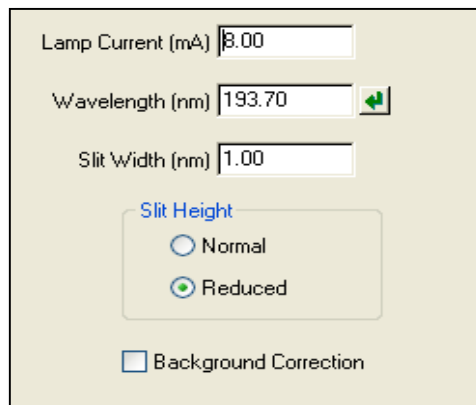


Figura 4. Curva de calibración del blanco para la lectura de Arsénico
Elaborado por: Autora.

La forma de calibración fue “Linear LS (Least Squares) Through Zero” con un error máximo de 20.9569. Este valor se obtiene a partir del valor entre R y R^2 donde R es el valor de la concentración y R^2 es el valor de la absorbancia del blanco en el instante de la calibración. Siendo R: 0.9987 y R^2 : 0.9975.



The image shows a software control panel for an arsenic lamp. It features three input fields: 'Lamp Current (mA)' with a value of 8.00, 'Wavelength (nm)' with a value of 193.70 and a green arrow icon, and 'Slit Width (nm)' with a value of 1.00. Below these is a 'Slit Height' section with two radio buttons: 'Normal' and 'Reduced', where 'Reduced' is selected. At the bottom, there is a checkbox labeled 'Background Correction' which is currently unchecked.

Figura 5. Ajustes de la lámpara de arsénico

Elaborado por: Autora.

3.3.9. Método de Control – Tinción Gram

Se realizó este método de control para certificar que las células transformadas no se encuentran contaminadas. En este caso las células transformadas son de la bacteria Gram negativa *Escherichia coli*, para lo cual se realizó una tinción Gram, en donde las bacterias Gram negativas se tiñen de un color rosáceo.

Primero se colocó una gota de agua destilada en el portaobjetos, se tomó una colonia de las cajas Petri con la ayuda de un asa bacteriológica se realizó un frotis y para fijar la muestra se pasó varias veces de manera horizontal por la llama del mechero evitando que la muestra se quemara. Una vez que está fijada la colonia, se tiñó cubriéndola con Cristal Violeta durante 45 segundos aproximadamente, después se eliminó el exceso del colorante lavándolo con agua destilada. Posteriormente se puso lugol por otros 45 segundos y se eliminó el exceso con agua destilada. Seguidamente se agregó alcohol por 15 segundos y se lavó de manera inmediata, luego se colocó una gota de safranina y dejamos por unos segundos y de igual manera se eliminó el exceso con agua destilada. Finalmente se colocó un cubreobjetos y se procedió a observar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Proteína Resistente al Arsénico Identificada

Al realizar la electroforesis en gel de poliacrilamida de SDS PAGE, se pudo evidenciar la sobre expresión de las proteínas resistentes al arsénico en las bandas más representativas cuyos tamaños son de 46 kDa y 16 kDa (Figura 6). Este resultado concuerda con la investigación realizada por los autores Chen., et al (1986) quienes mencionan que el gen estructural más pequeño del operon *ars* es el gen *arsC*, el cual codifica la proteína hidrofílica cuya masa molecular es de 15.81 kDa, mientras que el gen *arsB* codifica una proteína de membrana potencial de 45.577 kDa.

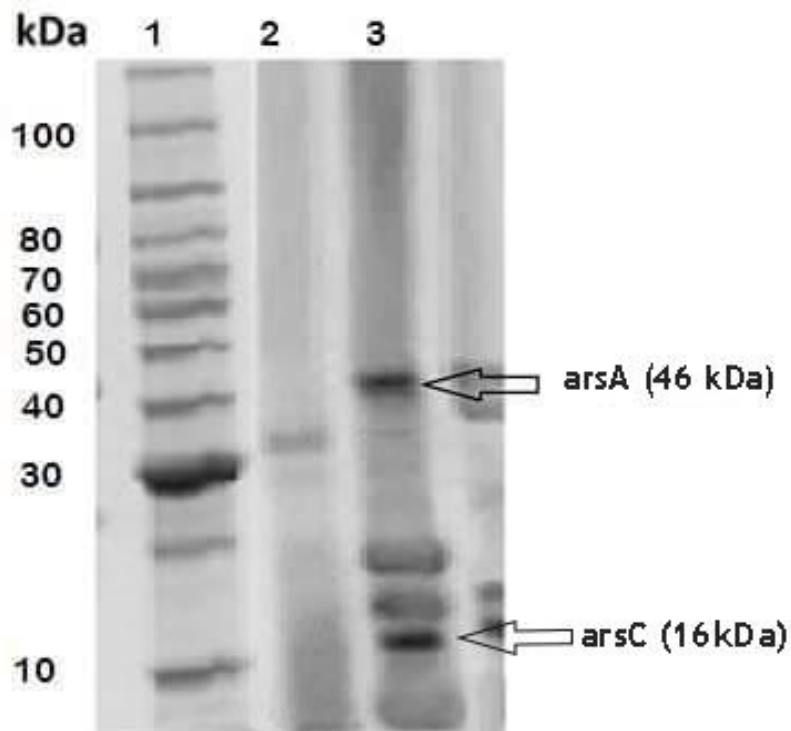


Figura 6. Electroforesis en gel SDS PAGE con gradiente de desnaturalización (10%-40%). Carril 1: Marcador de peso de proteínas (kilodaltons - kDa); carril 2: expresión de proteínas en un medio sin arsénico; carril 3 gen *arsB* y *arsC* en un medio con arsénico a 0,01 ppm; la flecha indica la posición de las proteínas y la masa molecular.

Fuente: Autora

Los determinantes genéticos que codifican a las proteínas incluidas en los mecanismos de resistencia a los metales, se encuentran localizados en los cromosomas, en elementos móviles como los transposones o plásmidos o en ambos. La resistencia a los metales es conferido por los determinantes plasmídicos los cuales poseen una gran especificidad, comparable con los productos codificados por otros genes que intervienen en el metabolismo celular, y constituyen sistemas inducibles en alguno de los casos. (Marrero, et al, 2010)

En las bacterias existen diferentes mecanismos generales mediante el cual se puede producir una resistencia al metal por medio del plásmido, esto incluye una alteración enzimática del compuesto tóxico, el desarrollo de vías metabólicas alternativas y la eliminación del compuesto tóxico de la célula. La última implica la síntesis de nuevos sistemas de transporte compuestos por proteínas codificadas por los plásmidos, permitiendo que la resistencia bacteriana al arsénico sea dada gracias a la existencia de los operones *ars*, el cual codifica un sistema de transporte para el arseniato y arsenito. (Nies & Silver, 1995)

Varios investigaciones recientes han definido genes de resistencia a diferentes metales, tales como: cromo, plata, cobre, cadmio, zinc, mercurio, níquel y arsénico localizados en plasmidios, estos hallazgos son importantes ya que los plasmidios otorgan una resistencia a las diferentes concentraciones de metales, permitiendo que se pueda transferir fácilmente de una célula a otra a través de sistemas de transferencia horizontal del material genético, contribuyendo en los procesos para la adaptación a corto plazo de las bacterias en ecosistemas contaminados. Smets., et al, (2003) confirman esta hipótesis, ya que demostraron en su investigación que la resistencia a los metales codificado por plásmidos se genera en comunidades bacterianas que habitan en ambientes contaminados, esta resistencia les confiere un valor adaptativo muy importante.

Por lo que se puede concluir que la presencia de los operones *arsB* y *arsC* le dan una capacidad de resistencia al arsénico, siendo el *ArsB* el que codifica una proteína de la membrana de la célula, donde el arsenito bombea directamente fuera de la misma (Daunert et al., 2000), mientras que el *arsC* se encuentra implicado en el mecanismo de resistencia bacteriana al arsenito, actuando como una reductasa, la cual transforma el arseniato a arsenito, siendo el arsénico (III) expulsado por el sistema de transporte bacteriano (Marrero, Díaz, & Coto, 2010)

4.2. Fabricación del Plásmido para detección de arsénico

El plásmido fue ensamblado por la empresa ©MACROGEN Inc, siguiendo las instrucciones enviadas a la misma, siendo estas las siguientes: genes (*lux* y *ars*), las secuencias de los genes fueron previamente identificadas y seleccionadas (No se especifica detalles de las secuencias por motivo de patente), como resultado se tiene la siguiente síntesis genética:

Tabla 5. Características de la Secuencia del Gen

Tamaño del Gen	1,891 bp
GC %	52.99%

Fuente: (MACROGEN, 2017)

El ensamblaje de las secuencias permitió establecer un tamaño del gen de 1,891 pb, siendo su porcentaje total G+C de 52,99 %, respectivamente.

Vector: pTOP_Blunt_V2

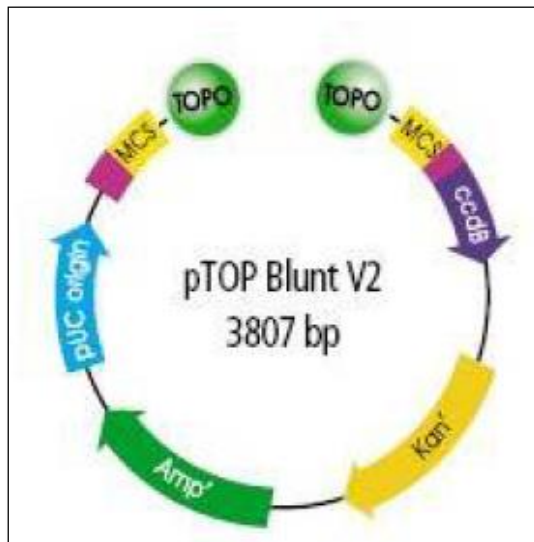


Figura 7. Mapa esquemático del plásmido pTOP Blunt V2 (3807) Una molécula de topoisomerasa (TOPO) se acopla covalentemente a los 3 extremos dúplex en las posiciones nt 294 y 295 de pTOP Blunt V2. Por lo tanto, pTOP Blunt V2 puede formar un enlace covalente con productos de PCR de los extremos finales mediante Pfu DNA polimerasa.

Fuente: (MACROGEN, 2017)

Características del plásmido:

- Promotor / operador Lac: 95-216
- Sitio de unión del cebador inverso M13: 205-221
- LacZ ORF: 217-534
- MCS, sitios de clonación múltiple: 234-357
- M13 (-20) Sitio de unión de cebador directo: 391-406
- ccdB ORF: 544-846
- Gen Kanr: 1057-1989
- Gene Amp: 2007-2867
- origen de pUC: 3012-3685

Fuente: (MACROGEN, 2017)

4.3. Electroporación – Expresión

A partir de las muestras electroporadas e incubadas a 37° C durante 48 horas, las cepas presentaron un color blanco, indicando que las células fueron transformadas. Rivero, et al (2013) menciona que solo se debe incubar durante 24 horas para observar la presencia de las colonias, sin embargo en esta investigación se determinó que el tiempo óptimo de incubación es de 48 horas, debido a que las células son sometidas a altos voltajes lo cual causa alto estrés. Las condiciones genéticas, nutricionales, ambientales y de tratamientos a los que son sometidas las células influyen en el tiempo de desarrollo de las mismas, variando en el tiempo de formación de las colonias. (Salvucci, 2010).

Una vez identificadas, 3 colonias (figura 8) fueron sometidas a pruebas de tolerancia al arsénico mediante la siembra en medio de cultivo a diferentes concentraciones como única fuente de energía.

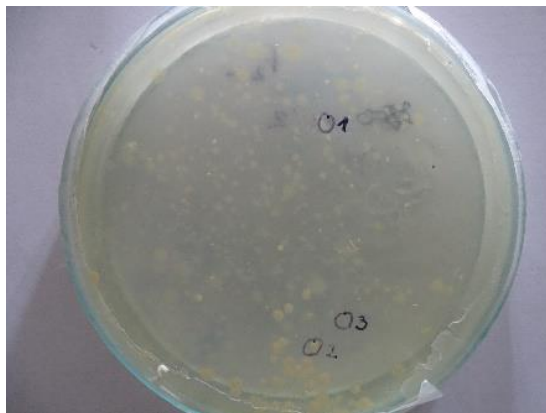


Figura 8. Cepas Transformadas por método de Electroporación

Fuente: Autora

Los biosensores bacterianos fueron expuestos a diferentes concentraciones del metaloide: 0ppm; 0,01ppm (límite máximo permisible para el consumo humano según la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1108); 0,02ppm; 0,04ppm y 0,08ppm; para poder evaluar la capacidad de detectar arsénico. Los ensayos se determinaron por la presencia de luminiscencia por medio del transluminador UV LabNet™ Inc presentes a las 24 horas (Figura 9). Dwivedi (2016) menciona en su investigación que la actividad luminiscente del gen de la luciferasa proporciona una medición simple y sensible de la expresión y de la regulación génica.

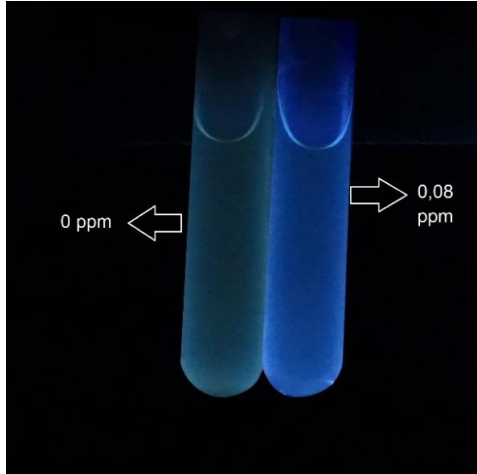


Figura 9. Expresión de luminiscencia a una concentración de 0,08 ppm
Fuente: Autora

Al evaluar la cepa *E. coli* transformada, frente a distintas concentraciones de arsénico (Figura 10). Los resultados demostraron que la intensidad del luminiscencia presente a las 24 horas de incubación a 37° C, fue diferente para cada concentración, donde se observó que la intensidad de luminiscencia aumentó a medida que aumentaba la concentración de arsénico a la que fue expuesta.

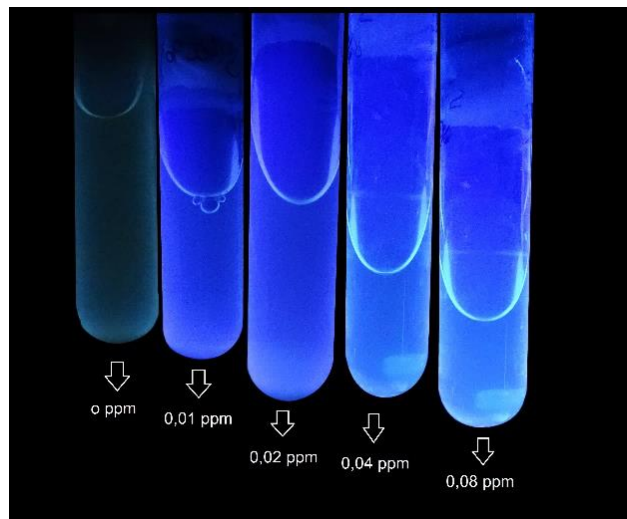


Figura 10. Determinación de luminiscencia a diferentes concentraciones de As

Fuente: Autora

Lobos (2007) en su investigación muestra la evaluación de la cepa *E. coli Pmv-arsR*, frente a distintas concentraciones de As (III), donde observó que a los 15 y 30, la intensidad de color aumentaba conforme se incrementaba la concentración de As (III).

Trang, et al., (2005) informan en un estudio similar, que la capacidad del bioinformador *E. coli DH5α (pJAMA-arsR)* del gen de la luciferasa bacteriana (*luxAB*) *E. coli DH5α (pJAMA-arsR)* puede detectar As en agua, esta señal luminiscente se expresó a las 2 horas. Al agregar concentraciones de arsénico en el agua, los biosensores demostraron un aumento correspondiente en la bioluminiscencia.

Por lo tanto con los resultados obtenidos podemos afirmar que el gen *lux* se expresó bajo el control del operón *ars* del plásmido pTOP Blunt V2, demostrando que *E. coli* modificada resulto ser sensible, mostrando el límite de detección de 0,08 ppm de arsénico.

4.4. Cuantificación de As en Espectrofotómetro de microplacas EPOCH y Espectroscopia de Absorción Atómica (EAA)

En la cuantificación de arsénico se utilizó la cepa de *E. coli* modificada, esta fue expuesta a diferentes concentraciones del metaloide, se realizó tres repeticiones obteniéndose un promedio de los valores de concentración. Se midió la absorbancia y se obtuvo 2,8% de error entre los dos métodos utilizados. (Tabla 6)

Tabla 6. Concentración de arsénico por metodología de Espectrofotómetro de microplacas EPOCH y Espectroscopia de Absorción Atómica en Horno de grafito (GFAAS)

Concentración Teórico (ppm)	absorbancia EAA	Concentración Real - EAA (ppm)	Absorbancia EPOCH	Concentración Real - EPOCH (ppm)	% Error
0,08	0,530	0,07978	0,546	0,07859	1,494
0,04	0,341	0,04100	0,352	0,03978	2,976
0,02	0,257	0,02090	0,249	0,01925	7,895
0,01	0,192	0,00970	0,202	0,00983	- 1,340
PROMEDIO					2,8

Fuente: Autora

Al evaluar las muestras con diferentes concentraciones de arsénico (0; 0,01; 0,02; 0,04; 0,08 ppm), los resultados indicaron que aumentó la absorbancia conforme se incrementa la concentración de arsénico. En la figura 11 se presenta la curva de absorbancia obtenida con el Espectrofotómetro de microplacas EPOCH a una densidad óptica de 550 nm, se realizó una curva de calibración en base al metaloide, dividiendo en diferentes concentraciones en ppm, la curva presento una R^2 de 0,9999, siendo R^2 el coeficiente de determinación, el mismo que permite conocer la varianza total de la variable explicada por la regresión. (Martínez, et al., 2005).

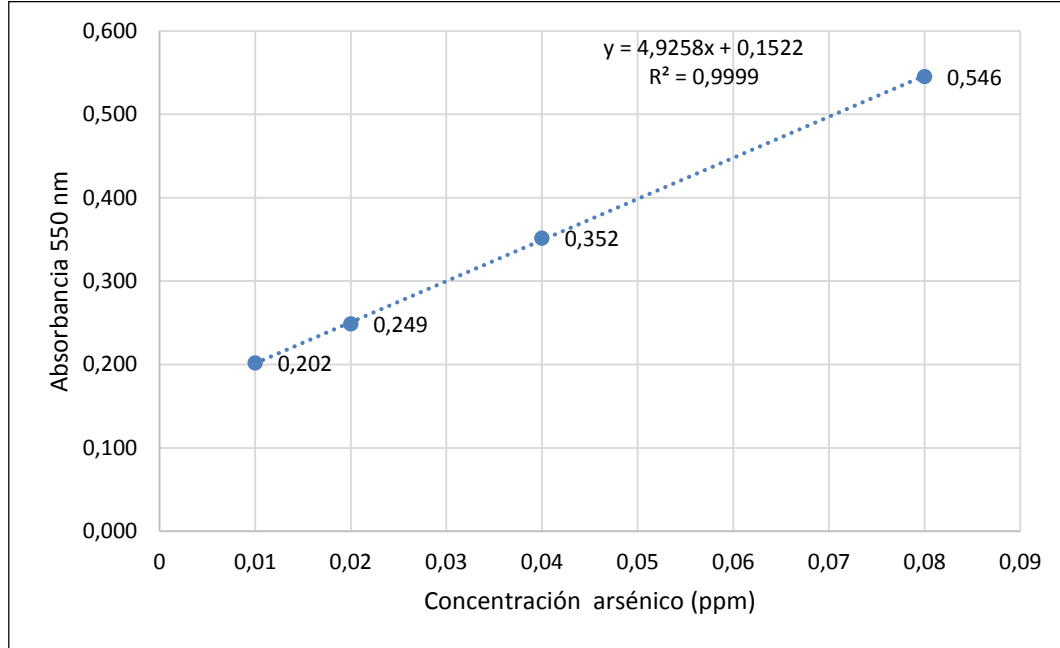


Figura 11. Curva de absorbancia 550 nm por metodología de Espectrofotómetro de microplacas EPOCH de arsénico a diferentes concentraciones

Fuente: Autora

En la figura 11 se presenta la curva de absorbancia para la cuantificación de arsénico empleando en espectrofotometría de absorción atómica a una densidad óptica de 193 nm, Suarez, et al., (2004) mencionan que el haz radiante específico para la lectura del arsénico en Espectroscopia de Absorción Atómica corresponde con las longitudes de onda a 193,7 nm y 197,2 nm.

Se obtuvo una recta con una R^2 de 0,9975. Lo cual se asemeja con la investigación de Valenzuela (2010), quien menciona en su investigación que obtuvo una recta con una R^2 de 0,9999 en la cuantificación de arsénico en agua, por lo que se puede decir que se considera confiable.

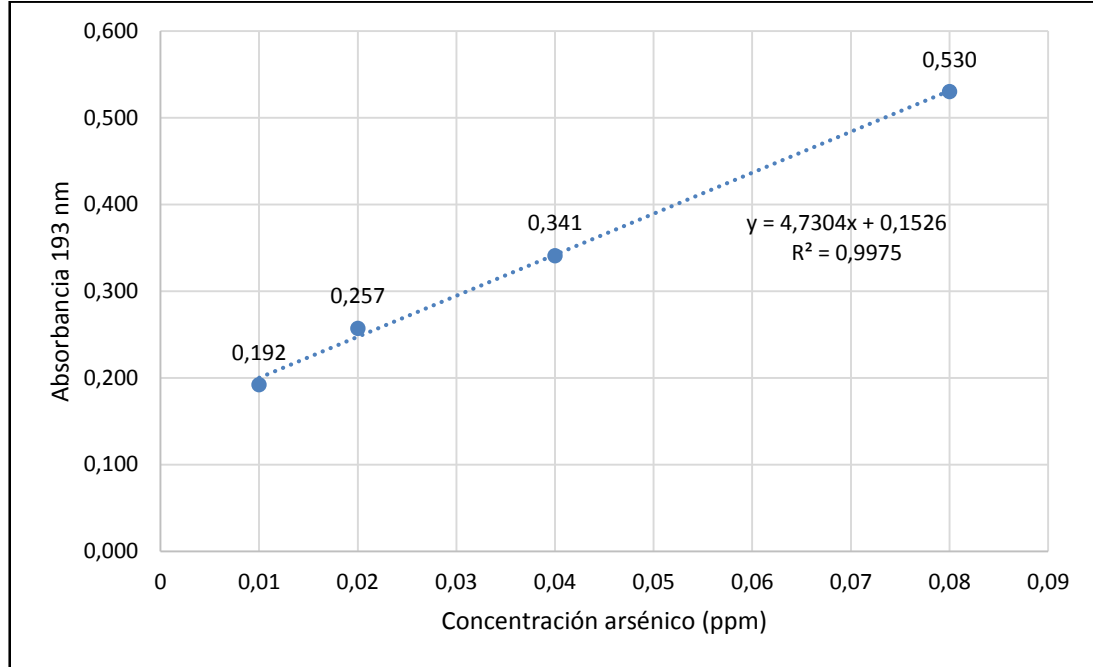


Figura 12. Curva de absorbancia por Espectroscopia de Absorción Atómica en Horno de grafito (GFAAS) de arsénico a diferentes concentraciones

Fuente: Autora

Al evaluar los parámetros estadísticos del biosensor bacteriano con el método de Espectroscopia de Absorción Atómica (EAA) se puede constatar que existe una relación directamente proporcional entre la absorbancia y la concentración de arsénico en el rango de 0 a 0,08 ppm de As. De igual forma se puede observar que la recta obtenida para él primero (Figura 11), presentó un intervalo de trabajo con una R^2 de 0,9999, mientras que la del método de EAA (Figura 12) presentó un intervalo de linealidad con una R^2 de 0,9975. Cumpliendo ambas con el requisito de ser lineales en un intervalo de concentración (Miller & Miller, 1993), por lo que el biosensor nos permite trabajar con muestras con baja o alta concentración de arsénico sin la necesidad de concentrarlas o diluirlas (Miller & Miller, 2002).

4.5. Análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis

Se realizó un análisis no paramétrico por medio de la aplicación de la prueba de Kruskal-Wallis y de las comparaciones múltiples no paramétricas, debido a que se evidenció que las homogeneidades de varianzas y normalidad no son significativas.

4.5.1. Espectrofotómetro de microplacas EPOCH

Las pruebas analíticas de homogeneidad de varianzas (Tabla 7) y de normalidad no detectaron evidencias significativas del desvío del supuesto para la variable de la concentración de arsénico. No obstante, al realizar los gráficos, se demostró un patrón que sugiere la existencia de un desvío de homogeneidad de varianza de los errores. Este contraste de resultados puede darse por el tamaño de las muestras utilizadas, las mismas que afectaron a los resultados de las pruebas analíticas.

Tabla 7. Prueba analítica de Homogeneidad de Varianza de concentración de arsénico

Homogeneidad de Varianza	F	P	Resumen
Prueba de Levene	3.99	0.0521	ns
Prueba de O'Brien	1.77	0.2297	ns
Prueba de Brown y Forsythe	0.98	0.4505	ns

ns: Representa diferencia estadística no significativa entre los datos.

Fuente: Autora

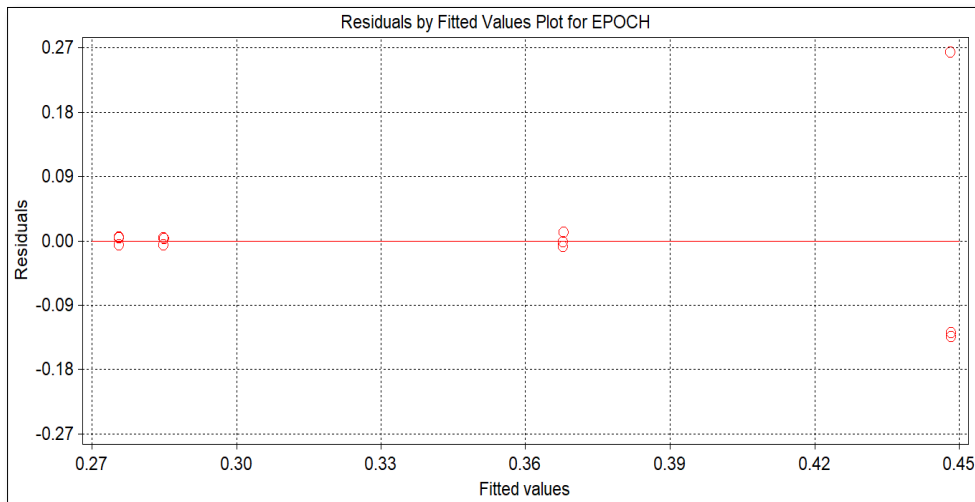


Figura 13. Residuos de Homogeneidad de concentración de arsénico (EPOCH)

Para la verificación de la normalidad de los datos se realizó un análisis estadístico con la prueba de Shapiro-Wilk por medio de un diagrama, verificando la distribución normal de los datos. Siendo esta prueba la más seleccionada para analizar un máximo de cincuenta muestras (Montalvan, 2014). Donde se observa (Figura 13) que los datos tienden a cero, lo que significa que no existe mucha variabilidad. El valor de W es 0.6979, su distribución permite calcular el valor crítico de la prueba, lo que nos indica una probabilidad crítica muy pequeña de 0,0008, permitiendo concluir que no tiene significancia.(TecnoStats, 2016).

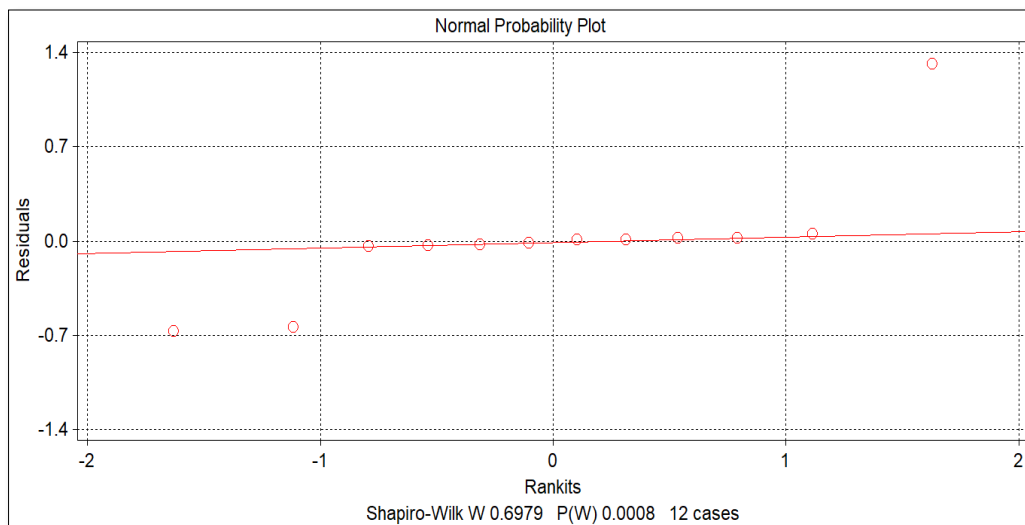


Figura 14. Normalidad de cálculo de concentración de arsénico de Shapiro-Wilk. (EPOCH)

En la prueba comparativa de Kruskal –Wallis entre los tratamientos, se obtuvo como resultado que el tratamiento 1 (0,08ppm) tiene una diferencias altamente significativa entre los tratamientos tratamiento 4 (0,01 ppm), en comparación con el tratamiento 2 (0,04 pm) y el tratamiento 3 (0,02 ppm) no tienen diferencia significativa entre los dos tratamientos.

Tabla 8. Prueba de Kruskal-Wallis comparativa por pares de EPOCH por Tratamiento

Tratamientos	Concentración en ppm	Promedio	Grupo Homogéneos
T1 /T800	0,08	11,000	a
T2 / T400	0,04	8,0000	ab
T3 / T200	0,02	5,0000	ab
T4 / T100	0,01	2,0000	b

En la figura 15 se puede corroborar con los resultados previamente mencionados, que existe mayor absorbancia a medida que se incrementa la concentración de arsénico en la muestra, siendo los tratamientos los siguientes: T100 (0,01 ppm); T200 (0,02 ppm); T400 (0,04 ppm) y T800 (0,08 ppm).

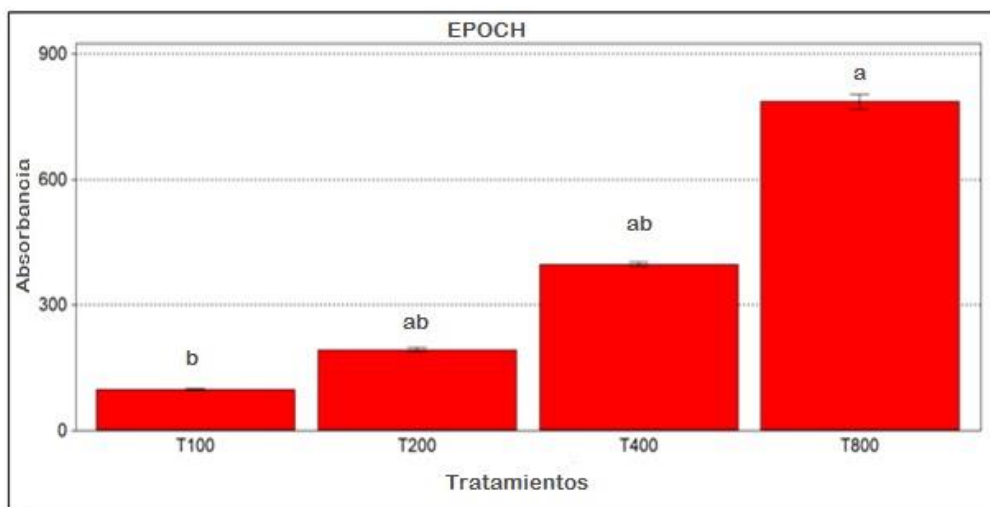


Figura 15. Gráfico de barras de error con 95%

Fuente: Autora

4.5.2. Espectroscopia de Absorción Atómica

Las pruebas analíticas de homogeneidad de varianzas (Tabla 9) no detectaron evidencias significativas del desvío del supuesto para la variable de la concentración del metaloide. No obstante, al realizar los gráficos, se evidenció un desvío de la homogeneidad de varianza del error. Por esta razón se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal- Wallis.

Tabla 9. Prueba analítica de Homogeneidad de Varianza de absorbancia del EAA

Homogeneidad de Varianza	F	P	Resumen
Prueba de Levene	3.63	0.0644	ns
Prueba de O'Brien	1.61	0.2616	ns
Prueba de Brown y Forsythe	1.00	0.4398	ns

ns: Representa diferencia estadística no significativa entre los datos.

Fuente: Autora

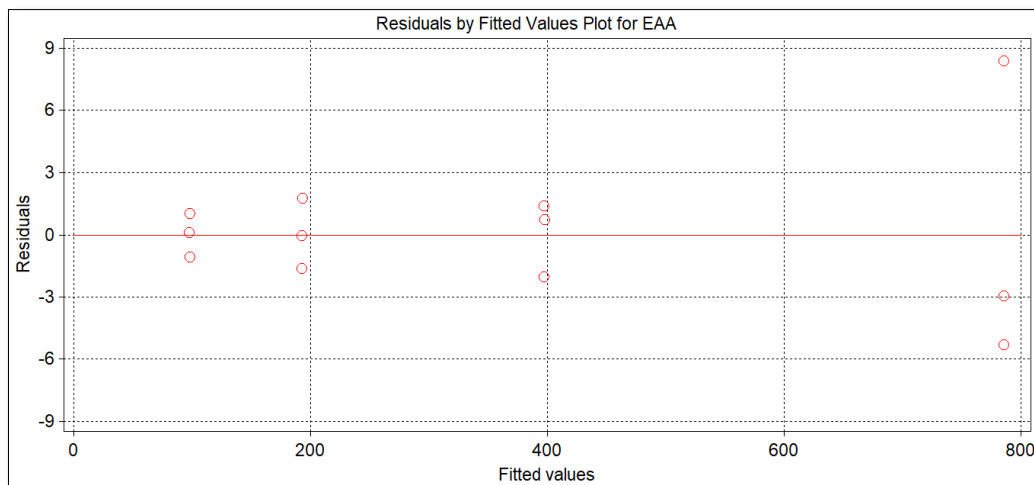


Figura 16. Residuos de Homogeneidad de concentración de arsénico (EAA)

En la prueba de Normalidad se identificó que la distribución de los datos analizados es normal, para lo cual se realizó la prueba de Shapiro- Wilk, obteniendo un “p-value” de 0,8992. Sin embargo fue necesario la utilización de una prueba no paramétrica por no obtener una homogeneidad de varianza en los datos.

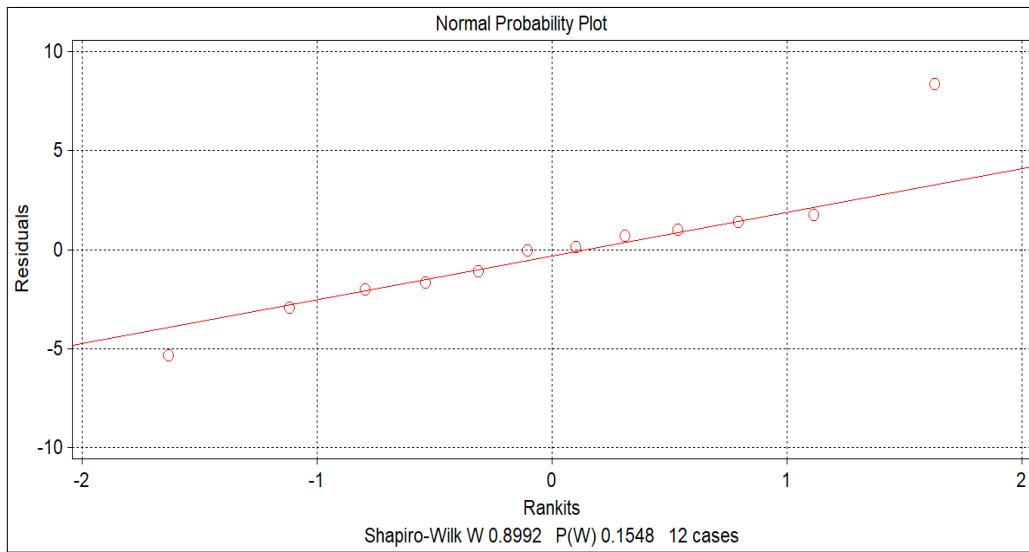


Figura 17. Normalidad de cálculo de concentración de arsénico de Shapiro-Wilk. (EAA)

En la prueba comparativa de Kruskal –Wallis entre los tratamientos, se obtuvo como resultado que el Tratamiento 1 (0,08ppm) tiene una diferencias altamente significativa entre los tratamientos, Tratamiento 4 (0,01 ppm), en comparación con el Tratamiento 2 (0,04 pm) y el tratamiento 3 (0,02 ppm) no tienen diferencia significativa entre los dos tratamientos.

Tabla 10. Prueba de Kruskal-Wallis comparables por pares de EAA por Tratamiento

Tratamientos	Concentración en ppm	Promedio	Grupo Homogéneos
T1 / T800	0,08	11,000	a
T2 / T400	0,04	8,0000	ab
T3 / T200	0,02	5,0000	ab
T4 / T100	0,01	2,0000	b

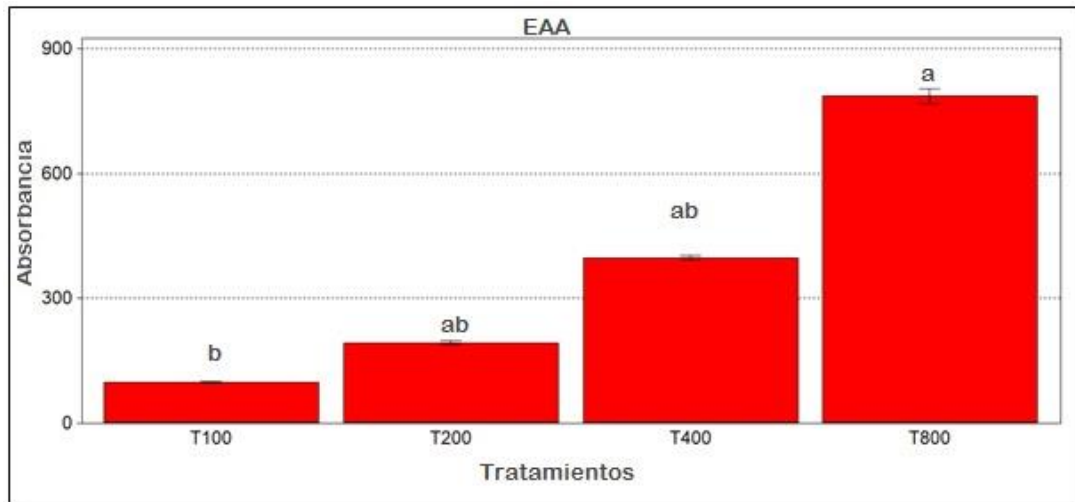


Figura 18. Gráfico de barras de error con 95%

Fuente: Autora

4.6. Socialización de la Investigación

La socialización de la investigación se realizó en la II Feria Ambiental mediante el uso de posters, evento organizado por la Universidad Técnica del Norte por motivo de celebrar el día mundial del Ambiente, el día 8 de Junio del 2018, el mismo que contó con la participación de instituciones gubernamentales y no gubernamentales de renombre además de proyectos investigativos, para dar a conocer a la comunidad universitaria y público en general sobre la labor institucional en los procesos ambientales y climáticos.

Para obtener un contexto de la investigación se indicó la importancia del proyecto realizado, los efectos negativos del arsénico en la naturaleza y en la salud humana, la importancia de elaborar un biosensor bacteriano como alternativa económicamente más accesible y con capacidad de medir arsénico potencialmente más rápido, seguido de los objetivos planteados, la metodología aplicada en la investigación, los resultados obtenidos, las conclusiones y recomendaciones a las que se llegó.

El proyecto investigativo generó un gran interés y acogida por parte de los asistentes, lo cual se evidenció en la tabulación de las encuestas realizadas (Anexo 7), en lo que corresponde a los resultados más relevantes, se obtuvo que el 100 % de los encuestados respondieron que el proyecto posee una relevancia muy alta para el actor y/o sector de la sociedad, el 100% de los encuestados mencionaron que la investigación realizada posee perspectivas para estudios complementarios posteriores, el 96% de los encuestados respondieron que el tema investigativo genera un beneficio concreto actualmente o a futuro para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución y en función de los objetivos planteados en la investigación de conformidad a un nivel muy alto, los encuestados respondieron que existe un 100% de cumplimiento. Los asistentes llenaron y firmaron las encuestas y registros de asistencia para dejar constancia de la actividad realizada. (Anexo 6, 7 y 8).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Las proteínas implicadas en la resistencia al arsénico fueron de ubicación membranal siendo las principales provenientes de los genes ars.

La proteína responsable de la luminiscencia se activa cuando el arsénico entra en contacto con el biosensor midiendo así la cantidad de fluorescencia, además de poder comparar la luminiscencia emitida con la concentración de arsénico en la muestra.

El biosensor bacteriano con *E. coli* modificada permite detectar arsénico en agua, comprobando que la mayor sobreexpresión del metaloide se da a medida que se incrementa la concentración del arsénico.

El intervalo de trabajo para el biosensor es de 0,202 a 0,546 unidades de absorbancia, siendo menor que el de espectroscopia de Absorción Atómica (EAA), por lo que el biosensor permite trabajar con muestras con baja o alta concentración de arsénico sin la necesidad de concentrarlas o diluirlas, permitiendo medir concentraciones de As de 0,01 a 0,08 ppm con un promedio de error de 2,8% con respecto a medición de EAA demostrando que es efectivo la detección de arsénico.

Referente a la socialización, el 100 % de los encuestados respondieron que el proyecto posee una relevancia muy alta para la sociedad. Además, el 100% de los encuestados mencionaron que la investigación realizada posee perspectivas para estudios complementarios posteriores.

5.2 Recomendaciones

Al realizar la electroporación es recomendable que la muestra que contiene las células competentes y el plásmido, sean sometidos una sola vez al impulso eléctrico, debido a que si se realiza varias veces se provoca mayor estrés a las células y por ende pueden morir.

Se recomienda realizar ensayos con diferentes concentraciones del metaloide, y medir cada hora, para evaluar el tiempo óptimo en el que se expresa mejor la luminiscencia.

Es importante trabajar en un lugar totalmente aséptico, para evitar que las muestras se contaminen y afecten a los resultados de la investigación.

Se recomienda realizar monitoreos constantes de metales pesados en el agua, sobre todo cuando este sea distribuido a la población para consumo.

BIBLIOGRAFÍA

- Agencia para sustancias toxicas y el registro de enfermedades. (2007). Resumen de Salud Pública Arsénico, 11.
- BioTek. (2017). Microplate Data Collection & Analysis Software. Retrieved from <https://www.biotek.es/es/products/liquid-handling/>
- Castro Ortíz, Lourdes Patricia; Luna Pabello, Víctor Manuel; Villalobos Pietrini, R. (2007). Estado del arte y perspectivas del uso de biosensores ambientales en México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 1.
- Catelo, M. (2015). *Determinación de Arsénico y Mercurio en agua de consumo del cantón Rumiñahui por Espectrofotometría de Absorción Atómica*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Chen, CM; Misra, TK; Silver, S; Rosen, B. (1986). Nucleotide sequence of the structural genes for an anion pump. The plasmid-encoded arsenical resistance operon. *J Biol Chem*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3021763>
- Corton, E. (2011). Desarrollo y aplicaciones de biosensores enzimáticos y microbianos Universidad de Buenos Aires " Desarrollo y Aplicaciones de Biosensores Enzimaticos y Microbianos " por Eduardo Corton. *Universidad de Buenos Aires*.
- Daunert, S; Barrett, G; Feliciano, J; Shetty, R; Shrestha, S; & Smith-Spencer, W. (2000). Genetically engineered whole-cell sensing systems: coupling biological recognition with reporter genes. *Chemical Reviews*, 2705–2738.
- Daza, C; Campos, V. L; Rojas, C; Rodriguez-LLamazares, S; Smith, C; & Mondaca, M. A. (2016). Reducción de selenito a Selenio elemental por *Pantoea agglomerans*. *Gayana (Concepción)*, 80, 67–74.
- Dwivedi, S. (2016). Microorganism - As Biosensor for Arsenic detection. *International Journal of Research in Science and Technology*, 06, 1–8.
- Earthworks Fact Sheet. (2000). Minería de roca dura y drenaje ácido de minas. Retrieved from http://www.earthworksaction.org/pubs/FS_AMD.pdf
- ELIKA. (2013). Ficha Arsénico, 1–4. Retrieved from http://www.elika.eus/datos/pdfs_agrupados/Documento142/27.Arsénico.pdf

- Erickson, B. E. (2013). Field kits fail to provide accurate measure of arsenic in groundwater. *Environmental Science and Technology*, 35–38.
- García, S. (2013). Estudios de especiación de arsénico y acumulación de metales en muestras de interés medioambiental. *Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica de Obras Públicas*, 400. Retrieved from http://oa.upm.es/15311/1/SARA_GARCIA_SALGADO.pdf
- INEN. (2014). Agua Potable. Requisitos. Nte Inen 1108. *Instituto Ecuatoriano de Normalización*, (5), 1–10. Retrieved from <http://normaspdf.inen.gob.ec/pdf/nte/1108-5.pdf>
- Invitrogen. (2014). Neon™ Transfection System. User Guide. *Life Technologies*, (25), 1–42.
- Legarreta, M. (2015). El Agua. Retrieved from <http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/102/html/elagua.html>
- Litter, M. I., Armienta, M. A., & Farías, S. S. (2009). *Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos. IBEROARSEN, CYTED, Buenos Aires, Argentina.*
- Lobos, C. (2007). *Uso de un Biosensor bacteriano, para detección de arsénico (III), en muestras ambientales.*
- Londoño Franco, L. F., Londoño Muñoz, P. T., & Muñoz Garcia, F. G. (2016). Los Riesgos De Los Metales Pesados En La Salud Humana Y Animal. *Biotechnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(2), 145. [https://doi.org/10.18684/BSAA\(14\)145-153](https://doi.org/10.18684/BSAA(14)145-153)
- MACROGEN. (2017). Gene Synthesis Report, 6. Retrieved from https://dna.macrogen.com/eng/quotation/ces/ces_quotaion_step1.jsp
- Mañay, N., Clavijo, G., & Diaz, L. (2009). Capítulo 5 Absorción atómica con horno de grafito. *Riquim.Fq.Edu.Uy*, 79–92. Retrieved from <http://riquim.fq.edu.uy/archive/files/02ba23e6cc083af03bfc55ac63a98a0c.pdf>
- Mancilla-Villa, Ó. R., Ortega-Escobar, H. M., Ramírez-Ayala, C., Uscanga-Mortera, E., Ramos-Bello, R., & Reyes-Ortigoza, A. L. (2011). Metales pesados totales y arsénico en el agua para riego de Puebla y Veracruz, México. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 28(1), 39–48. <https://doi.org/0188-499>
- Marrero-Coto, J., Díaz-Valdivia, A., & Coto-Pérez, O. (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación.

- Revista CENIC Ciencias Biologicas*, 41(1), 67–78. <https://doi.org/10.1007/s10534-013-9633-3>
- Marrero, C; Jeannette, Díaz, V; Arelys; Coto, P. O. (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 41, 1. Retrieved from <http://www.redalyc.org/html/1812/181221644010/>
- Martínez Rodríguez, E., Cristina, E., & Lorenzo, S. (2005). Errores frecuentes en la interpretación del coeficiente de determinación lineal. *Anuario Jurídico y Económico Escurialense*, 38, 315–332.
- MERCK. (2015). Test Arsénico. Retrieved from http://www.merckmillipore.com/INTL/es/product/Arsenic-Test,MDA_CHEM-101747
- Metalyser. (2013). Analizador Portátil de Metales Pesados con precisión a niveles de ppb, (February), 60–65.
- MICROLAB. (2015). Análisis de Metales por Espectrofotometría Atómica. Retrieved from <http://www.microlabindustrial.com/blog/analisis-de-metales-por-espectrofotometria-atmica>
- Miller, J; Miller, J. (1993). Estadística para la Química Analítica. Capítulo 5 Errores en análisis instrumental: Regresión y Correlación. *Addison-Wesley Iberoamericana.*, 11–152.
- Miller, J; Miller, J. (2002). Estadística y Quimiometría para Química Analítica. Capítulo 5 Métodos de Calibración en Análisis Instrumental: Regresión y Correlación. *Prentice Hall*, 11–152.
- Minas, M. D. E., Ministerio, Y. E., & Medio, D. E. L. (2001). *Minero ambiental*, 1–3.
- Montalvan, L. (2014). Prueba de Shapiro-Wilk para Probar Normalidad. Retrieved from <https://prezi.com/vnmuq6wdk149/prueba-de-shapiro-wilk-para-probar-normalidad/>
- Morales, D. U. M., Cáceres, E. A., Ramos, D. Z., Fernández, J., Rodas, Z. L. M., & Ventura, A. T. (2017). Arsénico total no deseado ante valores referenciales de pH en agua superficial. *Investig. Altoandin*, 19, 305–312.
- Moreno, J. (2018). *Determinar la eficiencia de transformación genética mediante el método químico y método físico (Electroporación) a través de la bacteria Escherichia coli.*
- Navarrete, A. (2017). *Identificación de Proteínas de membrana de bacterias aisladas en un*

medio enriquecido con Arsénico (As) mediante la técnica de SDS Page para la Remoción del Metaloide. Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra.

Nies, D., & Silver, S. (1995). Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *Journal of Industrial Microbiology*, 14, 186–199.

OMS. (2018). Arsénico. Retrieved from <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/arsenic>

Peña, N. (2003). *Desarrollo De Biosensores Amperométricos Compósitos Basados En Peroxidasa.* Universidad Complutense de Madrid. Retrieved from http://biblioteca.ucm.es/mwg-internal/de5fs23hu73ds/progress?id=SbP1nu_1ipCqKM0TmJEA4y0oMMBMo6920gfkPjEAKHw,

Reyes, Y. C., Vergara, I., Torres, O. E., Díaz, M., & González, E. E. (2016). Contaminación por metales pesados: implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Revista Ingeniería, Investigación y Desarrollo*, 16(2), 66–77. <https://doi.org/10.19053/1900771X.v16.n2.2016.5447>

Rivero, s; Hernández, Y;García, A; Calzada, R. (2013). Comparación de dos métodos para la preparación de células competentes en Escherichia coli. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 44(2), 23–28. Retrieved from <http://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/sites/default/files/articulos/CB20-12.pdf>

Salvucci, D. M. (2010). Crecimiento Bacteriano. Retrieved from <https://esalvucci.wordpress.com/crecimiento-microbiano/>

Smets, B; Morrow, J; Arango, P. (2003). Plasmid introduction in metal-stressed, subsurface-derived microcosms: plasmid fate and community response. *Appl Environ Microbiol*, 69, 4087–4097.

Stocker, J; Balluch, D; M, G; H, H; Feliciano, J; Daunert, S;Malik & Roelof Van der Meer, J. (2003). Development of a Set of Simple Bacterial Biosensors for Quantitative and Rapid Measurements of Arsenite and Arsenate in Potable Water. *Environnemental Science Technology*, 4743–4750.

Suárez, F. J. G.-D. D. G. W., & Torre, C. R. A. ;A. H. de la T. (2004). Análisis, diagnóstico y tratamiento de las intoxicaciones arsenicales. *Cuadernos de Medicina Forense*, N° 35, 87–

119. Retrieved from <http://scielo.isciii.es/pdf/cmfn35/Art01.pdf>
- TecnoStats. (2016). Prueba de Shapiro-Wilks. Retrieved from http://riotorto.users.sourceforge.net/R/noparam_shapiro/
- Trang, P; Berg, M; Viet, P.; Mui, N; Meer, J. (2005). Bacterial bioassay for rapid and accurate analysis of arsenic in highly variable groundwater samples. *Environmental Science & Technology*, 39, 25–30.
- Valenzuela, O. (2010). *Evaluación de la concentración de arsénico en agua empleando Biosensores Microbianos*. Instituto Politécnico Nacional. Retrieved from <http://www.enmh.ipn.mx/PosgradoInvestigacion/Documents/tesismsosh/MARIOMEND OZAGARRIDO.pdf>
- Wackwitz, A; Harms, H; Chatzinotas, A; Breuer, U; Vogne, C. V. D. M. (2008). Internal arsenite bioassay calibration using multiple bioreporter cell lines. *Microb Biotechnol*.

CERTIFICACIÓN ANTIPLAGIO

Por medio del presente, hago la entrega del informe de urkund de la señorita EDITH VERÓNICA MEJÍA SEGOVIA con el tema de tesis "CONSTRUCCIÓN DEL BIO SENSOR PARA DETECTAR ARSÉNICO EN AGUA POR APLICACIÓN TECNOLÓGICA DE LA PUCE-SI", el cual contiene un 5 % de plagio. Por lo cual es admisible para la presentación del mismo

Atentamente,



M.Sc. Santiago Xavier Mafla Andrade
DOCENTE ASESOR DE LA INVESTIGACIÓN
C.C: 1002658399

Fecha: 29 de Junio del 2018

ANEXOS

ANEXO N° 1 Principales propiedades del arsénico

Propiedad	Valor
Símbolo Químico	As
Número Atómico	33
Peso Atómico	74,922
Punto de Fusión	614°C
Punto de Ebullición	817°C
Densidad	5,72 g/cm ³
Estados de Oxidación	±3, 5
Electronegatividad	2,18
Radio Covalente	1,19 Å
Radio Atómico	1,39 Å
Configuración Electrónica	[Ar] 4s ² 3d ¹⁰ 4p ³
Grupo, período y bloque	15, 4, p
Electrones por nivel	2, 8, 18, 5

Fuente: (Castelo, 2015)

ANEXO N° 2 Concentración de arsénico en el ambiente

Medio	Concentración
Aire	1,5 – 53 ng/m ³
Lluvia	0,46 µg/L
Ríos	0,20 – 264 µg/L
Lagos	0,38 – 1000 µg/L
Agua subterránea (pozos)	1,0 – 1000 µg/L
Agua marina	0,15 – 6 µg/L
Suelo	0,1 – 1000 mg/kg
Sedimentos de ríos	5,0 – 4000 mg/kg
Sedimentos de lagos	2,0 – 300 mg/kg
Rocas ígneas	0,3 – 113 mg/g
Rocas metamórficas	0,0 – 143 mg/kg
Rocas sedimentarias	0,1 – 490 mg/kg

Fuente: (Castelo, 2015)

ANEXO N° 3 Requisitos específicos para el agua de consumo humano.

PARAMETRO	UNIDAD	Límite máximo permitido
Características físicas		
Color	Unidades de color aparente (Pt-Co)	15
Turbiedad	NTU	5
Olor	---	no objetable
Sabor	---	no objetable
Inorgánicos		
Antimonio, Sb	mg/l	0,02
Arsénico, As	mg/l	0,01
Bario, Ba	mg/l	0,7
Boro, B	mg/l	2,4
Cadmio, Cd	mg/l	0,003
Cianuros, CN ⁻	mg/l	0,07
Cloro libre residual*	mg/l	0,3 a 1,5 ¹⁾
Cobre, Cu	mg/l	2,0
Cromo, Cr (cromo total)	mg/l	0,05
Fluoruros	mg/l	1,5
Mercurio, Hg	mg/l	0,006
Níquel, Ni	mg/l	0,07
Nitratos, NO ₃ ⁻	mg/l	50
Nitritos, NO ₂ ⁻	mg/l	3,0
Plomo, Pb	mg/l	0,01
Radiación total α *	Bq/l	0,5
Radiación total β **	Bq/l	1,0
Selenio, Se	mg/l	0,04
¹⁾ Es el rango en el que debe estar el cloro libre residual luego de un tiempo mínimo de contacto de 30 minutos * Corresponde a la radiación emitida por los siguientes radionucleidos: ²¹⁰ Po, ²²⁴ Ra, ²²⁶ Ra, ²³² Th, ²³⁴ U, ²³⁸ U, ²³⁹ Pu ** Corresponde a la radiación emitida por los siguientes radionucleidos: ⁶⁰ Co, ⁸⁹ Sr, ⁹⁰ Sr, ¹²⁹ I, ¹³¹ I, ¹³⁴ Cs, ¹³⁷ Cs, ²¹⁰ Pb, ²²⁸ Ra		

Fuente: (INEN, 2014)

ANEXO N° 4 Soluciones utilizadas

- Lysozyme Digestion Buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2.5 mM EDTA, 1% Triton)

Tris-HCl 25 mM.....	0,393 g
EDTA 2.5 mM.....	0,093 g
Tritón 1%.....	1 ml
Agua destilada.....	Aforar a 50 ml

- TE Buffer (10 mM Tris-HCL, pH 8.0, 0,01 mM EDTA)

Tris-HCl 10 mM.....	0,0393 g
EDTA 0.01 mM.....	0,9 mg
Agua destilada.....	Aforar a 25 ml

- Solución stock de acrylamida/bisacrilamida al 10%

Acrylamide al 40%.....	25 ml
Bis -acrylamide al 2%.....	16,5 ml
TBE 10X.....	5 ml
Agua destilada.....	Aforar a 100 ml

- Solución stock de acrylamida/bisacrilamida al 40%

Acrylamide.....	38,93 g
Bis -acrylamide.....	1,07 g
Agua destilada.....	Aforar a 100 ml

- TG-SDS (1X) (0,025 M Tris-HCl; 0,192 M Tris; 0,1% SDS)

Tris-HCL 0,025 M.....	0,3939 g
Tris 0,192 M.....	3,44 g
SDS 0,1%.....	0,1 g
Agua destilada.....	Aforar a 100 ml

- Solución stock del gel de Agarosa al 2%

Agarosa.....	2 g
TAE 1X.....	Aforar a 100 ml
Diamond™ Nucleic.....	5 µL
Acid Dye	

ANEXO N° 5 Encuesta de socialización de la investigación.



PROCESO DE SOCIALIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN

El siguiente cuestionario nos permitirá implementar mejoras constantes en los procesos de socialización de trabajos de investigación, por favor háganos llegar sus comentarios y sugerencias:

FECHA			
EXPOSITOR			
LUGAR	DENTRO PUCESI		FUERA PUCESI

NOTA IMPORTANTE: Por favor conteste las preguntas según la siguiente escala:

5. MUY ALTO / 4. ALTO / 3. MEDIO / 2. BAJO / 1. NULO

DETALLE DE VALORACIÓN	1	2	3	4	5
ORGANIZACIÓN DEL EVENTO DE SOCIALIZACIÓN:					
1. ¿Considera Usted que la sala donde se desarrolló este evento brindó las comodidades necesarias?					
2. ¿Considera Usted que el material audiovisual utilizado en la presentación fue adecuado?					
EJECUCIÓN DEL EVENTO POR PARTE DEL EXPOSITOR					
3. ¿Considera Usted que el expositor mostró dominio del tema?					
4. ¿Estima Usted que el manejo del auditorio por parte del expositor fue adecuado?					
5. ¿Considera Usted que el Expositor demostró facilidad de expresión?					
MEDICIÓN DE IMPACTO DE LA INVESTIGACIÓN:					
6. ¿Considera Usted que el tema investigado posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad?					
7. ¿Considera Usted que esta investigación posee perspectivas para estudios complementarios posteriores?					
8. ¿Considera Usted que el tema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución?					
9. ¿En función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera Usted que éstos se cumplieron?					
REALICE UN COMENTARIO O SUGERENCIA PARA LOS ORGANIZADORES DE ESTE EVENTO					
MENCIONE USTED OTRAS PROBLEMÁTICAS QUE A SU PARECER PODRÍAN SER INVESTIGADAS Y QUE POSEAN IMPORTANCIA PARA ALGÚN ACTOR Y/O SECTOR DE NUESTRA COLECTIVIDAD					

INSTITUCIÓN U ORGANIZACIÓN A LA QUE PERTENECE EL ENCUESTADO	
--	--

ANEXO N° 6 Lista de participantes que asistieron a la socialización

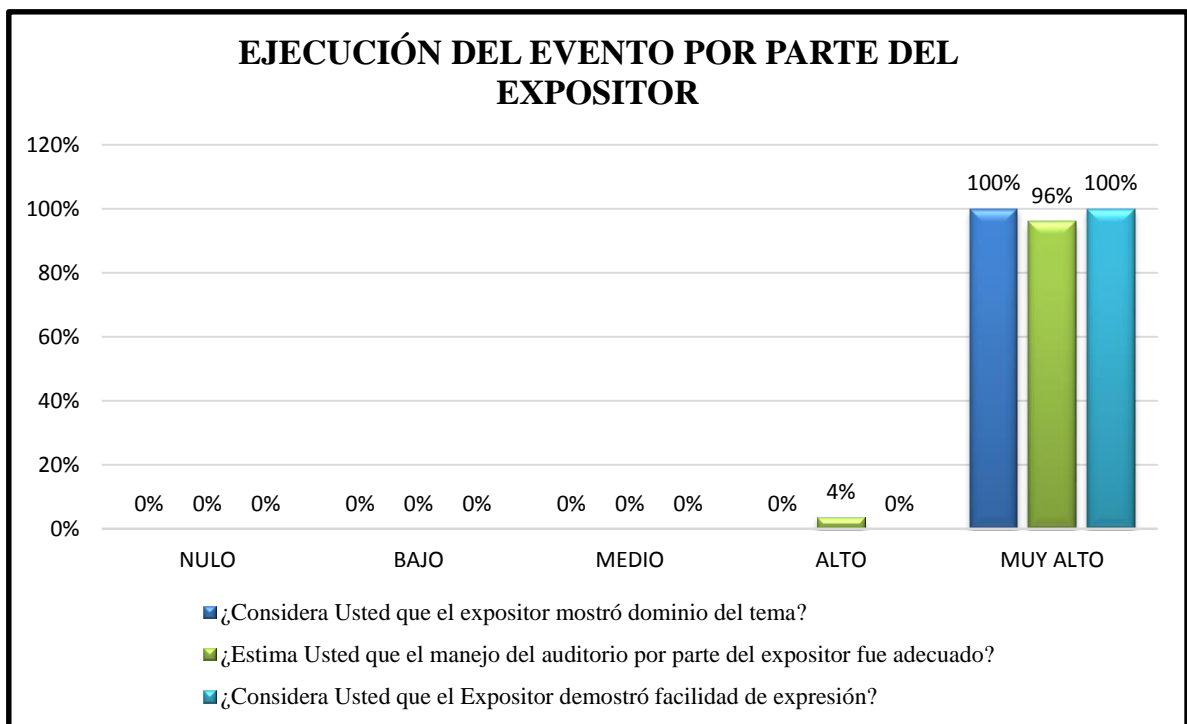
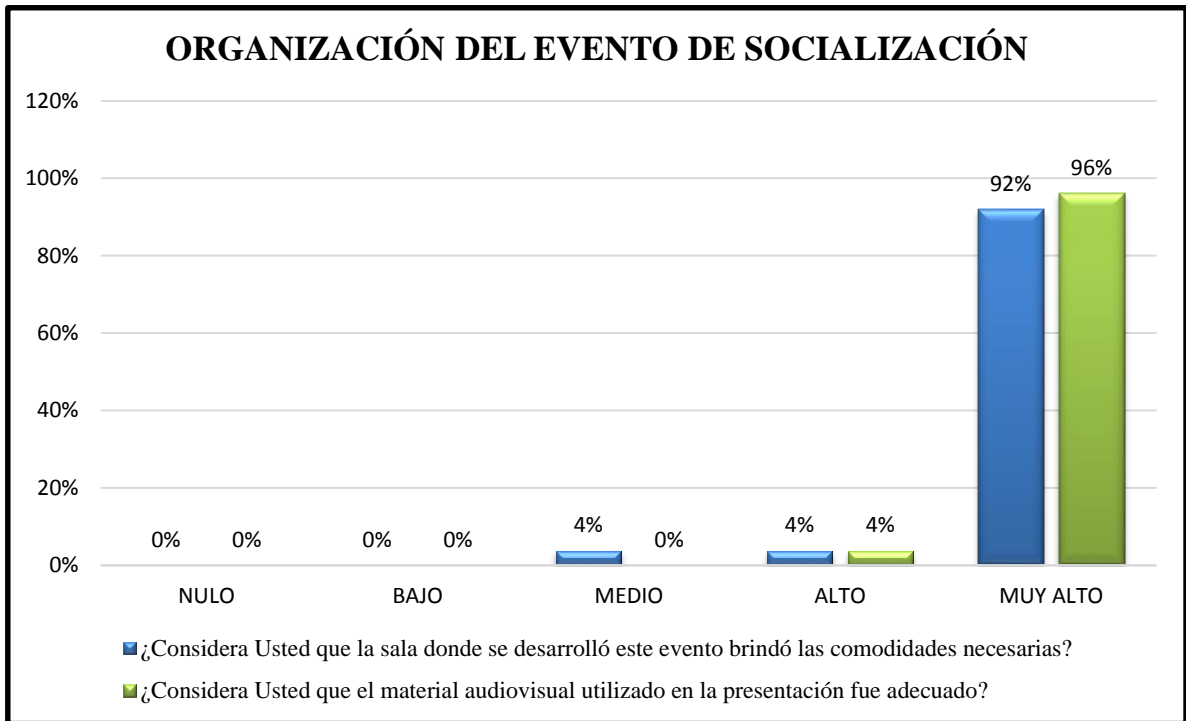


LISTA DE ASISTENCIA A SOCIALIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN

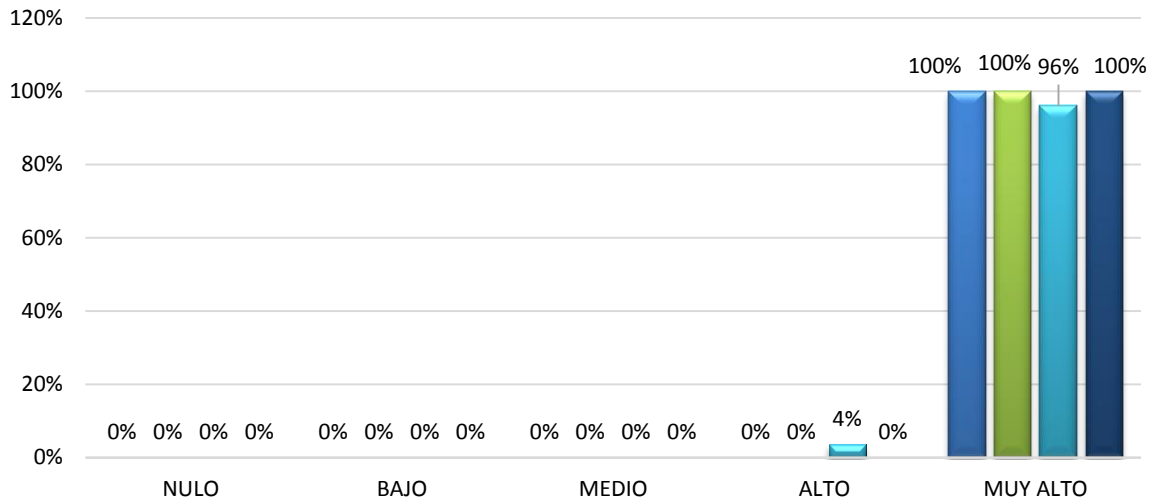
NOMBRE DEL EXPOSITOR: EDITH VERÓNICA MEJÍA SEGOVIA
 CARRERA: CIENCIAS AMBIENTALES Y ECODESARROLLO
 FECHA: 08 de Junio del 2018

NOMBRE ASISTENTE	NÚMERO DE CÉDULA	INSTITUCION A LA QUE REPRESENTA	FIRMA
Francisco Paz...	100082173-2	Participante	[Firma]
Marta Martínez	0460949046	Participante	[Firma]
Miguel Uñider	100070979-8	Participante	[Firma]
Santiago Matla	1002658399	Participante	[Firma]
César Arias	040168156-4	Participante	[Firma]
Thalia Sánchez	1003974191	PUCESI	[Firma]
Nancy Pasquero	100936085-1	U.E. Juan Pablo Segura	[Firma]
Rubén del Toro	175754447-1	PUCESI	[Firma]
César Zuleta	1001057546	PUCESI	[Firma]
Cecilia Moreta	100753235-5	Participante	[Firma]
Jenny Puente	100252911-1	Manuel Mantillo	Jenny Puente
Nathalia Nena	100523884-4	Manuel Mantillo	[Firma]
David Endara	100438542-1	UTN	[Firma]
Gabo Brúela	100401363	UTN	[Firma]
Karla Benavides	1003041777	Oviedo	[Firma]
Anaís Corvajal	100470691-6	Oviedo	[Firma]
María Guerrero		Oviedo	[Firma]
Archib Calderón		Oviedo	[Firma]

ANEXO N° 7 Respuestas de las Encuestas Realizadas



MEDICIÓN DE IMPACTO DE LA INVESTIGACIÓN



- ¿Considera Usted que el tema investigado posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad?
- ¿Considera Usted que esta investigación posee perspectivas para estudios complementarios posteriores?
- ¿Considera Usted que el tema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución?
- ¿En función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera Usted que éstos se cumplieron?

ANEXO N° 8 Socialización de la investigación

