Pontificia Universidad Católica del Ecuador
Sede Ibarra

ESCUELA DE CIENCIAS AGRICOLAS Y AMBIENTALES "ECAA"

INFORME FINAL DEL PROYECTO

TEMA:

"CONSTRUCCIÓN DEL BIOSENSOR PARA DETECTAR MERCURIO EN AGUA POR APLICACIÓN TECNOLÓGICA DE LA PUCE-SI"

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

INGENIERO EN CIENCAS AMBIENTALES Y ECODESARROLLO

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN:

Línea 3. Conservación de la biodiversidad

Sublínea 3.1 Estudio, conservación y manejo de la biodiversidad

AUTOR: MARCO ANTONIO SANTACRUZ POZO

ASESOR: Mgs. Santiago Xavier Mafla Andrade

IBARRA, DICIEMBRE 2018

Ibarra, 21 de Diciembre de 2018

Mgs. 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).....

Mgs. Santiago Xavier Mafla Andrade

C.C: 1002658399

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): .....

Mgs. Santiago Xavier Mafla Andrade (Asesor)

C.C. 1002658399

(f): .....

Ph.D. Yadira Fernanda Oroñez Vivanco (Lectora)

C.C. 1103764864

(f): .....

Ph.D. Thomas Zaragoza García (Lector)

C.C 1725238982

ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo Marco Antonio Santacruz Pozo, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 165 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, que manifiesta textualmente: "Se reconoce facultad de los autores y demás titulares de derechos de disponer de sus derechos o autorizar las utilizaciones de sus obras o prestaciones, a título gratuito u oneroso, según las condiciones que determinen. Esta facultad podrá ejercerse mediante licencias libres, abiertas y otros modelos alternativos de licenciamiento o la renuncia".

Ibarra, 21 de Diciembre de 2018

f): .....

Marco Antonio Santacruz Pozo

C.C.: 1003707237

AUTORÍA

Yo, Marco Antonio Santacruz Pozo, portador de la cédula de ciudadanía N° 1003707237, 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.



f): .....

Marco Antonio Santacruz Pozo

C.C.: 1003707237

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo: Marco Antonio Santacruz Pozo, con CC: 1003707237, autor del trabajo de grado intitulado: "Construcción del biosensor para detectar mercurio en agua por aplicación tecnológica de la PUCE-SI", previo a la obtención del título profesional de "Ingeniero en Ciencias Ambientales y Ecodesarrollo", en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales

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, 21 de Diciembre de 2018

(f.).....

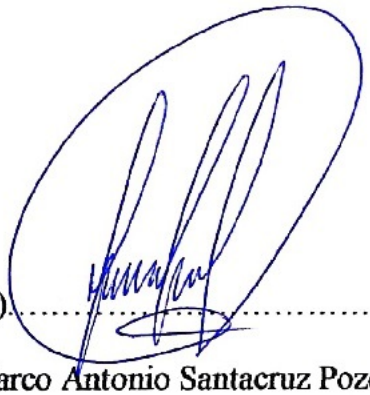
Marco Antonio Santacruz Pozo

C.C. 1003707237

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 MERCURIO 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 de 2018

Para constancia firma:



(f).....

Marco Antonio Santacruz Pozo

Estudiante que ejecuta el Trabajo de Titulación

C.C.: 1003707237

Carrera: Ciencias Ambientales y Ecodesarrollo

Ibarra, 21 de Diciembre de 2018

DEDICATORIA

A mis padres, todas sus enseñanzas, apoyo, sacrificios y amor se ven reflejados en la culminación de mi carrera universitaria con la presente investigación.

A mi hermano, en quien encuentro la motivación para ser cada día mejor.

A mi hermana, quien aún a pesar de haber ya partido, me enseño las mejores lecciones de perseverancia y esfuerzo, aplicadas durante mi carrera y en la vida, este logro va por vos mi nena.

AGRADECIMIENTO

A Dios, quien me ha bendecido con los dones necesarios para nunca rendirme y poder obtener los frutos de mis esfuerzos, quien ha guiado mis pasos para llegar a este punto de mi vida, quien en sus planes permitió que alcance este y muchos logros más.

A mis padres, quienes con amor y sacrificio han dado todo de ellos, para hacer de mi un hombre de bien, inculcándome sus valores y principios.

A mis hermanos, por ser mi indiscutible inspiración, por quienes me he exigido aún más de donde podría llegar por ser un ejemplo para ellos.

A mi tutor, gracias por la confianza y los conocimientos impartidos, por el esfuerzo y tiempo dedicados a la culminación de esta investigación y a mi desarrollo como profesional.

INDICE DE CONTENIDO

1. RESUMEN……...1

2. ABSTRACT…….2

3. INTRODUCCIÓN……...3

Objetivo General……..4

Objetivos Específicos……...4

Hipótesis……..……5

Variable dependiente……5

Variable independiente……5

4. ESTADO DEL ARTE……..6

4.1. Mercurio (Hg)…..……..6

4.1.1. Descripción……...6

4.1.2. Fuentes……..6

4.1.3. Toxicidad……..6

4.1.4. Límites máximos Permisibles……...7

4.2. Biosensores……...7

4.2.1. Introducción……..7

4.2.2. Características……...8

4.2.3. Estructura del operón mer……8

4.3. Mercurio y Resistencia Antibiótica……...9

4.4. Técnicas de medición de mercurio……..10

4.4.1. Espectroscopia de Absorción Atómica con generación de hidruro (HG-AAS)……...10

4.4.2. Microscopia Electrónica de Barrido……10

4.5. Biosensores para detectar Mercurio (Estudios)……...11

5. MATERIALES Y MÉTODOS……...12

5.1. Lugar de desarrollo de la investigación……...12

5.2. Metodología……12

5.2.1. Diseño Experimental……...12

5.2.2. Desarrollo de la experimentación……12

5.2.2.1. Caracterización de Proteínas resistentes al Mercurio……13

5.2.2.2. Extracción de proteínas de membrana totales……13

5.2.2.3. Análisis de proteínas mediante la técnica SDS-PAGE……..14

5.2.2.4. Elaboración del plásmido……..15

5.2.2.5. Inserción del plásmido por electroporación……...15

5.2.2.6. Análisis de Mercurio por metodología de Espectrofotómetro de microplacas EPOCH……...19

5.2.2.7. Análisis de Mercurio por Espectroscopia de Absorción Atómica por Generador de Hidruros……20

5.2.2.8. Método de Control – Tinción Gram……...20

6. RESULTADOS Y DISCUCIÓN…….....22

6.1. Identificación de proteína de resistencia al Mercurio. ……22

6.2. Ensamblaje del plásmido…….....24

6.2.1. Vector: pTOP_Blunt_V2……25

6.2.2. Características del plásmido……25

6.3. Electroporación-Expresión…….....25

6.4. Análisis cuantitativo en Espectrofotómetro de Microplacas y Espectroscopia de Absorción Atómica…….....28

6.5. Análisis estadístico…….....30

6.5.1. Análisis los datos de Absorbancia obtenidos por Espectrofotómetro de microplacas……...……..30

6.5.1.1. Gráfico de Distribución Normal…….30

6.5.1.2. Homogeneidad de Varianza……...31

6.5.1.3. ADEVA…….31

6.5.1.4. Prueba de pares comparativos de Scheffe……...32

6.5.2. Análisis de datos de Absorbancia obtenidos por Espectroscopia de Absorción Atómica...……..33

6.5.1.1. Gráfico de Distribución Normal…….33

6.5.1.2. Homogeneidad de Varianza……...33

6.5.1.3. ADEVA…….34

6.5.1.4. Prueba de pares comparativos de Scheffe……...35

6.6. Socialización……..35

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES…….....39

7.1. Conclusiones……..39

7.2. Recomendaciones……...40

8. BIBLIOGRAFÍA……41

9. ANEXOS……45

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esquema básico de un biosensor……...….7

Figura 2 El operón mer incluyendo los reguladores (merR y merD), transportadores (merP y merT), mercúrico reductasa (merA) y organomercurial liasa (merB)……...9

Figura 3 Electroforesis en gel SDS PAGE con gradiente de denaturalización (10%-40%)…….22

Figura 4 Mecanismo molecular de la resistencia a mercurio en bacterias……..……23

Figura 5 Mapa esquemático del plásmido pTOP Blunt V2……..…...25

Figura 6 Cepas transformadas mediante Electroporación.....26

Figura 7 Expresión del biosensor a diferentes concentraciones de mercurio.....27

Figura 8 Línea de tendencia de Absorbancia de diferentes concentraciones de mercurio medidas por Espectrofotómetro de microplacas EPOCH.....29

Figura 9 Línea de tendencia de Absorbancias y Concentraciones de mercurio medidas por Espectroscopia de Absorción Atómica.....29

Figura 10 Distribución Normal de la Absorbancia por Espectrofotometria de microplacas.....30

Figura 11 Distribución normal de Absorbancia por Espectroscopia de Absorción Atómica.....33

Figura 12 Gráfico de resultado para la pregunta de encuesta: ¿Considera Usted que el tema investigado posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad?.....36

Figura 13 Gráfico de resultado para la pregunta de encuesta: ¿Considera Usted que esta investigación posee perspectivas para estudios complementarios posteriores?.....36

Figura 14 Gráfico de resultado para la pregunta de encuesta: ¿Considera Usted que el tema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución?.....37

Figura 15 Gráfico de resultado para la pregunta de encuesta: ¿En función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera Usted que éstos se cumplieron?.....38

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de Tratamientos considerados en la investigación……12

Tabla 2. Preparación de las soluciones stock de SDS - PAGE……14

Tabla 3. Características de la Secuencia del Plásmido……24

Tabla 4. Cuantificación de mercurio (absorbancia y concentración) mediente Espectrofotómetro de microplacas EPOCH y Espectroscopia de Absorción Atómica en Generador de Hidruros……28

Tabla 5. Resultados de las pruebas de Homogeneidad de Varianza……31

Tabla 6. Análisis de Varianza……31

Tabla 7. Resultado de la prueba de Scheffe……32

Tabla 8. Resultados de las pruebas de Homogeneidad de Varianza……33

Tabla 9. Análisis de Varianza……34

Tabla 10. Resultado de la prueba Scheffe……...35

1. RESUMEN.-

El mercurio (Hg), es considerado uno de los contaminantes más relevantes en el ambiente a nivel mundial. Pese a que existen diversos métodos para identificarlo, tales como la Absorción Atómica, Microscopia Electrónica de Barrido, entre los principales; estos presentan varias desventajas en su metodología, entre ellos el costo económico que implica la adquisición de equipos y reactivos necesarios. Por lo que una alternativa es la aplicación de la biotecnología misma que conjuga los "principios científicos y de ingeniería a la transformación de materiales por acción de agentes biológicos, microorganismos principalmente, con el fin de proveer a nuestra sociedad de bienes y servicios." (Blanch, 2010). El objetivo de la presente investigación fue la elaboración de un biosensor bacteriano para la detección de Mercurio en agua mediante la modificación de la bacteria *Escherichia coli*. Para modificarla se insertó el plasmido pTOP Blunt V2, mismo que le otorga a *E. coli* resistenia a la ampicilina. El plasmido se sintetizó usando los genes de *lux* y *mer*, productor de luminicencia y resistencia al Hg respectivamente. Para la inserción del plásmido y transformación de la bacteria se aplicó la técnica de Electroporación, que las somete a impulsos eléctricos controlados. Una vez transformadas se cultivaron en agar LB y se comprobó su tolerancia a Hg en concentraciones de 0,006; 0,012; 0,024 y 0,048 ppm. Para evaluar la eficiencia del biosensor, se cuantificó la absorbancia de Hg mediante Espectofotometría midiendo la absorvancia del medio de cultivo, concluyendose la mediciones por espectrofotometría y por absorción atómica fueron similares a la comparación de las concentraciones, entre sí, resultando en un error promedio de 0,52%. Demostrando la alta eficiencia para la medición de las concentraciones del metaloide.

Palabras clave: *Escherichia coli*, Plásmido, Biosensor bacteriano, Concentración, Mercurio y Espectrofotometría.

2. ABSTRACT.-

Mercury (Hg) is considered one of the most important environmental pollutants worldwide and although there are several methods to identify it such as Atomic Absorption, Scanning Electron Microscopy, among the main ones, these have several disadvantages in their methodology, added to the economic cost that implies the acquisition of necessary equipment and reagents. So an alternative is the application of biotechnology itself that combines the "scientific and engineering principles to the transformation of materials by action of biological agents, mainly microorganisms, in order to provide our society with goods and services." (Blanch, 2010). The objective of the present investigation was the elaboration of a bacterial biosensor for the detection of Mercury in water by means of the modification of the bacterium Escherichia coli. To modify it, plasmid pTOP Blunt V2 was inserted, which gives E. coli ampicillin resistance. The plasmid was synthesized by the *lux* and *mer* genes. For the insertion of the plasmid and transformation of the bacteria, the Electroporation technique was applied, which subjected them to controlled electrical impulses. Being transformed, they were cultured on LB agar and tested for tolerance to Hg in concentrations of 0.006; 0.012; 0.024 and 0.048 ppm. To evaluate the efficiency of the biosensor, the absorbance of Hg was quantified by microplate spectrophotometry of the solution of bacteria in nutrient medium. It was concluded that the biosensor is efficient for the determination of Hg concentrations, thanks to the analysis of microplate spectrophotometry which determined concentrations similar to those expressed by the Atomic Absorption Spectroscopy of the nutrient medium absent from the biosensor, the comparison of the concentrations resulted in an average error of 0.52%. Demonstrating high efficiency to determine metalloid concentrations.

Key Words: *Escherichia coli***,** Plasmid, Bacterial Biosensor, Concentration, Mercury and Spectrophotometry.

3. INTRODUCCIÓN.-

El equilibrio entre la utilización y preservación de los recursos naturales, para el desarrollo del ser humano como sociedad, se ha convertido de vital importancia en la actualidad. Paralelamente, los avances científicos y tecnológicos, que se han venido dando desde varias décadas atrás, han facilitado métodos para conseguir este equilibrio. Uno de ellos es la aplicación de la biotecnología que conjuga los "principios científicos y de ingeniería a la transformación de materiales por acción de agentes biológicos, microorganismos principalmente, con el fin de proveer a nuestra sociedad de bienes y servicios." (Blanch, 2010)

Por lo que es imperioso utilizar la biotecnología en procesos pequeños que puede hacer una gran diferencia si se suman varios de ellos, uno de esos procesos es la detección, con mínimo impacto al ambiente, de ciertas substancias o elementos que deteriorar la calidad natural del ambiente, como por ejemplo la detección de metales pesados. Mismos que generan una gran problemática al momento en el que se encuentran en el agua.

El (Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente del Gobierno , s.f.) Se refiere a los metales pesados de la siguiente forma:

> "Existen varias maneras de definir el término "metal pesado", una de ellas es referida al peso atómico y definiría un metal pesado como un elemento químico comprendido entre 63.55 (Cu) y 200.59 (Hg); otra manera se refiere a los metales de densidad entre 4 g/cm³ hasta 7 g/cm³ y también hay otra clasificación referida al número atómico."

A pesar de que no todos los metales de densidad alta son especialmente tóxicos en concentraciones normales siendo que inclusive existen aquellos que son necesarios para el ser humano. Empero existe un sin número de metales pesados que se los reconoce por su tendencia a representar serios problemas medioambientales. Este es el caso del mercurio (Hg). (Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente del Gobierno , s.f.)

El mercurio es uno de los metales pesados más comunes dentro de estudios de contaminación ambiental así lo piensan en su investigación, (Gaioli, Amoedo, & Gonzáles, 2012) quienes mencionan que debido a su toxicidad ambiental y sus efectos sobre la salud humana; actualmente el mercurio es considerado, uno de los más relevantes contaminantes ambientales a nivel mundial. Considerando la contaminación por este elemento, se han desarrollado varias técnicas y tecnologías, para la determinación de concentraciones en ambiente, tanto agua como suelo. Uno de ellos y el más utilizado es el de Absorción Atómica que ha sido estandarizado por un equipo de químicos australianos dirigidos por Alan Wash.

El problema de este método, en base a la metodología expuesta en el informe de validación de mercurio en agua tratada de la Universidad Tecnológica de Pereira, muestra que se debe realizar una curva de calibración, para mediante esta estandarizar o validar lo datos de las muestras que se desea analizar. Teniendo la desventaja que para la determinación adecuada, se debe utilizar mercurio para conocer el estándar de la muestra, siendo este análisis un generador de mercurio, que dependiendo de su disposición final, sea de tratamiento o no, cualquiera de los dos expresa procesos en los que se producirá residuos, tanto del componente en sí como residuos típicos de tratamiento de aguas. (Universidad Tecnologica de Pereira).

Siendo un limitante, el tema económico, puesto que la adquisición de estos equipos y el tratamiento de sus residuos es bastante elevada. Otra investigación que corrobora lo mencionado es la de (Rojas De Astudillo, y otros, 2008).

Dentro del mundo tecnológico y vanguardista, "el estudio afirma haber desarrollado una lámina que, introducida en el agua durante 5 minutos, torna color rojo si detecta presencia de mercurio." (EL MUNDO, 2013), siendo el más eficaz respecto a tiempo pero con considerables limitaciones, puesto que lámina solo determina mercurio no su concentración dentro del medio. Las actividades humanas, en búsqueda de su subsistencia, generan sustancias nocivas para el ambiente. Estas representan la mayor fuente de contaminación conocida, puesto que naturalmente también se generan sustancias que pueden afectar al medio, pero la cantidad y la naturaleza de las mismas no son consideradas riesgosas, o al menos no en consideración a las generadas por el ser humano. Esto se debe a que si bien los contaminantes de origen natural pueden generar daños de gran magnitud a los ecosistemas, su periodo de degradación es corto; siendo esta la diferencia con las sustancias artificiales que por su composición, como asevera Bautista "ingresarán a las redes tróficas y a lo largo de los niveles tróficos se incrementara la concentración de la sustancia". (Bautista Zuñiga, 1999)

Objetivo General

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

Objetivos Específicos

1. Identificar la proteína de sobreexpresión al mercurio, mediante la técnica "SDS PAGE" para la formación del constructo.
2. Construir la cepa bacteriana de *E. Coli* mediante electroporación para la detección del mercurio.

3. Evaluar el biosensor usando diferentes concentraciones de mercurio y comprobarlo 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.

Hipótesis

Ho (Hipótesis nula): Es posible desarrollar un biosensor competente para la detección de diferentes concentraciones de mercurio mediante la transformación de bacterias resistentes al metal.

Ha (Hipótesis alternativa): No es posible desarrollar un biosensor competente para la detección de diferentes concentraciones de mercurio mediante la transformación de bacterias resistentes al metal.

Variable dependiente

Absorbancia

Variable independiente

Concentración del mercurio

4. ESTADO DEL ARTE

4.1. Mercurio (Hg)

4.1.1. Descripción

El mercurio es un metal pesado, a temperatura ambiente es líquido de color blanco plateado, su número atómico es 80 y su peso atómico 200 (Anexo 1). Su mineral principal es el cinabrio. (Londoño, Londoño, & Fabian., 2016). Existen valores acerca de la cantidad de mercurio en diferentes medios de la tierra siendo en los océanos donde existen las mayores reservas del elemento, este se lo encuentra en cantidades de 10^{17} g formando parte de Sulfuro de Mercurio (HgS) principalmente; en la biota terrestre se presentaría en cantidades de 10^{11} g de estos 10^{8} g serían contenidos en la atmosfera, y se encuentra 10^{7}g en fuentes hídricas terrestres. Estos datos no toman en cuenta la cantidad existente dentro de minas. (Gaona, 2004)

4.1.2. Fuentes

Encontramos mercurio en diferentes medios, en su forma natural. Lo podemos encontrar formando parte de la corteza terrestre, y sus vías de transporte a través del ambiente son agua y aire. Se encuentra en la atmósfera en estado gaseoso debido a "la actividad volcánica, los incendios forestales, el movimiento de masas de agua, la erosión de rocas y procesos biológicos." (Poulin & Gibb, 2008)

Respecto de las fuentes antropogénicas (Poulin & Gibb, 2008) respaldados por investigaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), comentan que: "Las fuentes antropógenas comprenden las operaciones de minería, los procesos industriales, la combustión de combustibles fósiles, la producción de cemento y la incineración de residuos sanitarios, químicos y municipales."

4.1.3. Toxicidad

La exposición al mercurio elemental e inorgánico puede darse debido al contacto con materiales para la determinación de temperatura tanto ambiental como corporal que presentan mercurio en sus componentes, se consideran también este grupo a las amalgamas utilizadas en odontología.

Existe también la posibilidad de que los organismos sean expuestos a mercurio por su interacción con ambientes o ecosistemas contaminados debido a actividades que incluyen o extraen mercurio. Esta última viene ligada a la exposición de mercurio orgánico, ya que la vida que se desarrolla en estos medios, forma parte de la cadena trófica, que termina en el ser humano, siendo los principales involucrados microorganismos, flora y fauna. Todo esto debido a la bioacumulacion y la macroacumulación que se da por la dinámica de este elemento. (Poulin & Gibb, 2008)

4.1.4. Límites máximos Permisibles

Los limistes máximos permisible de mercurio es de 0,006 ppm para el consumo humano de acuerdo a la normativa vigente NTE INEN 1108. (Anexo 2)

4.2. Biosensores

4.2.1. Introducción

Según (Garcia, et al., 2012) los biosensores son un sistema analítico compuesto por: un biorreceptor de material biológico, normalmente inmovilizado por enzimas, orgánulos celulares, anticuerpos, o células completas como algas o bacterias, cuya función es servir como sensor biológico del elemento a ser analizado. Este material biológico está acoplado a un sistema transductor, que detecta la señal bioquímica y la transforma en una señal óptica. Se puede apreciar mediante el gráfico de la misma publicación lo explicado:

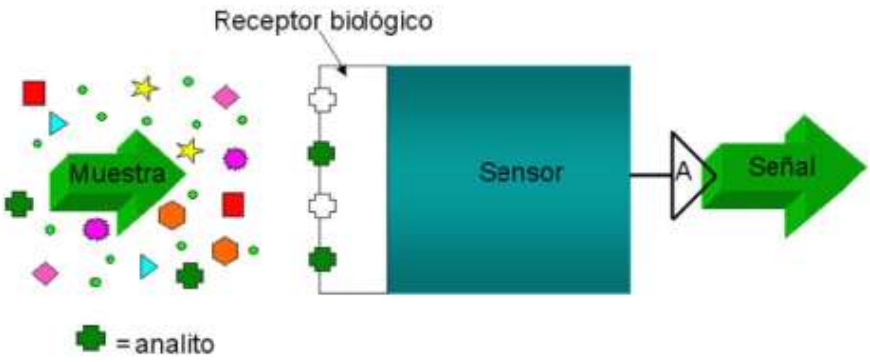


Figura 1 Esquema básico de un biosensor. Fuente: (Garcia, et al., 2012)

Varias publicaciones destacan que el éxito del biosensor dependerá de su resistencia al analito que estudiamos, por lo que se debe evaluar la capacidad de nuestro biorreceptor de asimilar la sustancia tóxica que buscamos determinar. Así lo corroboran (Jiménez & León, 2009) que mencionan que "las características físico-químicas del analito de interés son las determinantes para la elección del material biológico/biomimético, mientras que el tipo de elemento de reconocimiento es el que determina el sistema transductor".

Otra referencia que corrobora lo expresado anteriormente es lo que mencionan García, et al., (2012) en su publicación menciona que la clave para que un biosensor pueda funcionar con éxito dependerá de la actividad celular, la cual debe ser suficientemente sensible a la presencia de un determinado contaminante en la muestra a analizar, pero que no se vea afectado (insensible por las características físico-químicas) generales de dicho medio.

4.2.2. Características

El biosensor ideal es descrito por (Castro, et al., 2007) de la siguiente manera:

- Los biosensores son portátiles y de fácil manejo
- Tiene un bajo costo de producción, operación y mantenimiento
- Alta sensibilidad para ciertos analitos como los xenobióticos con efectos sobre la salud, incluso a concentraciones de partes por billón (μg/L).
- Selectividad Alta, para que el dispositivo interaccione exclusivamente con el compuesto de interés y no con otros. Mediante elementos de reconocimiento específicos.
- Confiabilidad Alta, los sistemas de transducción se diseñan de manera que no puedan ser alterados (o lo sean mínimamente) por la muestra.
- El tiempo de vida largo
- Es capaz de medir en tiempo real o muy corto, posibilitando una actuación rápida, controlando parámetros importantes de manera inmediata y automática. (Castro, Luna, & Villalobos, 2007).

4.2.3. Estructura del operón *mer*

Los operones mer varían en estructura, están constituidos por genes que codifican las proteínas funcionales para transporte (*mer*T , *mer*P y / o *mer*C , *merF*); regulación (*mer*R), y

reducción (*mer*A). En algunos casos, conocida como resistencia al mercurio de amplio espectro, se requieren genes *mer*B adicionales para conferir resistencia a muchos organomercuriales, como metilmercurio y fenilmercurio, al hidrolizar el enlace C-Hg antes de la reducción de Hg^{2+}. En general, los genes *mer*B adicionales se encuentran aguas abajo del gen *mer*A en el operón *mer* (Osborn, Bruce, Strike, & Ritchie, 1997)

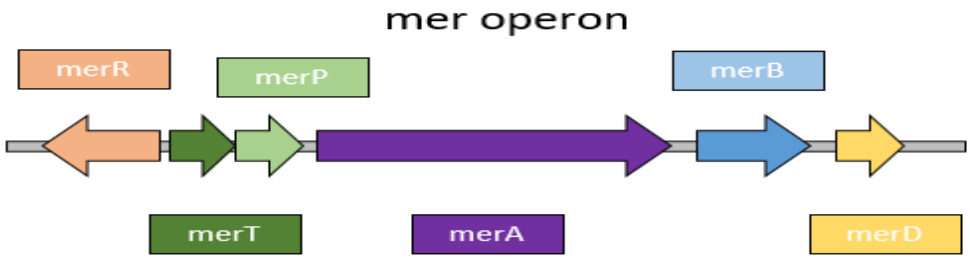


Figura 2 El operón mer incluyendo los reguladores (merR y merD), transportadores (merP y merT), mercúrico reductasa (merA) y organomercurial liasa (merB). Fuente: (Asakiewicz, Schaefer, & Barkay, 2003)

Hay dos clases de resistencia al mercurio: el espectro estrecho especifica la resistencia al mercurio inorgánico, mientras que el espectro amplio incluye la resistencia a los organomercuriales, codificados por el gen *mer*B. El gen regulador *mer*R se transcribe a partir de un promotor que está orientado divergentemente desde el promotor para los otros genes *mer*. *Mer*R regula la expresión de los genes estructurales del operón tanto de manera positiva como negativa. La resistencia se debe a que Hg^{2+} se absorbe en la célula y se administra a la flavoenzima mercúrica reductasa dependiente de NADPH, que cataliza la reducción de dos electrones de Hg^{2+} a Hg^{0} volátil y de baja toxicidad. (Asakiewicz, Schaefer, & Barkay, 2003)

4.3. Mercurio y Resistencia Antibiótica

La contaminación por mercurio puede contribuir a una mayor resistencia a los antibióticos. La expresión combinada de resistencia a los antibióticos y mercurio puede ser causada por la selección, como consecuencia del mercurio presente en un ambiente. Los operones de resistencia al mercurio, que a menudo se encuentran en plásmidos conjugativos y transposones, proporcionan un sistema modelo adecuado para el estudio de la transferencia horizontal de genes en poblaciones naturales de bacterias. Los sistemas de resistencia de plásmidos bacterianos

(gen *mer*) para mercuriales y organomercuriales son los mejores entendidos de tales sistemas en los niveles bioquímicos y genéticos moleculares. (McArthur & Tuckfield, 2000)

4.4. Técnicas de medición de mercurio

4.4.1. Espectroscopia de Absorción Atómica con generación de hidruro (HG-AAS)

El mercurio tiene un efecto tóxico aun en pequeñas concentraciones, por lo cual es necesario saber en términos cuantitativos su presencia. Para esto es importante el uso de la técnica de Espectroscopia de Absorción Atómica con generación de hidruro (HG-AAS) por su elevada precisión, bajos límites de detección y confiabilidad. (Luna, Rodriguez, Quevedo, & Cabrera, 2007)

Esta técnica es las más utilizado para determinar mercurio, (Chaves, 2016); el acoplamiento de un generador de hidruros aporta la sensibilidad requerida. La sensibilidad máxima se adquiere cuando el analito se encuentra en un estado de oxidación particular. Por esta razón: el blanco, las muestras y los estándares deben ser tratados previamente para llevar a todo el analito al estado de oxidación apropiado. (Perkin, 2000)

El límite de detección del mercurio es de 10^{-6} $mg.l^{-1}$ es necesario reducir el Hg iónico a Hg metálico volátil. El principio de este método es la producción mediante reacciones químicas previamente determinadas, de metal en forma atómica o de vapores volátiles de hidruro metálico. Para la determinación de mercurio, el vapor producido es atomizado por una célula dispuesta en una zona calentada por la llama de acetileno, aire en el caso de hidruros o sin la necesidad de calentar. (Martín, 2017)

El vapor metálico es ionizado por un espectrofotómetro de absorción atómica y por medio de la temperatura, dando como resultado la cuantificación del catión por medio de la lectura de su línea espectral característica. (Martín, 2017)

4.4.2. Microscopia Electrónica de Barrido

Método utilizado por (Rojas De Astudillo, y otros, 2008) es el de Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) que consiste en añadir la muestra a una cinta conductora de carbono de doble adhesión y colocar pintura de carbón para mejorar la conductividad de la muestra y la porta muestra, se hace evaporar el carbón amorfo . Posterior se analiza con un microscopio electrónico de barrido, esto se observa mediante electrones retro dispersados (BSE) y micro análisis de Rayos

X (EDS). Viéndose en el método la cantidad de equipos y compuestos químicos que se necesitan para la determinación del elemento, volviendo a los impedimentos económicos y el riego de contaminación.

4.5. Biosensores para detectar Mercurio (Estudios)

Existen investigaciones previas donde han desarrollado estudios sobre biosensores capaces de detectar Mercurio, algunos de los casos se detallaran a continuación:

Un grupo de investigadores del Consejo Nacional de Investigadores Científicas y Técnica (CONICET) de Rosario (Argentina) realizaron un biosensor que permite detectar metales tóxicos como el mercurio, plomo y cadmio en el agua, siendo estos muy tóxicos para el ambiente y la salud humana según la Organización Mundial de la Salud (OMS). Este dispositivo consiste en usar una bacteria modificada en este caso *Escherichia coli*, que al entrar en contacto con los metales tóxicos produce una luz fluorescente. La **s**ensibilidad del biosensor es tan alta que permite detectar estos metales a niveles de partes por billón., cantidades comparables a los niveles máximos permisibles en el agua potable recomendado por la OMS. Una de las desventajas de este biosensor que al momento que se realiza el análisis del agua, el biosensor no es capaz de identificas cuál de los tres metales contiene la muestra. A pesar de esto, los investigadores mencionan que planean elaborar un dispositivo a futuro que permita evaluar las muestras directamente en el lugar de la toma de la muestra. (CONICET, 2005)

Coria & Toro (2012) Elaboraron un biosensor para detectar mercurio en suelo contaminado, en su investigación menciona que el gen lux fue fusionado con el gen mer para inducir mercurio, y posteriormente ser introducido en la bacteria en *Escherichia Coli* (CM2624), las cepas resultantes emiten luz cuando se encuentran en presencia de iones de mercurio. Para la elaboración de este biosensor se trabajó con la fusión de proteínas GST-SmtA, donde se auto-ensamblo una mono capa de ácido tióctico sobre el electrodo de Au. (electrodo de referencia: Ag/AgCl). (Coria & Toro, 2012)

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Lugar de desarrollo de la investigación

Esta Investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología y Reproducción de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra.

5.2. Metodología

5.2.1. Diseño Experimental

Para la presente investigación se realizó un diseño completamente al azar, corroborando la normalidad de los datos, la homogeneidad de varianza mediante la prueba de Levene y la prueba comparativa por pares de Scheffe. Se consideró un control donde la concentración de mercurio seria de 0, y para el límite máximo permisible de 0,006 ppm de concentración de metal se consideró como el 100% y se partió de esto para elevar la concentración al 200%, 400% y 800% como se puede observar en la tabla 1.

Tabla 1.

Descripción de Tratamientos considerados en la investigación

Tratamientos	% de Concentración de Hg	Concentración de Hg
Control	0%	0 ppm
T1	100%	0,006 ppm
T2	200%	0,012 ppm
T3	400%	0,024 ppm
T4	800%	0,048 ppm

Nota. Datos obtenidos por: Santacruz, M.2018 (Autor)

5.2.2. Desarrollo de la experimentación

Para la obtención de resultados y determinación de datos de la variable dependiente que busca la presente investigación se necesitó la ejecución de diversos procedimientos que se describen a continuación:

5.2.2.1. Caracterización de Proteínas resistentes al Mercurio

Se obtuvieron, del laboratorio de Biotecnología y Reproducción de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, la cepa de *Escherichia coli*, misma se describe en la tesis: "Identificación de Proteínas de membrana de bacterias aisladas en un medio enriquecido con Mercurio (Hg) mediante la técnica de SDS Page para la Remoción del Metaloide". Se emplearon cepas cultivadas en caldo LB Borth del fabricante LAB a Neogen Company (Luria Bertani) ®, el cual presentaba una concentración añadida de 0,006 ppm de Hg y sin concentraciones del metaloide para comparar el crecimiento bacteriano. Después del periodo de crecimiento de 24 horas y se procedió a la extracción de las proteínas.

5.2.2.2. Extracción de proteínas de membrana totales

Inicialmente para la elaboración del constructo competente, se realizó la extracción e identificación de proteínas de membrana resistentes al metal estudiado. Este procedimiento es descrito por (Daza, y otros, 2016). Para lo que se obtuvo pellets mediante la Centrifuga Thermo Scientific™ Sorvall™ 8/8R a 3000 g a una temperatura de 4ºC, con la finalidad de que los procesos bacterianos se vuelvan más lentos de lo habitual.

Como paso inicial se resuspendió sedimento bacteriano en 1 ml de buffer TEN (buffer estandarizado por Thermo Scientific™ para el protocolo de extracción de proteínas), mismo que está compuesto por 50 mM de Tris HCL, de pH 8.0; 10 mM EDTA y 100 mM NaCl; 2mg/ml de lisozima y 9 ml de agua a 4ºC. Para lograr una consistencia homogénea entre el sedimento bacteriano y las soluciones se agitó en vortex de Lab International Inc. hasta conseguirlo. Posteriormente se incubó por 30 minutos en hielo. Finalizado el tiempo de incubación se procedió mediante el ultra sonido WiseClean® a romper las células presentes en la solución, para esto se colocó durante 30 minutos a vibración en ultrasonido, seguido por 30 minutos a -30ºC dentro del refrigerador, este par de procesos se repitió durante 3 veces.

Seguido se añadió a la solución 100 µl/ml de DNA asa y $MgCl_2$ 10 mM, de igual forma se homogeneizó mediante vortex, se incubó por 20 minutos en hielo y se centrifugó a 30000 x *g* durante una hora en la criocentrífuga Thermo Scientific™ a 4ºC de temperatura. Al finalizar este proceso se obtuvo y se conservó el sedimento el cual contiene la preparación de membranas totales, el sobrenadante que fue eliminado.

5.2.2.3. Análisis de proteínas mediante la técnica SDS-PAGE

La técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio, conocida por sus siglas "SDS-PAGE" es una metodología de separación de proteínas basado en el peso molecular de las mismas. Esta técnica se la llevo a cabo en una cámara de electroforesis horizontal cargada con buffer TAE 1X, mismo que está compuesto por 40 mM Tris-acetato y 1mM EDTA de pH 8.3 a 25ºC. Se utiliza un casete en el que se coloca el gel y permite que se sumerja en la solución descrita.

El procedimiento es el siguiente:

Se comenzó por la elaboración del gel de acrilamida/bisacrilamida que tiene la función de construir una red compleja por la cual las proteínas se desplazan al momento de la aplicación de carga eléctrica; este se preparó de tal forma que contenga un gradiente de desnaturalización mismo que presentaba concentración baja de 10% en la parte inicial del gel, e iría en aumento hasta una concentración 40% en la parte final del gel. Se utilizaron soluciones stock que se detallan en la tabla 2.

Tabla 2.

Preparación de las soluciones stock de SDS - PAGE.

Soluciones Stock	**10%**	**40%**
Acrilamida/Bisacrilamida	20 ml	9 ml
SDS (1X)	-	7.5 ml
Agua destilada	-	13.5 ml
TEMED	20 µl	10 µl
APS	200 µl	300 µl

Nota. Recuperado de "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, A, (2017)

De cada solución stock se utilizó 20 ml, contenidos en tubos cónicos tipo "FALCON" enrollados con papel aluminio con la finalidad de evitar de prevenir que las soluciones tengan reacción a la luz a fin de evitar su solidificación debido a su naturaleza fotosensible.

Cabe resaltar adición de un detergente anfipático denominado SDS el cual cumple con la desnaturalización de las proteínas de interés con la finalidad de que estas rompan su estructura tridimensional y se vuelvan lineales, conjunto el detergente les otorga una carga negativa logrando la separación según su peso molecular.

Habiendo colocado las soluciones stock ya descritas se dejó que estas se polimericen hasta lograr la consistencia del gel durante 40 minutos. Prosiguiendo, mediante la utilización de una jeringa de marca Hamilton®, en el primer pocillo del gel se colocó 5 µl del indicador de peso molecular BenchMark™ Protein Ladder, a continuación fueron colocándose en los pocillos restantes 13 µl compuestos de: 10 µl de cada muestra de proteína añadido 3 µl de Blue/Orange Loading Dye 6x, como buffer de carga.

Habiéndose colocado las muestras se tapó la cámara de electroforesis, y se conectó los electrodos a la fuente energía. Para la corrida de la electroforesis se seteó a voltaje de 140 voltios y 500 Amperios, esta corrida se la dejó durante dos horas y diez minutos.

Al concluir el tiempo de corrida se procedió a teñir el gel mediante la utilización de 15 ml de azul Coomassie G-250, se esparció la mezcla mediante jeringa quirúrgica estéril para esparcirla y se dejó en reposo por 60 minutos en cuarto oscuro. Al finalizar se procedió a lavar el tinte del gel con agua destilada para colocarlo en el transiluminador UV LabNet™ Inc. con la finalidad de observar las bandas que formo la electroforesis de las proteínas. Estas bandas se fotografiaron con la cámara digital SONY® DSC-HX400V de 20.4MP a fin de registrar los patrones de bandas que generó cada muestra para su subsiguiente análisis informático.

5.2.2.4. Elaboración del plásmido

Para la fabricación del plásmido se buscó en la base de datos de genes de NCBI (National Center for Biotechnology Information) las secuencias de: *luxA*, el cual permite la emisión de luminiscencia y el operon *mer*, el cual otorga la resistencia al mercurio.

Mismas que se sintetizaron mediante MACROGEN Inc Korea, lo que proporciono como resultado del plásmido pTOP Blunt V2.

5.2.2.5. Inserción del plásmido por electroporación

5.2.2.5.1. Preparación de material

Previo a la transformación de las células competentes se prepararon 6 cajas petri con agar LB BD® LB Agar Miller (Luria-Bertani), escogido por presentar los nutrientes suficientes para permitir el desarrollo de *Escherichia Coli*, se calculó la cantidad de agar necesario mediante las indicaciones del fabricante las cuales indican que la cantidad de agar para disolver es de 40 gr por cada 1000 ml de solución. Por tanto, se calculó para que en cada una las cajas se dispensará 20 ml, siendo así un total de 120 ml de solución preparar, para lo cual se necesitó 4.8 gramos de agar. Se

homogeneizó en un frasco boeco para su posterior esterilización mediante autoclave ican CLAVE conjuntamente con las cajas Petri.

Habiéndose culminado el proceso de esterilización se trasladó el material e insumos a una cámara de flujo misma dentro de una habitación previamente esterilizada con Tego 51, cloro (CLOROX) y alcohol etílico al 95%, de igual forma se lo hizo con la cámara de flujo la cual además de la limpieza mencionada se mantuvo bajo luz UV durante 30 minutos. Con la finalidad de mantener la asepsia durante todo el proceso.

Se esperó que el Agar LB disminuya su temperatura a por lo menos 37ºC, misma que suele presentarse a los 20 minutos. Esta temperatura es adecuada para la adición de ampicilina Ampibex 250 mg, la cual debe presentar en solución la concentración 100 µl por cada ml. Se determinó esta cantidad de adición considerando que la ampicilina presenta una concentración de 250.000 mol, se utilizó el siguiente cálculo:

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

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

$$V1 = \frac{100 * 120}{250000}$$

$$V1 = 0.048\, ml$$

Donde:

C1: es la concentración que presenta la ampicilina de 250.000 mol
V1: es el volumen de ampicilina de concentración 250.000 mol que debemos tomar para obtener la concentración adecuada para la investigación.
C2: es la concentración de amplicilina deseada de 100 µl por cada ml
V2: es el volumen total del Agar LB

Se transformó los iniciales 0.048 ml a tomar de ampicilina a facilitar el absorber la misma mediante las micropipetas, por lo que el volumen final a tomar es de 48 µl.

Una vez que se añadió la ampicilina, se procedió a dispensar el Agar LB en las cajas petri, cuidando que el volumen sea el de 20 ml por caja mediante una probeta previamente esterilizada. Esperamos hasta que el agar se solidifique para añadir X-Gal Thermo Scientific™ este se prepara a partir de 40 mg en un ml de agua destilada del cual se dispenso 40 µl por cada caja petri, cuidando que se distribuya homogéneamente.

5.2.2.5.2. Transformación física

Para la transformación física se utilizó el método de electroporación descrito por (Gonzales, Brooks, Pukatzki, & Daniele, 2016) el cual recomienda que las células competentes deben mantenerse en temperatura de -80ºC, esto se lo hizo en congelador Thermocientific™, por lo cual para proceder con la transformación, se aumentó gradualmente la temperatura de estas colocándolas en un refrigerador cuya temperatura es de 4ºC a fin de que el estrés provocado por el cambio de temperatura sea mínimo, asegurando la viabilidad de las bacterias durante el proceso. Por lo que este proceso se realizó de igual forma con el plásmido de MACROGEN.

En un tubo eppendorf con capacidad de 10 a 100 µl, se tomó mediante micropipeta 20 µl de células competentes y 5 µl de plásmido. Esta mezcla se colocó por un lapso de 2 a 5 segundos en una micro centrifuga con la finalidad que esta mezcla se homogenice. Se dejó reposar la mezcla en hielo.

Paralelamente se preparó y seteo el equipo de electroporación Neon Device, el cual debe ser seteado a 2500 voltios durante 4 milisegundos y dos pulsaciones, esto especificado por (Gonzales, Brooks, Pukatzki, & Daniele, 2016) quienes mencionan que esta configuración es adecuada para la transformación en *Eschericha coli*. Respecto a los dispositivos que necesita el equipo se conectó el Neon Pipette Station en el cual se coloca la Neon Tube, que es una cubeta especial para esta transformación, misma en la cual se vierten 3 ml de Electrolytic Buffer que cumple la función de tampón electrolítico. Estos generan el medio eficiente para realizar la transformación del plásmido a las células competentes. Es importante que este medio mantenga una temperatura de 2 a 4ºC especificado en el protocolo del equipo de (Invitrogen, 2014).

A continuación mediante la Neon Pipette se tomó 10 µl de la mezcla del plásmido y las células competentes, se cuidó que al succionar esta mezcla mediante las Neon Tips, no existan espacios de aire o burbujas, esto debido a que son factores que no permiten que se dé una eficaz transformación. Se llevó la Neon Pipette a la estación previamente preparada y se dejó correr el equipo, el cual tarda pocos segundos en completar la transformación, esto cuando se evitó los factores ya mencionados, de lo contrario se tuvo que repetir el proceso con una nueva mezcla.

La mezcla transformada se colocó en 1 ml de S.O.C médium de Thermocientific™ dispuestos en un tuvo falcon de mayor capacidad. Este se dejó incubar durante una hora a 50 rpm (revoluciones por minuto) a una temperatura de 37ºC en la Incubadora Shaking NB-205LN_BIOTEK® con la finalidad de contrarrestar el estrés al que se sometió a las células competentes en el proceso de la transformación. Habiéndose cumplido el tiempo de incubación, se dispenso 100 µl de la mezcla células-S.O.C. en las cajas Petri preparadas, se selló con parafilm y se las llevó a incubación durante 48 horas para esperar resultados, cuidando que la temperatura no rebase los 37ºC.

5.2.2.5.3. Transformación celular y preparación del biosensor a diferentes concentraciones

Al haberse transcurrido las 48 horas de la incubación, se observó las características de las UFC´s (Unidades Formadoras de Colonias), siendo el color de estas el indicador de una adecuada inserción del plásmido cuando son colonias blancas o lo contrario cuando las colonias son azules.

Se seleccionó tres de las colonias de color blanco considerando las mejores características morfológicas tales como su forma, tamaño, borde, consistencia y estructura; para ser sembradas en caldo con concentraciones de Hg. Se trabajó con concentraciones de: 0; 0,006 ppm (límite máximo permisible para consumo humano); 0,012 ppm; 0,024 ppm y 0,048 ppm.

Para ello en un frasco boeco se preparó caldo LB (Luria Bertani) de LAB a Neogen Company LB Broth, (Luria Bertani) ®, del cual según las indicaciones del fabricante se debe disolver 25 gr por cada 1000 ml de solución, siendo así que se disolvió 0,75 gr en 30 ml de agua destilada UltraPure™ DEPC buscando que se disuelva completamente de forma homogénea. Este se dispensó en 3 tubos de ensayo, 10 ml en cada uno, se taparón son algodón y se llevó al Autoclave

ican CLAVE para esterilizarlos, seteandola a 121ºC a 1.5 atmósferas de presión durante 45 minutos.

Tanscurrida la esterilización, se sembró en los tubos las tres UFC's ya seleccionadas. Esto se realizó buscando un ambiente estéril mediante la limpieza de la mesa de trabajo y la emisión de calor del mechero de bunsen, buscando controlar la posible contaminación de los tubos. Estos tubos se encubaron a 37ºC por 24 hora, posteriormente se comprobó su crecimiento mediante la presencia de turbidez como indicador. Se prepararon 3 nuevos tubos esteriles en los cuales se buscó que exista 0,006 ppm de concentración de Hg, y a estos se les adiciono 1 ml de los tubos sin concentración de Hg y se repitió el proceso de incubación y se guardó los tubos iniciales en refrigeración para detener los procesos metabólicos naturales de las bacterias.

A las 24 horas se revisó el crecimiento de los tubos incubados y se comprobó mediante el transiluminador UV LabNet™ Inc. la presencia o no de luminiscencia comparándola con los tubos refrigerados. Al notarse diferencia se prepararon nuevos tubos para concentraciones de 0,012; 0,024 y 0,048 ppm cumpliendo con el diseño las repeticiones por cada tratamiento.

5.2.2.6. Análisis de Mercurio por metodología de Espectrofotómetro de microplacas.

Con la finalidad de la determinación de absorbancia y concentración de Hg se utilizó la UltraCruz® Tissue Culture Platese, 96; que es una microplaca con 96 pocillos para la determinación por el equipo EPOCH. Se agregó 100 µl en los pocillos de lo siguiente: agua destilada (Blanco), caldo LB estéril, bacterias transformadas sin concentración de Hg (Control) y, los tratamientos por triplicado con concentraciones de Hg de: 0,006 ppm (límite máximo permisible para consumo humano); 0,012 ppm; 0,024 ppm y 0,48 ppm.

Mediante un Espectrofotómetro de Microplaca EPOCH™ de Biotec Instruments, se obtuvieron los datos de absorbancia de las soluciones especificadas, las cuales se obtuvieron por la utilización del programa informático para análisis de datos Gen5™ Software. (BioTek, 2017)

5.2.2.7. Análisis de Mercurio por Espectroscopia de Absorción Atómica por Generador de Hidruros.

El equipo utilizado para el análisis fue el Espectrofotómetro de Absorción Atómica SenseAA© de GBC Scientific Equipment.

Para la determinación de la concentración presente en las muestras generada por el metaloide, se aplicó la metodología de generación de hidruros obteniendo la absorbancia de muestras con lo que se calculó las concentraciones finales de cada muestra.

Inicialmente se elaboró la curva de calibración para la que se preparó solución de Ácido Clorhídrico (HCl) con concentración 3 molar y de Bromuro de Sodio (NaBr). Se ubicó en el EAA la lámpara de Hg, se corrió el

El proceso se lo realizó por generador de hidruros para esto se preparó las soluciones una de ácido clorhídrico (HCl) 3 molar y Bromuro de sodio se colocó la lámpara de mercurio y se procedió a realizar la curva de calibración para realizar las mediciones de las muestras, luego de esto se realizó los estándares con los que se trabajó que fueron, 6, 12, 25,50 ppb, con esto se procedió a la medición de cada una de las muestras ,con este proceso se obtuvo los resultados de concentración inicial y final.

- El ajuste de la lámpara de Mercurio (Hg):
    - Corriente de la lámpara (mA): 3.00
    - Longitud de onda (nm): 253.7
    - Amplitud de la abertura (nm): 0.5

5.2.2.8. Método de Control – Tinción Gram

Con la finalidad de avalar que las células transformadas no presentan contaminación se realizó esta técnica, considerando que las bacterias de *Escherichia coli* son de características Gram Negativas.

Inicialmente se colocó sobre portaobjetos una gota de agua destilada, a este se añadió mediante un asa bacteriológica una de las UFC’s transformadas. Mediante mechero se evaporó el excedente líquido cuidando que la muestra no se queme, logrando así la fijación de la colonia, a esta se la tiño mediante Cristal Violeta durante 45 segundos, se eliminó el exceso del colorante mediante agua destilada, prosiguiendo se adicionó unas gotas de lugol durante 45 segundos y se volvió a eliminar el excedente. Se repitió el proceso con safranina para finalmente colocar un cubre objetos y observar.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Identificación de proteína de resistencia al Mercurio.

El resultado de la electroforesis en gel de poliacrilamida de SDS PAGE, constató la presencia de la proteína resistente a Hg (*MerT*) y la proteína reductora de mercurio (*MerA*), esto evidenciado en la figura 3 mismas que se corroboran debido a la sobre expresión identificada en la secuenciación de las bandas de mayor representación.

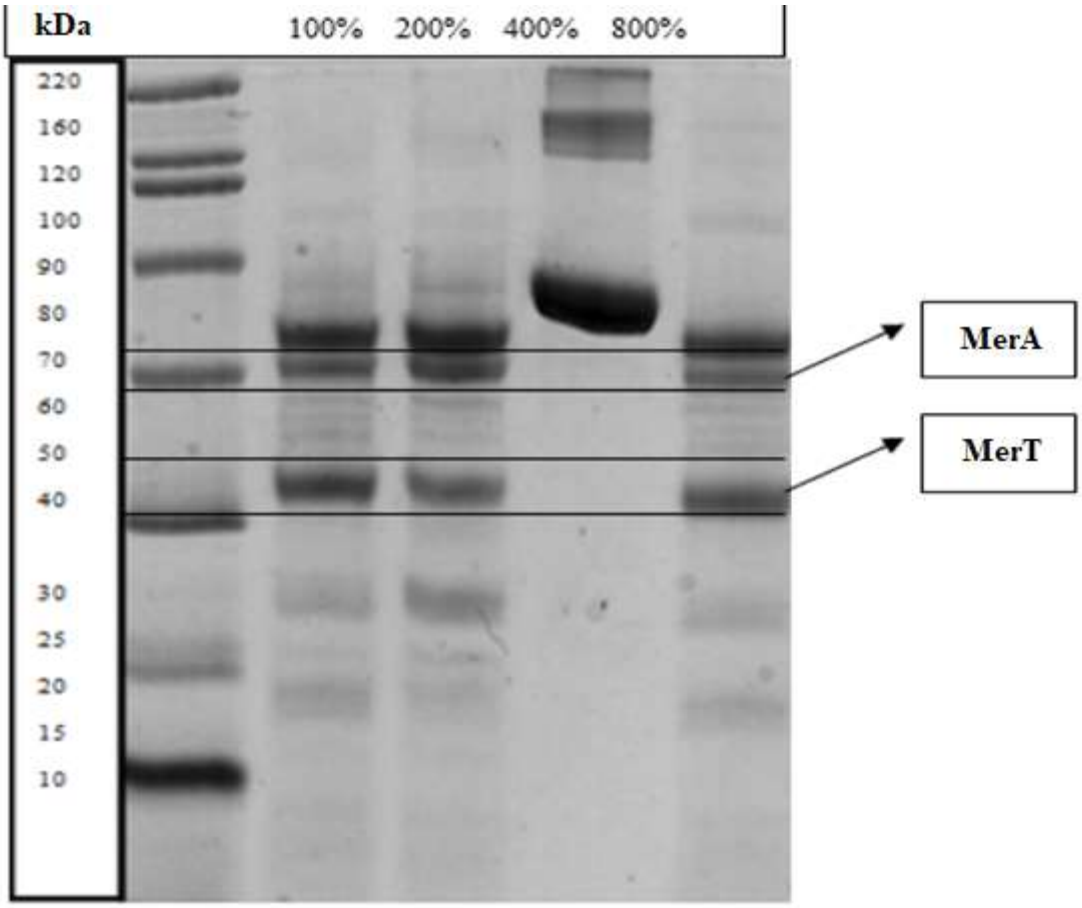


Figura 3 Electroforesis en gel SDS PAGE con gradiente de denaturalización (10%-40%).Fuente: *(MACROGEN Inc, 2018)*

Con respecto a la presencia de la proteína *MerA*, mediante la investigación de (Guerrero & Ortíz, 2013), se corrobora que las proteínas que permiten la codificación de transformación de mercurio en ciertas bacterias es otorgada por las proteínas *MerA* y *MerB*, estas cumplen la función de regulación del metaloide y conjuntamente permiten la degradación de Hg, asimismo (Torres, 2015), evidencia que el sistema del operon *mer* inicialmente se da a partir de la proteína de membrana MerT mismo que permite el paso del metaloide iniciando el proceso de transporte

efectuado por la proteína *MerP* misma que culmina en la proteína encargada de la reducción del metal *MerA*. En la figura 4 (Castillo, y otros, 2005) representan el sistema de resistencia al mercurio en bacterias Gram negativas.

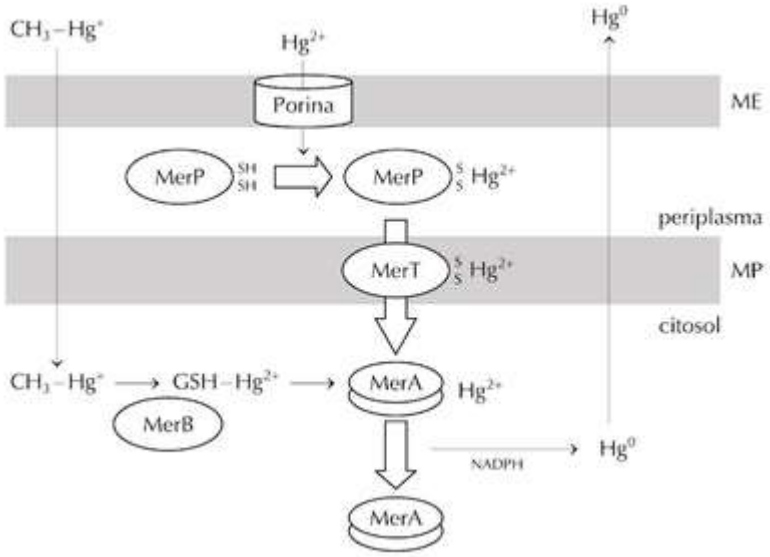


Figura 4 Mecanismo molecular de la resistencia a mercurio en bacterias. MP (membrana plasm
(membrana externa); GSH (glutatión reducido). Fuente: (Castillo, y otros, 2005)

Las bacterias tienen la capacidad de perfeccionar distintos mecanismos básicos, los cuales las vuelven capaces de adaptarse a un medio en el cual exista presencia de metales, esto es factible gracias a la existencia de diferentes operones generados por las bacterias dependiendo de su necesidad, en el caso específico del mercurio es dado por el operon *mer*, el cual está representado gráficamente en la figura 5, siendo así que las bacterias identificadas gracias a la electroforesis en gel SDS PAGE concuerdan con las detalladas por (Castillo, y otros, 2005; Salazar, 2013), siendo de las principales dentro del sistema del operón.

Recientes investigaciones mencionan y definen genes de resistencia a metales, por mencionar algunos: cromo, plata, cobre, cadmio, zinc, mercurio, níquel y arsénico. Estos han sido ubicados dentro de plásmidos; gracias a estos descubrimientos, se devela la importancia de los plásmidos en la elaboración de diferentes tecnologías relacionadas a los metales mencionados, ya que estos contienen información a nivel de genes capaz de ser transferida a otras células, misma que puede conjugarse dependiendo de la necesidad de adaptación de las células al medio que ha sido contaminado con metales, siendo así que además se puede utilizar esta capacidad para la elaboración de diferentes tecnologías, mencionado por (García-Balboa, Costas, & López Rodas,

2012). Gracias a esto se corrobora la eficiencia de un plásmido al momento de modificar una bacteria, con el fin de que las proteínas de este permitan a la bacteria modificada resistir diferentes concentraciones de metales.

En general, las proteínas que otorgan resistencia a los metales son codificadas gracias a determinantes genéticos mismos que se encuentran formando parte de los cromosomas, dentro de ciertos elementos móviles tales como los transposones o plásmidos, y muchas de las veces en los dos. Cuando se refiere a resistencia a metales, esta es otorgada por determinantes plasmídicos, los cuales presentan alta especificidad, que es comparada resultados que han sido codificados por genes participan en procesos de metabolismo celular y también conforman, en algunas ocasiones, sistemas inducibles. (Salazar, 2013)

6.2. Ensamblaje del plásmido

Se adquirió el plásmido de la compañía de Biotecnología "Humanazing Genomics ©MACROGEN Inc.", la cual lo ensambló a partir de las secuencias de genes identificadas mediante la electroforesis (*merA, merT*) incluyendo la secuencia de la proteína periplasmática (*merP*) para completar, además de *luxA* para generar la respuesta óptica del sensor. Siendo el resultado la síntesis genética descrito en la tabla 3.

Tabla 3.

Características de la Secuencia del Plásmido

Tamaño del Gen	1,377 bp
GC %	49.15%

Nota. Datos obtenidos de la descripción técnica del plásmido descritos por (MACROGEN Inc, 2018)

El resultado del ensamblaje de las secuencias de genes produjo un plásmido con tamaño de 1,377 pb y un porcentaje de G+C de 49.15%.

6.2.1. Vector: pTOP_Blunt_V2

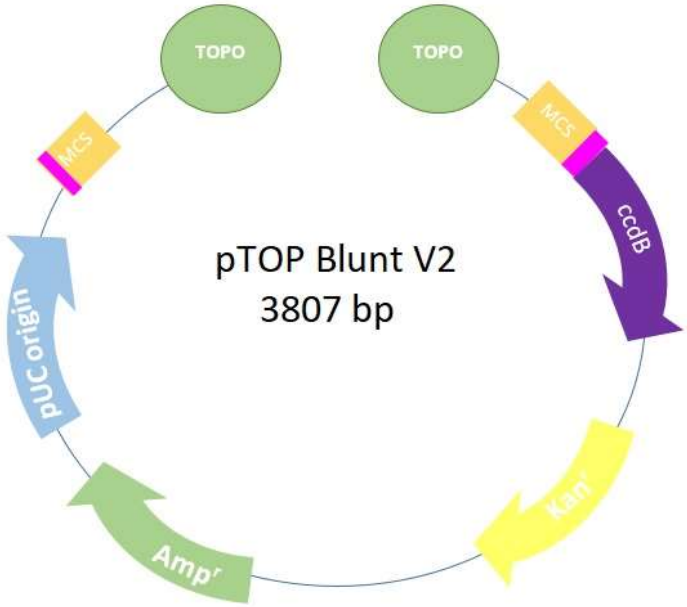


Figura 5. Mapa esquemático del plásmido pTOP Blunt V2 (3807) Una molécula de topoisomerasa (TOPO) se acopla covalentemente a los 3 extremos dúplex en las posiciones nt 294 y 295 de pTOP Blunt V2. Por lo tanto. pTOP Blunt V2 puede formar un enlace covalente con productos de PCR de los extremos finales mediante Pfu DNA polimerasa. Fuente: (MACROGEN Inc, 2018)

6.2.2. 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 Inc, 2018)

6.3. Electroporación-Expresión

Habiendo culminado el proceso de incubación, posterior al de electroporación, se verificó la presencia de cepas transformadas en base a la expresión de coloración blanca gracias al X-Gal, en base a esto (Serrano-Rivero, Hernández-García, & Fando-Calzada, 2013) detalla dentro del

procedimiento utilizado en su investigación, que el tiempo ideal de incubación a fin de presenciar la existencia de colonias es de 24 horas. A pesar de esto, la experimentación realizada para la presente investigación determinó que el tiempo ideal en el cual se generan UFC es de 48 horas, esto debido al estrés generado por el proceso al que se somete a las bacterias para su transformación el cual incluye además de la transformación genética, altos voltajes y bajas temperaturas; causando un alto estrés a las mismas, por lo cual el tiempo de estabilización es mayor. Eso corroborado por (Salvucci, 2010) el cual afirma que el tiempo de desarrollo de las células está relacionado directamente a las condiciones genéticas, de ambiente, de nutrición y tratamientos sometidos al cual se somete a las células durante la experimentación con las mismas, siendo estos los factores que alteran el tiempo en el que las bacterias pueden generar colonias.

Se seleccionaron tres colonias formadas por biosensores, a las que se probó su tolerancia a mercurio, esto se realizó mediante siembra en un medio de cultivo con diferentes concentraciones de metal.

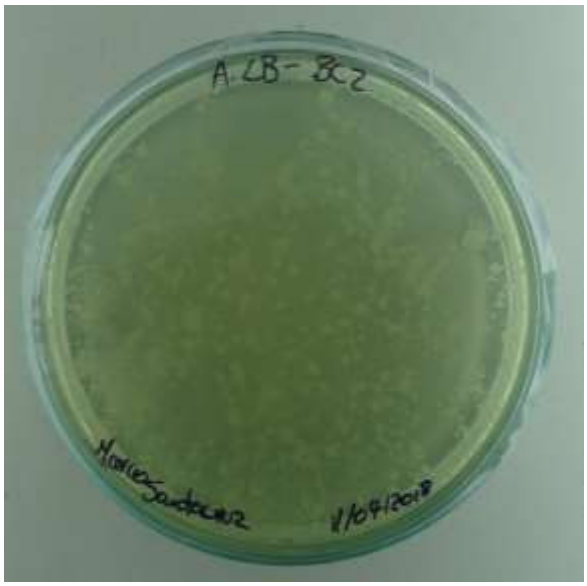


Figura 6 Cepas transformadas mediante Electroporación. Fuente: Santacruz, M. 2018 (Autor)

Se sembró los biosensores bacterianos en medios de cultivo de agar LB con adición de diferentes concentraciones de mercurio las cuales fueron: 0ppm; 0,006ppm (límite máximo permisible para el consumo humano según la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1108); 0,012ppm; 0,024ppm; 0,048ppm. Mediante las concentraciones mencionadas se realizó el ensayo de efectividad del biosensor, comprobándose su resisntencia y cuantificándose la respuesta óptica del mismo ante la interacción con el metaloide en el medio. La investigación de (Saénz & Nevárez,

2010) postula la sensibilidad de expresión, regulación génica y una medición simple de la expresión del gen luciferasa.

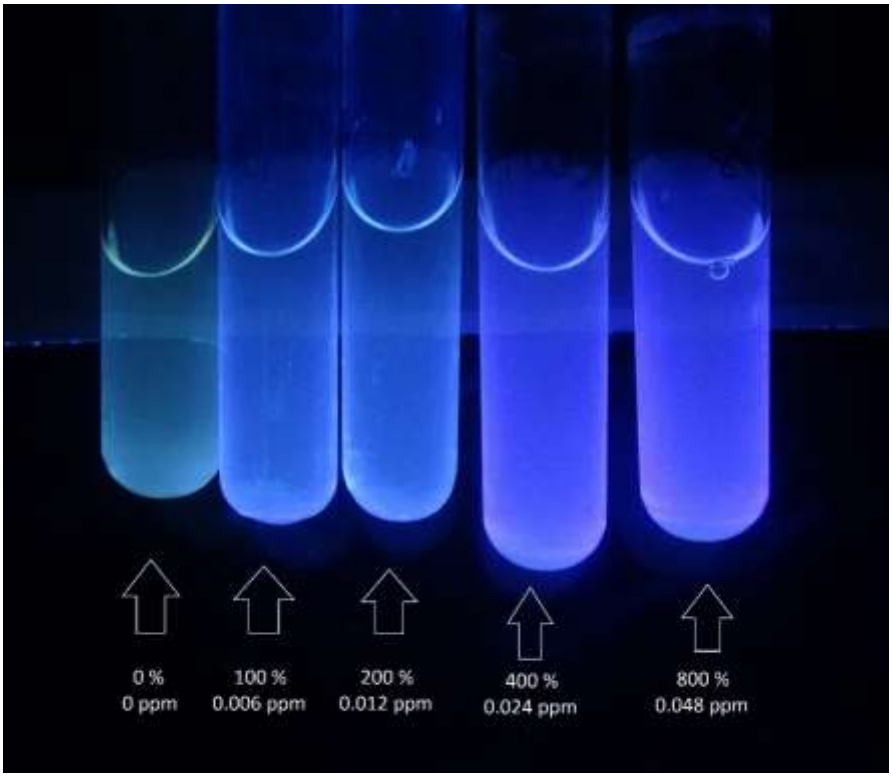


Figura 7 Expresión del biosensor a diferentes concentraciones de mercurio Fuente: Santacruz, M. 2018 (Autor)

La evaluación cualitativa del biosensor a las diferentes concentraciones de mercurio (Figura 7) demostró que existe variación entre las intensidades de luminiscencia entre concentraciones, siendo que medida que aumenta la concentración la intensidad de luminiscencia disminuye y en las concentraciones más altas se nota cierta opacidad.

En la investigación realizada por (Nunes-Halldorson & Duran, 2003) analizan la acción del gen lux dentro del desarrollo de biosensores de células completas que tienen una amplia gama de aplicaciones ambientales. Estas aplicaciones incluyen la construcción de biosensores para la detección de contaminantes, incluyendo en esta la medición de la concentración del contaminante.

Adicionalmente (Chatterjee & Meighen, 1995) describen la acción de bacterias bioluminiscentes las cuales se han modificado genéticamente, a fin de colocar una construcción génica *lux* bajo el control de un promotor inducible, resultando así en biosensores que pueden ser extremadamente útiles en estudios de biorremediación.

(Hastincterags & Nealson, 1981) desarrollaron un bioensayo para evaluar la biodisponibilidad de naftaleno y salicilato en suelos contaminados. Utilizaron la bacteria genéticamente modificada *Pseudomonas fluorescens* HK44 que porta el plásmido informador *nah-lux* capaz de degradar tanto salicilato como naftaleno, demostrando la aplicación útil de un promotor para la inducción de la expresión de luminiscencia de los biosensores.

Del mismo modo, (Selifonova, Burlage, & Barkay, 1993) construyeron un biosensor usando fusiones del operón de resistencia al mercurio Tn21 (*mer*) con luxCDABE. Este biosensor *mer-lux* demostró la detección semicuantitativa de Hg (II) inorgánico en agua natural en el rango de 0.1 a 200 ppb, siendo así que hay registros de la eficacia de la elaboración del plásmido con genes *mer-lux* para la identificación de diferentes concentraciones y que además las concentraciones estudiadas por Selifonova, et al concuerdan con las de la presente investigación.

6.4. Análisis cuantitativo en Espectrofotómetro de Microplacas EPOCH y Espectroscopia de Absorción Atómica

Una vez determinada la viabilidad del biosensor mediante la expresión cualitativa, se procedió a la cuantificación de las concentraciones a las cuales fue expuesta la cepa de *Escherichia coli* transformada, misma que fue expuesta a diferentes concentraciones del metaloide por triplicado a fin de obtener un valor promedio de concentración real. Los resultados descritos en la tabla 4, demuestran una estrecha diferencia entre la concentración teórica y las obtenidas por medio de la cuantificación de la absorbancia de los diferentes métodos, generando además un error promedio de 0,52% entre los métodos.

Tabla 4.

Cuantificación de mercurio (absorbancia y concentración) mediante Espectrofotómetro de microplacas EPOCH y Espectroscopia de Absorción Atómica en Generador de Hidruros

Concentración Teórica (ppm)	absorbancia EAA	Concentración Real - EAA (ppm)	Absorbancia EPOCH	Concentración Real-EPOCH (ppm)	% Error
0.006	0.281	0.0058	0.180	0.0057	2.285
0.012	0.356	0.0117	0.210	0.0118	-0.934
0.024	0.507	0.0234	0.266	0.0230	1.474
0.048	0.809	0.0468	0.384	0.0471	-0.767
				Error Promedio	0.515

Nota. Datos obtenidos por análisis en laboratorio por Santacruz, M. 2018 (Autor)

La valoración de las muestras demostró la relación directamente proporcional entre los valores de la absorbancia y la concentración, para corroborar la relación se realizó el gráfico de tendencia elaborado en base a los datos obtenidos mediante Espectrofotómetro de microplacas EPOCH (figura 8) y Espectroscopia de Absorción Atómica (figura 9). Siendo así que el coeficiente R^2, en los dos análisis gráficos resultó en 1.

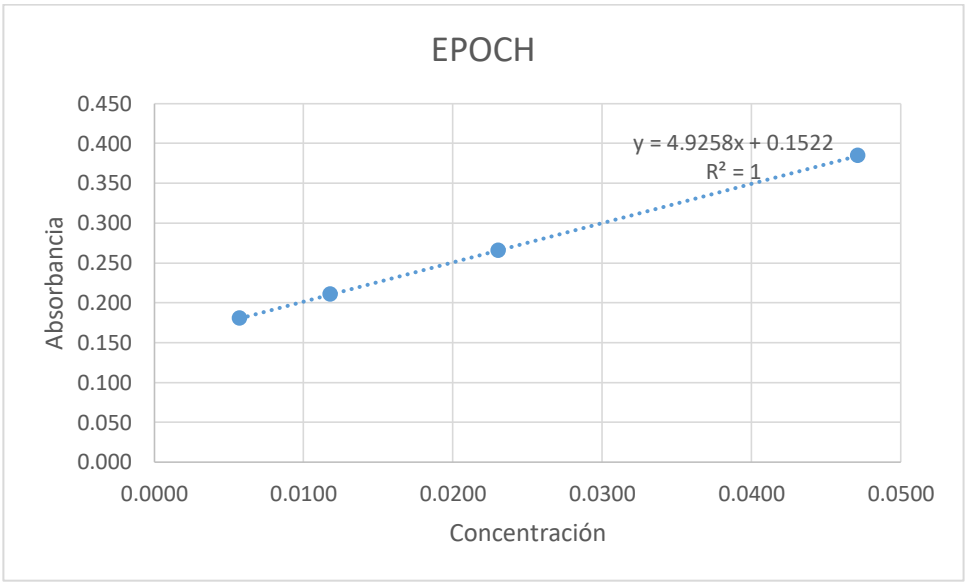


Figura 8 Línea de tendencia de Absorbancia de diferentes concentraciones de mercurio medidas por Espectrofotómetro de microplacas *EPOCH.* Fuente: Santacruz, M. 2018 (Autor)

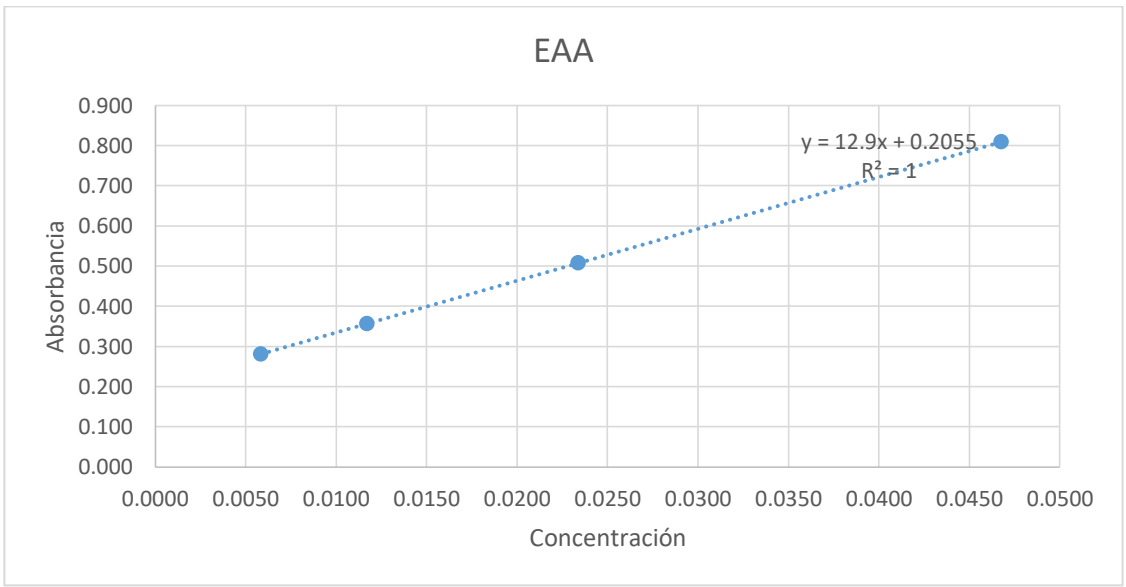


Figura 9 Línea de tendencia de Absorbancias y Concentraciones de mercurio medidas por Espectroscopia de Absorción Atómica. Fuente; Santacruz, M. 2018 (Autor)

6.5. Análisis estadístico

A fin de corroborar los datos obtenidos por los métodos cuantitativos, se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk para determinar la normalidad de los datos, la prueba estadística para homogeneidad de varianza de Levene, se aplicó un el análisis de varianza de un factor y mediante esta se aplicó la prueba de comparativa de Scheffe, debido a que no se busca determinar la comparación de efectividad de los tratamientos estudiados sino del biosensor en sí ante las diferentes concentraciones. Esto se lo realizó mediante el programa estadístico STATISTIX 10.

6.5.1. Análisis de los datos de Absorbancia obtenidos por Espectrofotómetro de microplacas.

6.5.1.1. Gráfico de Distribución Normal

Se aplicó la prueba Shapiro-Wilk, para verificar la distribución normal de los datos de absorbancia obtenidos por Espectrofotometría de microplacas, estos datos generaron un valor P (significancia) de 0,9823. A esto mediante lo descrito por (Spiegel, 1990) indica que existe normalidad en los datos, basado en que para la aceptación de normalidad el valor de la significancia debe ser mayor a 0,05. Siendo esto comprobado por el grafico elaborado mediante el programa estadístico STATISTIX versión 10.0.1 (figura 10) el cual evidencia la normalidad de los datos para las diferentes absorbancias obtenidas en el análisis de las muestras de diferentes concentraciones.

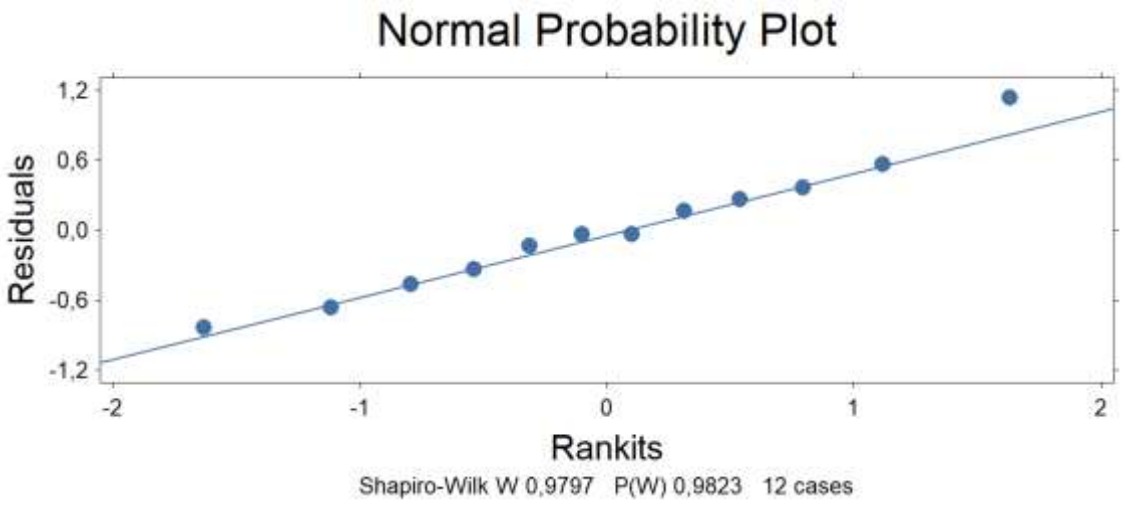


Figura 10 Distribución Normal de la Absorbancia por Espectrofotometría de microplacas. Fuente: Santacruz, M. 2018 (Autor)

6.5.1.2. Homogeneidad de Varianza

Se aplicó la prueba de Levene para determinar la homogeneidad y confiabilidad de los datos de absorbancia. Los resultados del análisis se detallan en la tabla 5.

Tabla 5.

Resultados de las pruebas de Homogeneidad de Varianza.

	F	**P**
Prueba de Levene	2,40	0,1431

Nota. Datos obtenidos por el programa STATISTIX 10 por Santacruz, M. 2018 (Autor)

Mediante lo mencionado por (Spiegel, 1990) se determina la homogeneidad de los datos, dado que el valor de significancia obtenido P=0.1431 es mayor que el típicamente utilizado en el análisis de homogeneidad de varianzas que es de 0.05. Estos resultados y la comparación muestran que los datos presentan homogeneidad respecto del promedio total, a pesar de que los tratamientos son de diferentes concentraciones, esto además se puede corroborar mediante la figura 11 en la cual se muestra como los datos se distribuyen respecto de la línea promedio de la comparación de concentración versus absorbancia.

6.5.1.3. ADEVA

Se realizó un análisis de varianza de un factor para determinar la variabilidad en los datos de absorbancia, obtenidos mediante Espectrofotometría de microplacas, al someter al biosensor a las diferentes concentraciones de mercurio. Con la finalidad de corroborar la eficiencia del mismo, más no una comparación respecto cuál de los tratamientos funciona mejor, puesto que el objetivo de la investigación es determinar la viabilidad del biosensor.

Tabla 6.

Análisis de Varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	F	P	Valor crítico para F
Entre grupos	0.003005048	3	584.47	1.0452E-09	4.066
Dentro de los grupos	1.37106E-05	8			
Total	0.003018759	11			

Nota. Datos Obtenidos por el programa STATISTIX 10 elaborado por Santacruz, M. 2018 (Autor)

El análisis de la tabla 6, mediante la comparación del valor de F calculado de 584.47, con el valor crítico de distribución F (0,05), considerando los grados de libertad entre grupos y dentro de los grupos (Anexo 4), se determina el valor de 4.066. Con lo que se pude determinar gracias a lo expuesto por (Spiegel, 1990) que al ser nuestro F calculado mucho mayor al valor crítico se demuestra que no existe igualdad entre las medias de las variables, siendo así que se corrobora lo analizado mediante la prueba de Levene.

6.5.1.4. Prueba de pares comparativos de Scheffe

Habiéndose corroborado que ante cada concentración la media de absorbancia difiere para cada tratamiento, se realizó la prueba de Scheffe con la finalidad de demostrar la eficiencia del biosensor ante las diferentes concentraciones, recalcando que no se comparó la eficiencia de un tratamiento sobre los otros debido a que el sistema actúa dependiendo de la concentración.

Tabla 7.

Resultado de la prueba de Scheffe

Tratamientos	Promedio	Grupo Homogéneos
T4	0.3843	A
T3	0.2657	B
T2	0.2103	C
T1	0.1803	D

Nota. Datos obtenidos por el programa STATISTIX 10 elaborado por Santacruz, M. 2018 (Autor)

La tabla 7 muestra los promedios de absorbancia de cada tratamiento, mismos que se comparan con la magnitud de la tabla para crítico de distribución F (Anexo 4) para los grados de libertad obtenidos por el análisis de varianza que es de F=4.066 por lo que se evidencia que cada tratamiento mantiene valores inferiores al crítico por lo que (Spiegel, 1990) menciona que dados los datos el mejor tratamiento sería el T4 de concentración 800% (0.048ppm). A pesar de esto la investigación no busca comparar tratamientos sino que con lo expuesto por la teoría se corrobora, gracias a los datos de T4 y que los demás tratamientos se encuentran bajo este valor crítico, la efectividad del biosensor.

6.5.2. Análisis de datos de Absorbancia obtenidos por Espectroscopia de Absorción Atómica

6.5.2.1. Gráfico de Distribución Normal

De igual manera para los datos de absorbancia obtenidos por Espectroscopia de Absorción Atómica, se aplicó la prueba Shapiro-Wilk a fin de verificar la distribución normal de estos; mismos que generaron un valor P (significancia) de 0,5376. Siendo así que basados en lo ya mencionado descrito por (Spiegel, 1990) se demuestra que a pesar de ser menor la significancia en comparación a los datos de absorbancia de los obtenidos mediante Espectrofotómetro de microplacas, la significancia es suficiente para determinar que existe normalidad en los datos, basado en que para la aceptación de normalidad el valor de la significancia debe ser mayor a 0,05. En la figura 11 de se corrobora la distribución normal de los datos de absorbancia que varían dependiendo de las concentraciones del metaloide.

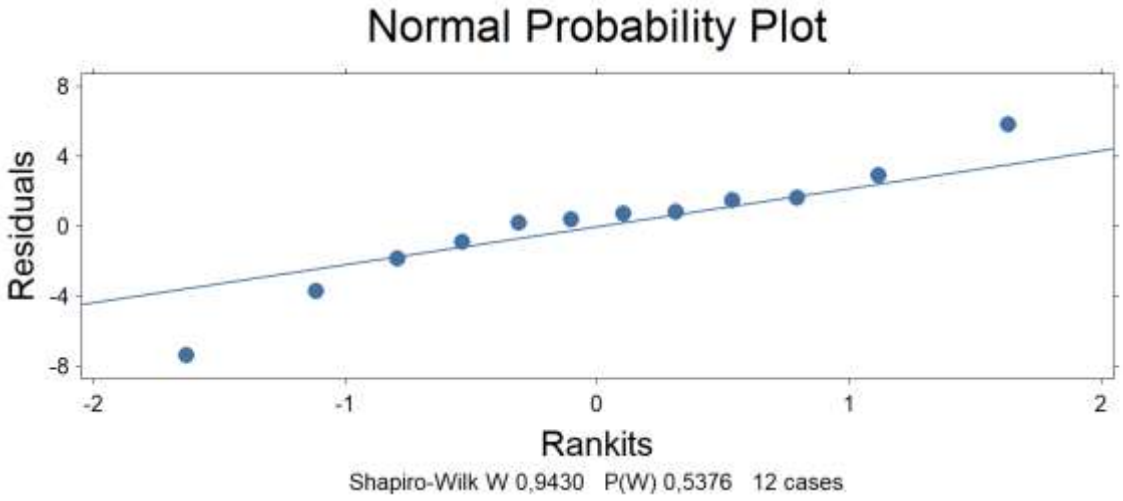


Figura 11 Distribución normal de Absorbancia por Espectroscopia de Absorción Atómica. Fuente: Statistix 10 elaborado por Santacruz, M. 2018 (Autor)

6.5.2.2. Homogeneidad de Varianza

De igual forma se aplicó la prueba de Levene de homogeneidad de varianza a los cuatro tratamientos y sus respectivas repeticiones de los datos Obtenidos por Espectroscopia de Absorción Atómica. Los resultados del análisis se detallan en la tabla 8.

Tabla 8.

Resultados de las pruebas de Homogeneidad de Varianza

Homogeneidad de Varianza	**F**	**P**
Prueba de Levene	3.13	0.0873

Nota. Datos obtenidos por el programa STATISTIX 10 por Santacruz, M. 2018 (Autor)

Mediante los datos obtenidos mismos que demuestran que el valor P (nivel de significancia) del análisis de todas las variables es mayor a 0.05 por lo cual se corrobora la homogeneidad y la confiabilidad de los datos obtenidos por Espectroscopia de Absorción Atómica, que evidencia de igual forma que con el análisis de absorbancia del Espectrofotómetro de Microplacas mediante la figura 12, la cual muestra como los datos se distribuyen.

6.5.2.3. ADEVA

Así mismo se realizó el análisis de varianza de un factor para determinar la variabilidad en los datos de absorbancia, obtenidos mediante Espectroscopia de Absorción Atómica, al someter al biosensor a las diferentes concentraciones de mercurio. Con la finalidad de corroborar la eficiencia del mismo, y al igual que con el anterior método analizado no se busca la comparación respecto cuál de los tratamientos funciona mejor, puesto que el objetivo de la investigación es determinar la viabilidad del biosensor.

Tabla 9.

Análisis de Varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	F	P	Valor crítico para F
Entre grupos	0.49051095	3	10838.224	9.00892E-15	4.066
Dentro de los grupos	0.000120687	8			
Total	0.490631637	11			

Nota. Datos Obtenidos por el programa STATISTIX 10 elaborado por Santacruz, M. 2018 (Autor)

El análisis de la tabla 9, mediante la comparación del valor de F calculado de 10838.224, con el valor crítico de distribución F (0,05), considerando los grados de libertad entre grupos y dentro de los grupos (Anexo 4), se determina el valor de 4.066. Lo que determina gracias a lo ya expuesto por (Spiegel, 1990) que al ser nuestro F calculado mucho mayor al valor crítico se demuestra que no existe igualdad entre las medias de las variables, siendo así que se corrobora lo analizado mediante la prueba de Levene y con lo analizado por el anterior método.

6.5.2.4. Prueba de pares comparativos de Scheffe

Habiéndose corroborado que ante cada concentración la media de absorbancia difiere parara cada tratamiento, se realizó la prueba de Scheffe con la finalidad de demostrar la eficiencia del biosensor ante las diferentes concentraciones, recalcando que no se comparó la eficiencia de un tratamiento sobre los otros debido a que el sistema actúa dependiendo de la concentración.

Tabla 10.

Resultado de la prueba Scheffe

Tratamientos	Promedio	Grupo Homogéneos
T4	0.8088	a
T3	0.5071	b
T2	0.3569	c
T1	0.2809	d

Nota. Datos obtenidos por el programa STATISTIX 10 elaborado por Santacruz, M. 2018 (Autor)

La tabla 10 muestra los promedios de absorbancia de cada tratamiento, mismos que se comparan con la magnitud de la tabla para crítico de distribución F (Anexo 4) para los grados de libertad obtenidos por el análisis de varianza que es de F=4.066 por lo que se evidencia que cada tratamiento mantiene valores inferiores al crítico por lo que (Spiegel, 1990) menciona que dados los datos el mejor tratamiento sería el T4 de concentración 800% (0.048ppm). A pesar de esto la investigación no busca comparar tratamientos sino que con lo expuesto por la teoría se corrobora, gracias a los datos de T4 y que los demás tratamientos se encuentran bajo este valor crítico, la efectividad del biosensor.

6.6. Socialización

Se realizó la socialización de la presente investigación mediante exposición a los alumnos de quinto semestre de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales de la carrera de Ciencias Ambientales y Eco-Desarrollo, que cursan la materia de Microbiología de su malla curricular. Siendo un total de 22 estudiantes los que asistieron a la socialización, se envió las respectivas invitaciones (Anexo 5) a los diferentes docentes de la escuela, mediante la cual un docente participó en la socialización.

Las encuestas realizadas (Anexo 6) a los n= 23 asistentes, sobre su interés y el impacto de la investigación demostraron resultados satisfactorios, puesto que el 74% de asistentes consideraron Muy Alto y 26% Alto respecto de si el tema posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad (figura 12), el 78% de asistentes consideraron Muy Alto y 22% Alto consideran que esta investigación posee perspectivas para estudios complementarios posteriores (figura 13), el 74% de asistentes consideraron Muy Alto y 26% Alto considera que el tema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución (figura 14); y el 87% de asistentes consideraron Muy Alto y 13% considera que los objetivos de la investigación se cumplieron (figura 16). (Anexo 6)

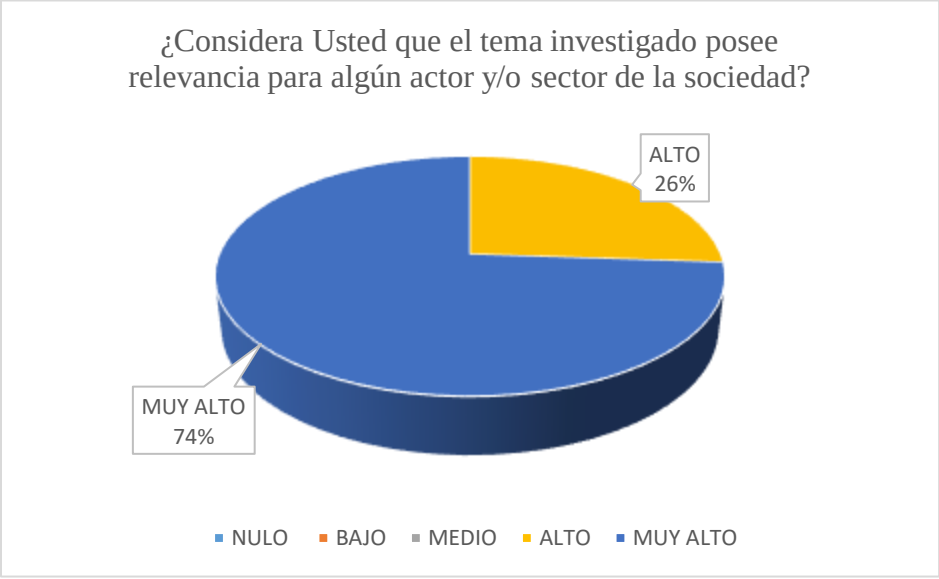


Figura 12 Gráfico de resultado para la pregunta de encuesta: ¿Considera Usted que el tema investigado posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad? Fuente: Santacruz, M. 2018 (autor)

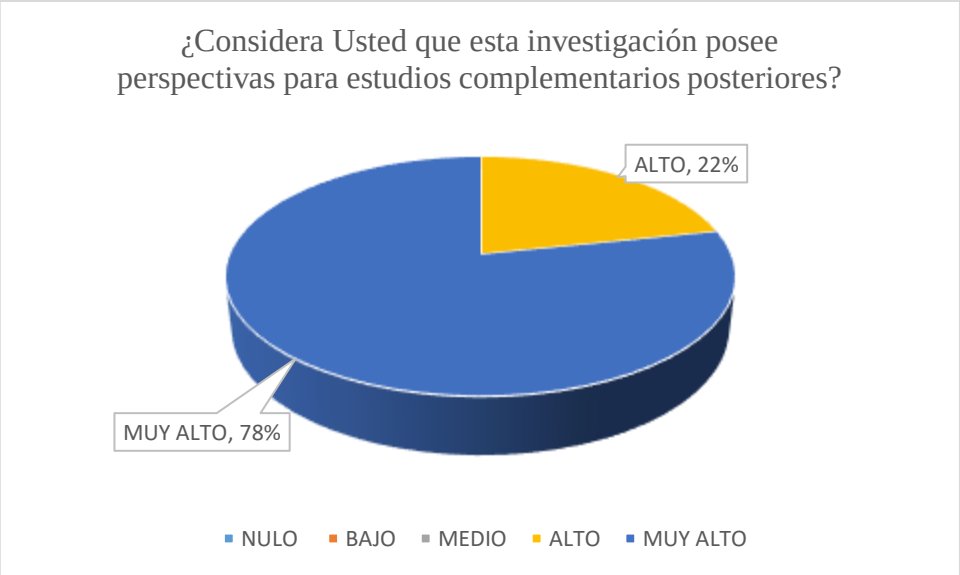


Figura 13 Gráfico de resultado para la pregunta de encuesta: ¿Considera Usted que esta investigación posee perspectivas para estudios complementarios posteriores? Fuente: Santacruz, M. 2018 (autor)

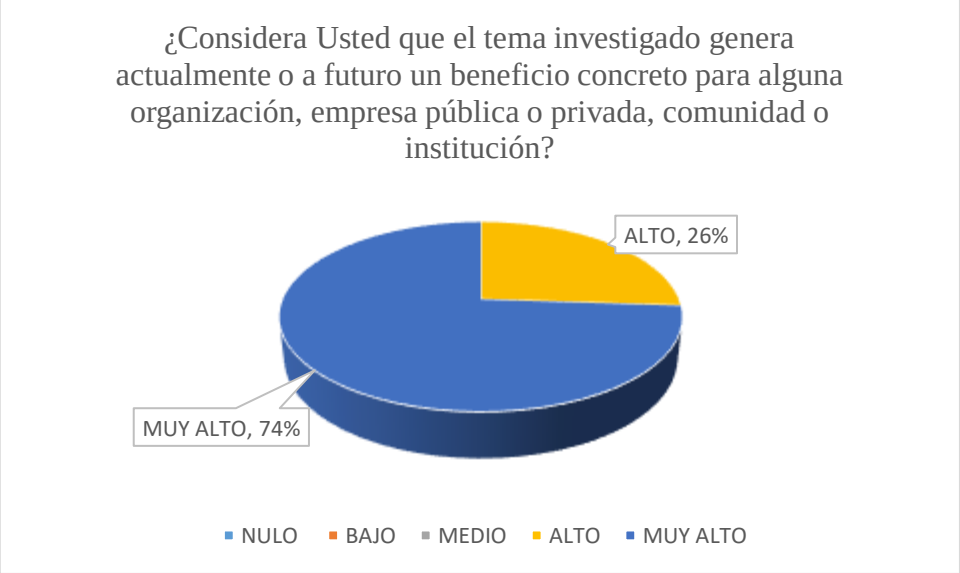


Figura 14 Gráfico de resultado para la pregunta de encuesta: ¿Considera Usted que el tema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución? Fuente: Santacruz, M. 2018 (autor)

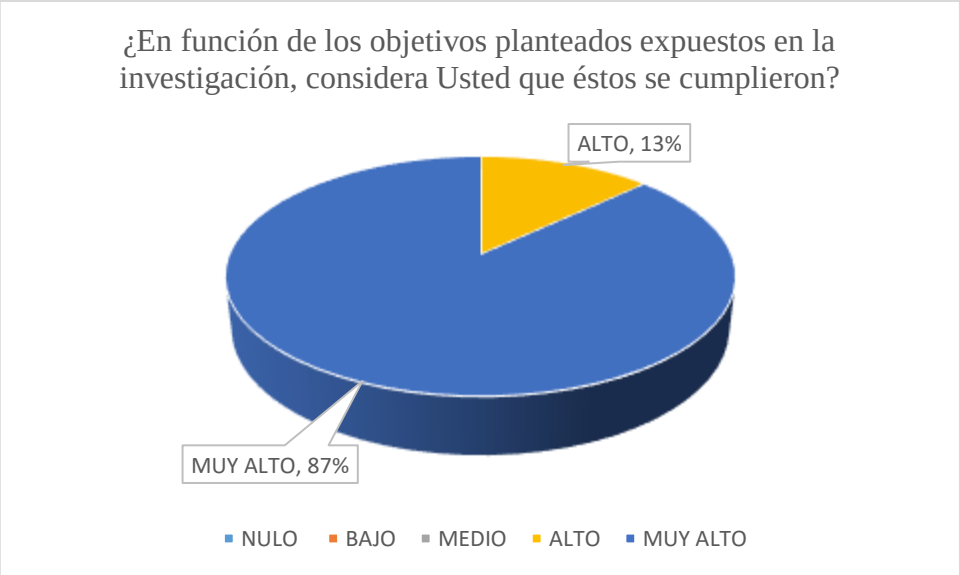


Figura 15 Gráfico de resultado para la pregunta de encuesta: ¿En función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera Usted que éstos se cumplieron? Fuente: Santacruz, M. 2018 (autor)

Se expuso, a fin de exhortar la importancia de la investigación, el resumen general de la misma. Exponiendo los impactos negativos producidas por el mercurio a nivel ambiental y, cómo esta influye en la salud humana y el desarrollo de diferentes seres vivos. En base a esto se expuso los beneficios de la implementación de técnicas biotecnológicas, en específico de los biosensores, en comparación a otras técnicas predominantes actualmente para la cuantificación y detección del metaloide. Siendo así que se resumió y explico la metodología utilizada para la elaboración del biosensor y los resultados alcanzados por la aplicación del mismo. (Anexo 7)

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1.Conclusiones

Mediante el estudio del comportamiento de *Escherichia coli* y la adecuación de un plásmido que le permita a esta bacteria generar una respuesta física ante el estímulo químico de la interacción en un medio con mercurio la construcción de un biosensor es viable

La resistencia al mercurio es otorgada por los genes del operon *mer* que forman parte del sistema de transducción del biosensor. Las células estudiadas presentan genes *merT* que otorga resistencia membrana y *merA* también conocida como mercurio reductasa.

El proceso de electroporación permite la transformación de la cepa de *Escherichia coli*, en biosensor, siendo el indicador el compuesto X- Gal dada la interacción de esta cepa con el medio de Agar LB.

El biosensor bacteriano tiene la capacidad de cuantificar las concentraciones de mercurio desde 0,006 ppm hasta 0,048 ppm, concentraciones estudiadas, con un error de 0, 52% con respecto a medición de Espectroscopia de Absorción Atómica, siendo así que se puede aseverar que el biosensor elaborado es efectivo para la detección de mercurio. Corroborando estos datos mediante pruebas estadísticas.

Los datos de la socialización demuestran gran relevancia del tema ante la comunidad científica y el potencial de para la realización de estudios complementarios posteriores, de igual manera el interés que genera el tema de investigación demuestra su importancia en la actualidad.

7.2. Recomendaciones

Estudiar el rango de capacidad del biosensor, mediante la realización de ensayos con mayor número de concentraciones, buscando la concentración máxima y mínima detectable por el biosensor.

Cuantificar el tiempo de vida útil del biosensor, se recomienda monitorear en lapsos de tiempo la viabilidad del mismo.

Para determinar la viabilidad en campo del biosensor, es recomendable realizar ensayos en laboratorio con muestras de agua que presenten concentraciones conocidas de mercurio, y evaluar los resultados de la misma forma que la investigada.

A fin de corroborar la viabilidad de las proteínas presentes en el operón *mer*, se debería variar las combinaciones de los genes conocidos que componen el operón.

Respecto de viabilidad de la construcción del biosensor, se podría realizar una investigación que compare diferentes métodos de inserción de plásmido y cómo influye en la viabilidad del biosensor.

8. BIBLIOGRAFÍA

Asakiewicz, C., Schaefer, J., Barkay, T. (2003). Microbial diversity of mer genes in bacteria isolated from mercury contaminated environments. *The Rutgers Scholar*, 1-2.

Bautista Zuñiga, F. (1999). Introducción. En F. Bautista Zuñiga, *Introducción al Estudio de la Contaminación del Suelo por Metales Pesados* (págs. 17-21). Yucatán: Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán.

Biotek. (2017). *Biotek*. Obtenido de Microplate Data Collection & Analysis Software: https://www.biotek.es/es/products/liquid-handling/

Blanch, A. (2010). Biotecnología ambiental. Aplicaciones biotecnológicas en la mejora del medio ambiente. *Monográfico*, 183-198.

Castillo, F., Roldán, M. D., Blasco, R., Caballero, F., Huertas, M. J., Moreno, C., Luque, M. (2005). Biotecnología Ambiental. Madrid: TÉBAR, S.L.

Chatterjee, J., Meighen, E. (1995). Biotechnical applications of bacterial bioluminescence (lux) genes. *Photochem*, 641-650.

Chaves, I. R. (2016). Metodologías analíticas utilizadas actualmente para la determinación de mercurio en músculo de pescado. *Revista Pensamiento Actual - Vol 16*, 115-117.

CONICET. (2005). *Investigadores rosarinos desarrollan un biosensor de metales tóxicos en el agua.* Obtenido de UNIVERSIA: http://noticias.universia.com.ar/cultura/noticia/2015/03/20/1121857/investigadores-rosarinos-desarrollan-biosensor-metales-toxicos-agua.pdf

Coria, L., Toro, A. (2012). *Biosensores para la deteccion de Hg en suelos contaminados.*

Daza, C., Campos, V. L., Rojas, C., Rodríguez-Llamazares, S., Smith, C. T., Mondaca, M. A. (2016). Reducción de selenito a selenio elemental por Pantoea agglomerans. *Gayana(Concepción)*, 67-74.

EL MUNDO. (10 de Febrero de 2013). Un detector de mercurio para 'smartphones'. Madrid, España.

Gaioli, M., Amoedo, D., Gonzáles, D. (2012). Impacto del mercurio sobre la salud humana y el ambiente. *Archivos Argentinos de Pediatria*, 259-264.

García-Balboa, C., Costas, E., López Rodas, V. (2012). BIOSENSORES MICROALGALES PARA LA DETECCIÓN DE CONTAMINANTES AMBIENTALES: UNA REVISIÓN. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 51-67.

Gomez, A. (Enero de 2018). *Determinación de plomo y cadmio por espectroscopia de absorción atómica con horno de grafito, para la evaluación de la calidad del agua en afluentes cercanos al volcán Cotopaxi*. Obtenido de http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/20.500.11962/21759/1/Gomez%20Castro%20Alvaro.pdf

Gonzales, M., Brooks, T., Pukatzki, S., Daniele, P. (2016). Rapid Protocol for Preparation of Electrocompetent Escherichia coli and Vibrio colerae. *Biomedical Sciences of University of Texas*, 53-65.

Guerrero, J., Ortíz, Z. (2013). BIORREMEDIACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR MERCURIO EN MINERIA INFORMAL. *Researchgate*, 209-216.

Hastincterags, J., Nealson, K. (1981). The symbiotic luminous bacteria. *Springer-Verlag*, 1332-1345.

INEN. (2014). *Agua Potable. Requisitos.* Quito: INEN.

Invitrogen. (2014). En Invitrogen, *Neon Transfection System* (págs. 4-15). Thermo Fisher Scientific Inc.

Litter, M., Armienta, M., Farías, S. (Octubre de 2009). *Metodologías analíticas para la determinación y especiaciónde arsénico en aguas y suelos.* Obtenido de IBEROARSEN: https://paginas.fe.up.pt/~cigar/html/documents/Monografia2_000.pdf

Luna, B., Rodriguez, A., Quevedo, O., Cabrera, L. (2007). Determinación de Metales Pesados en un Suplemento Nutricional de Origen Natural con Propiedades Antioxidantes. *Latin American Journal of Pharmacy*, 2-4.

MACROGEN Inc. (2018). *Humanizing Genomics macrogen.* Obtenido de Gene Synthesis Report: https://dna.macrogen.com/eng/quotation/ces/ces_quotaion_step1.jsp

Martín, M. D. (Mayo de 2017). *Análisis de Contaminantes metalicos y minerales en Plantas Medicinales.* Obtenido de https://hera.ugr.es/tesisugr/26658744.pdf

Mcarthur, J., Tuckfield, R. (2000). Patrones espaciales en la resistencia a los antibióticos entre las bacterias de las corrientes: efectos de la contaminación industrial. *Reinar. Microbiol*, 3722-3726.

Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente del Gobierno . (s.f.). *Gobierno de España*. Obtenido de http://www.mapama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/atmosfera-y-calidad-del-aire/emisiones/prob-amb/metales_pesados.aspx

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.* Ibarra: PUCESI.

Nies, D., Silver, S. (1995). Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *Journal of Industrial Microbiology*, 186 - 189.

Nunes-Halldorson, V. D., Duran, N. L. (2003). BIOLUMINESCENT BACTERIA: LUX GENES AS ENVIRONMETAL BIOSENSORS. *Brazilian Journal of Microbiology*, 91-96.

Osborn, A., Bruce, K., Strike, P., Ritchie, D. (1997). Distribución, diversidad y evolución del operón bacteriano de resistencia al mercurio (mer). *FEMS Microbiol.*, 239-262.

Perkin, E. (2000). Guide Flow injection Mercury/Hydride Analysis Recomended analysis. *Oslo: Barricades*.

Rojas De Astudillo, L., Prin, J. L., Jesús, N., Albornoz, L. A., Hidalgo-Prada, B., Ramírez, A. (2008). DETERMINACIÓN DE MERCURIO EN SUELOS DEL SECTOR MINERO LAS CLARITAS, ESTADO BOLÍVAR, MEDIANTE PROCESOS ANALITICOS DE ESPECIACIÓN Y MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB). *Universidad de Oriente*, 343-352.

Saénz, C., Nevárez, G. (2010). La Bioluminiscencia de microorganismos marinos y su potencial biotecnológico. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 57-64.

Salazar, P. (2013). *Fabricación, optimización y caracterización «in vitro» e «in vivo» de biosensores amperométricos enzimáticos para determinar metabolitos energéticos (glucosa y lactato) en el sistema nervioso central.* Tenerife: Servicio de Publicaciones Universidad de la Laguna.

Salvucci, D. M. (Abril de 2010). *CRECIMIENTO MICROBIANO*. Obtenido de https://esalvucci.wordpress.com/crecimiento-microbiano/

Selifonova, O., Burlage, R., Barkay, T. (1993). Bioluminisecent sensor for detection of bioavailable Hg(II) in the environment. *Environment Microbiology*, 3083-3090.

Serrano-Rivero, Y., Hernández-García, A., Fando-Calzada, R. (2013). Comparación de de dos métodos para la preparación de células competentes en Escherichia coli. *CENIC Ciencias Biológicas*, 186-192.

Spiegel, M. (1990). La desviación típica y otras medidas de disperción. En R. Murray, *Estadística* (págs. 69-89). México D.F.: mcgraw.

Torres, D. (2015). El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos. *ECOSISTEMAS*, 221-232.

Universidad Tecnologica de Pereira. (s.f.). *INFORME DE VALIDACIÓN DE MERCURIO EN AGUA TRATADA Y CRUDA.* PEREIRA: SISTEMA DE GESTION DE CALIDAD.

9. ANEXOS

Anexo Nº 1 Principales propiedades del Mercurio

Nombre	Mercurio
Número atómico	80
Valencia	1,2
Estado de oxidación	+2
Electronegatividad	1,9
Radio covalente (Å)	1,49
Radio iónico (Å)	1,10
Radio atómico (Å)	1,57
Configuración electrónica	$[Xe]4f^{14}5d^{10}6s^2$
Primer potencial de ionización (eV)	10,51
Masa atómica (g/mol)	200,59
Densidad (g/ml)	16,6
Punto de ebullición (ºC)	357
Punto de fusión (ºC)	-38,4
Descubridor	Los antiguos

Fuente: (Gaioli, Amoedo, & Gonzáles, 2012)

Anexo Nº 2 Requisitos de características de agua para consumo humano INEN 1108

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 *	Bg/l	0,5
Radiación total β **	Bg/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 radionucleídos: ^{210}Po, ^{224}Ra, ^{226}Ra, ^{232}Th, ^{234}U, ^{238}U, ^{239}Pu
** Corresponde a la radiación emitida por los siguientes radionucleídos: ^{60}Co, ^{89}Sr, ^{90}Sr, ^{129}I, ^{131}I, ^{134}Cs, ^{137}Cs, ^{210}Pb, ^{228}Ra

Fuente: (INEN, 2014)

Anexo Nº 3 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 Ticina; 0, 1% SDS)

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

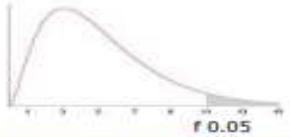
- Solución stock del gel de Agarosa al 2%

  Agarosa…… 2 g
  TAE 1X……..…….. Aforar a 100 ml

  Diamond™ Nucleic..…… 5 µL
  Acid Dye

Anexo Nº 4 Tabla de Valores Críticos para F (0,05)

Tabla D.9: VALORES CRÍTICOS DE LA DISTRIBUCIÓN F (0,05)

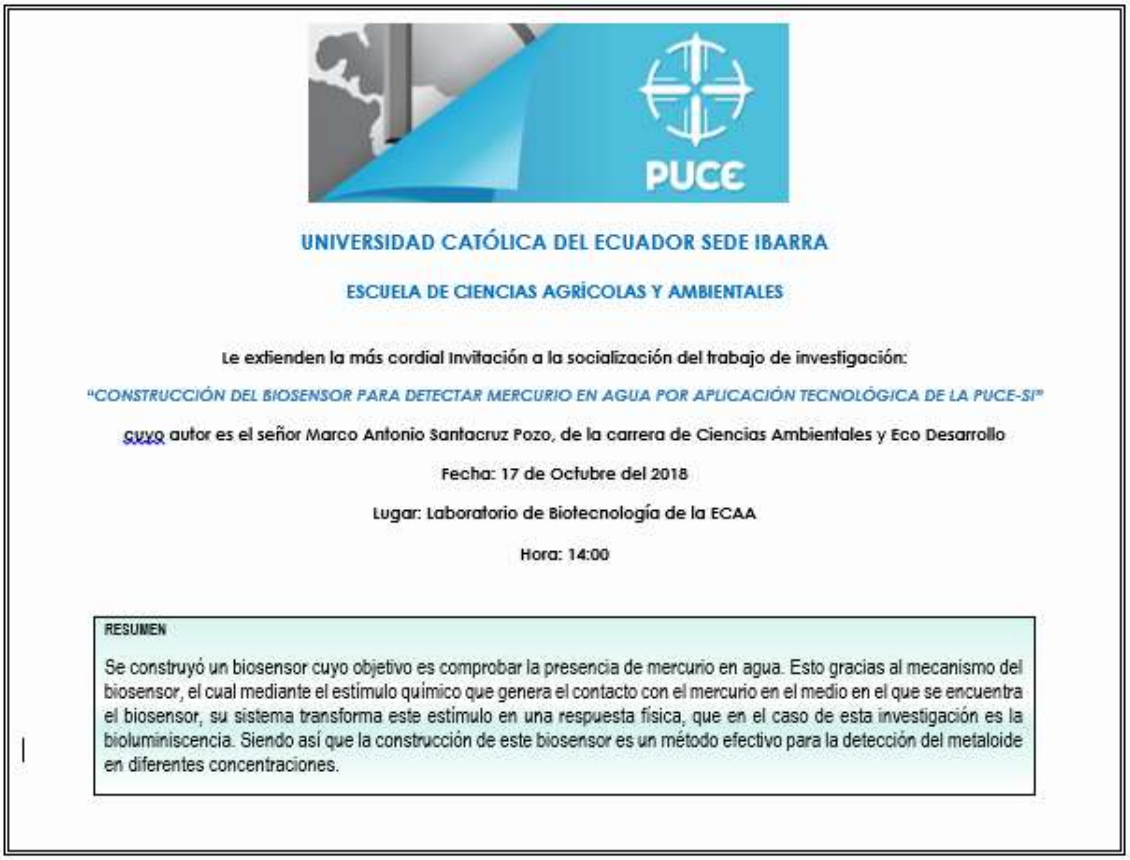


área a la derecha del valor crítico = 0,05

Grados de libertad del Denominador	Grados de libertad del Numerador															
g.d.l	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	g.d.l
1	161,4	199,5	215,7	224,6	230,2	234,0	236,8	238,9	240,5	241,9	243,0	243,9	244,7	245,4	245,9	1
2	18,513	19,000	19,164	19,247	19,296	19,330	19,353	19,371	19,385	19,396	19,405	19,413	19,419	19,424	19,429	2
3	10,128	9,552	9,277	9,117	9,013	8,941	8,887	8,845	8,812	8,786	8,763	8,745	8,729	8,715	8,703	3
4	7,709	6,944	6,591	6,388	6,256	6,163	6,094	6,041	5,999	5,964	5,936	5,912	5,891	5,873	5,858	4
5	6,608	5,786	5,409	5,192	5,050	4,950	4,876	4,818	4,772	4,735	4,704	4,678	4,655	4,636	4,619	5
6	5,987	5,143	4,757	4,534	4,387	4,284	4,207	4,147	4,099	4,060	4,027	4,000	3,976	3,956	3,938	6
7	5,591	4,737	4,347	4,120	3,972	3,866	3,787	3,726	3,677	3,637	3,603	3,575	3,550	3,529	3,511	7
8	5,318	4,459	4,066	3,838	3,687	3,581	3,500	3,438	3,388	3,347	3,313	3,284	3,259	3,237	3,218	8
9	5,117	4,256	3,863	3,633	3,482	3,374	3,293	3,230	3,179	3,137	3,102	3,073	3,048	3,025	3,006	9
10	4,965	4,103	3,708	3,478	3,326	3,217	3,135	3,072	3,020	2,978	2,943	2,913	2,887	2,865	2,845	10
11	4,844	3,982	3,587	3,357	3,204	3,095	3,012	2,948	2,896	2,854	2,818	2,788	2,761	2,739	2,719	11
12	4,747	3,885	3,490	3,259	3,106	2,996	2,913	2,849	2,796	2,753	2,717	2,687	2,660	2,637	2,617	12
13	4,667	3,806	3,411	3,179	3,025	2,915	2,832	2,767	2,714	2,671	2,635	2,604	2,577	2,554	2,533	13
14	4,600	3,739	3,344	3,112	2,958	2,848	2,764	2,699	2,646	2,602	2,565	2,534	2,507	2,484	2,463	14
15	4,543	3,682	3,287	3,056	2,901	2,790	2,707	2,641	2,588	2,544	2,507	2,475	2,448	2,424	2,403	15
16	4,494	3,634	3,239	3,007	2,852	2,741	2,657	2,591	2,538	2,494	2,456	2,425	2,397	2,373	2,352	16
17	4,451	3,592	3,197	2,965	2,810	2,699	2,614	2,548	2,494	2,450	2,413	2,381	2,353	2,329	2,308	17
18	4,414	3,555	3,160	2,928	2,773	2,661	2,577	2,510	2,456	2,412	2,374	2,342	2,314	2,290	2,269	18
19	4,381	3,522	3,127	2,895	2,740	2,628	2,544	2,477	2,423	2,378	2,340	2,308	2,280	2,256	2,234	19
20	4,351	3,493	3,098	2,866	2,711	2,599	2,514	2,447	2,393	2,348	2,310	2,278	2,250	2,225	2,203	20
21	4,325	3,467	3,072	2,840	2,685	2,573	2,488	2,420	2,366	2,321	2,283	2,250	2,222	2,197	2,176	21
22	4,301	3,443	3,049	2,817	2,661	2,549	2,464	2,397	2,342	2,297	2,259	2,226	2,198	2,173	2,151	22
23	4,279	3,422	3,028	2,796	2,640	2,528	2,442	2,375	2,320	2,275	2,236	2,204	2,175	2,150	2,128	23
24	4,260	3,403	3,009	2,776	2,621	2,508	2,423	2,355	2,300	2,255	2,216	2,183	2,155	2,130	2,108	24
25	4,242	3,385	2,991	2,759	2,603	2,490	2,405	2,337	2,282	2,236	2,198	2,165	2,136	2,111	2,089	25
26	4,225	3,369	2,975	2,743	2,587	2,474	2,388	2,321	2,265	2,220	2,181	2,148	2,119	2,094	2,072	26
27	4,210	3,354	2,960	2,728	2,572	2,459	2,373	2,305	2,250	2,204	2,166	2,132	2,103	2,078	2,056	27
28	4,196	3,340	2,947	2,714	2,558	2,445	2,359	2,291	2,236	2,190	2,151	2,118	2,089	2,064	2,041	28
29	4,183	3,328	2,934	2,701	2,545	2,432	2,346	2,278	2,223	2,177	2,138	2,104	2,075	2,050	2,027	29
30	4,171	3,316	2,922	2,690	2,534	2,421	2,334	2,266	2,211	2,165	2,126	2,092	2,063	2,037	2,015	30
31	4,160	3,305	2,911	2,679	2,523	2,409	2,323	2,255	2,199	2,153	2,114	2,080	2,051	2,026	2,003	31
32	4,149	3,295	2,901	2,668	2,512	2,399	2,313	2,244	2,189	2,142	2,103	2,070	2,040	2,015	1,992	32
33	4,139	3,285	2,892	2,659	2,503	2,389	2,303	2,235	2,179	2,133	2,093	2,060	2,030	2,004	1,982	33
34	4,130	3,276	2,883	2,650	2,494	2,380	2,294	2,225	2,170	2,123	2,084	2,050	2,021	1,995	1,972	34
35	4,121	3,267	2,874	2,641	2,485	2,372	2,285	2,217	2,161	2,114	2,075	2,041	2,012	1,986	1,963	35
40	4,085	3,232	2,839	2,606	2,449	2,336	2,249	2,180	2,124	2,077	2,038	2,003	1,974	1,948	1,924	40
60	4,001	3,150	2,758	2,525	2,368	2,254	2,167	2,097	2,040	1,993	1,952	1,917	1,887	1,860	1,836	60
80	3,960	3,111	2,719	2,486	2,329	2,214	2,126	2,056	1,999	1,951	1,910	1,875	1,845	1,817	1,793	80
90	3,947	3,098	2,706	2,473	2,316	2,201	2,113	2,043	1,986	1,938	1,897	1,861	1,830	1,803	1,779	90
100	3,936	3,087	2,696	2,463	2,305	2,191	2,103	2,032	1,975	1,927	1,886	1,850	1,819	1,792	1,768	100
120	3,920	3,072	2,680	2,447	2,290	2,175	2,087	2,016	1,959	1,910	1,869	1,834	1,803	1,775	1,750	120
inf.	3,841	2,996	2,605	2,372	2,214	2,099	2,010	1,938	1,880	1,831	1,789	1,752	1,720	1,692	1,666	inf.

Distribución F (0,05)

Anexo Nº 5 Invitación



UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR SEDE IBARRA

ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES

Le extienden la más cordial invitación a la socialización del trabajo de investigación:

"CONSTRUCCIÓN DEL BIOSENSOR PARA DETECTAR MERCURIO EN AGUA POR APLICACIÓN TECNOLÓGICA DE LA PUCE-SI"

cuyo autor es el señor Marco Antonio Santacruz Pozo, de la carrera de Ciencias Ambientales y Eco Desarrollo

Fecha: 17 de Octubre del 2018

Lugar: Laboratorio de Biotecnología de la ECAA

Hora: 14:00

RESUMEN

Se construyó un biosensor cuyo objetivo es comprobar la presencia de mercurio en agua. Esto gracias al mecanismo del biosensor, el cual mediante el estímulo químico que genera el contacto con el mercurio en el medio en el que se encuentra el biosensor, su sistema transforma este estímulo en una respuesta física, que en el caso de esta investigación es la bioluminiscencia. Siendo así que la construcción de este biosensor es un método efectivo para la detección del metaloide en diferentes concentraciones.

Anexo Nº 6 Formato de Encuesta



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	

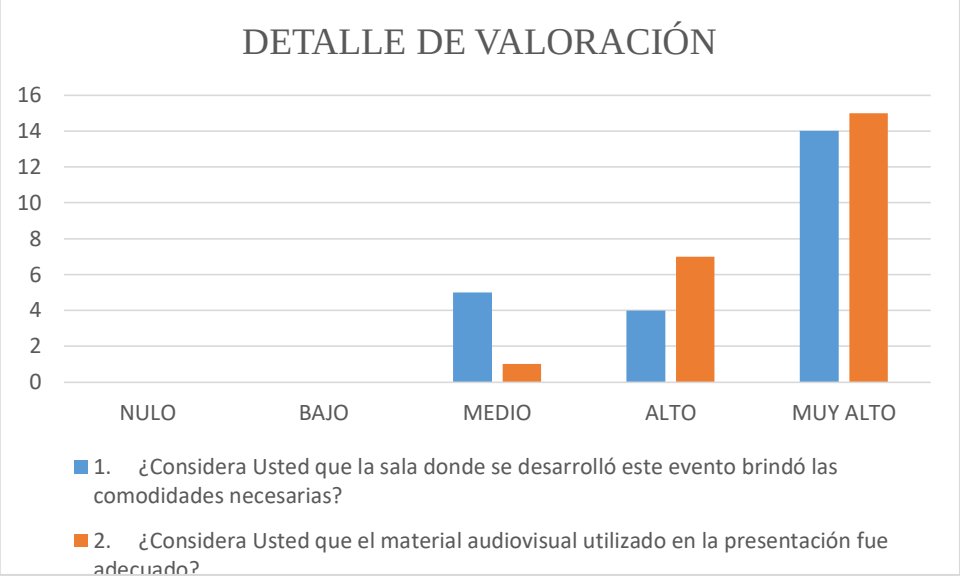
NOTA IMPORTANTE: Por favor conteste las preguntas según la siguiente escala:

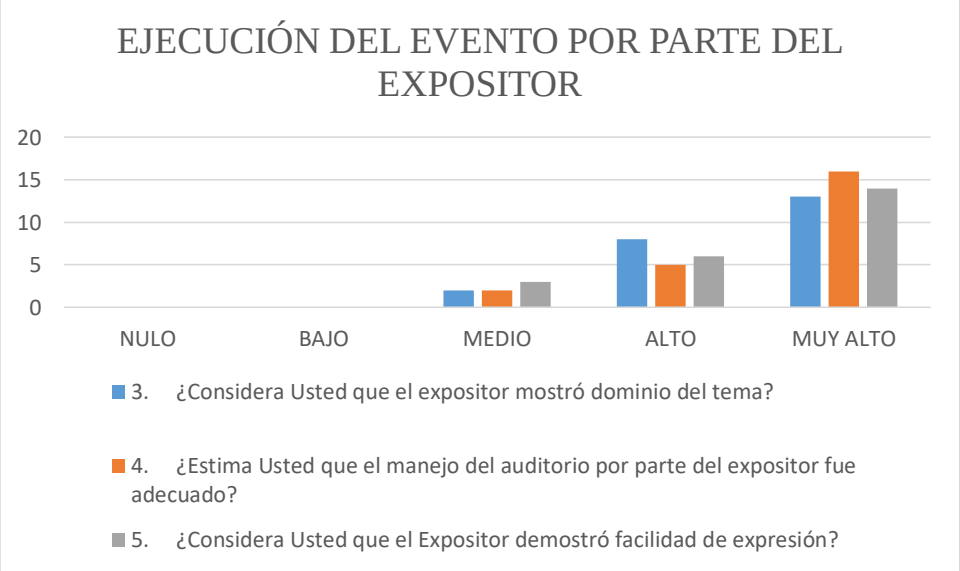
5. MUY ALTO / 4. ALTO / 3. MEDIO / 2. BAJO / 1. NULO

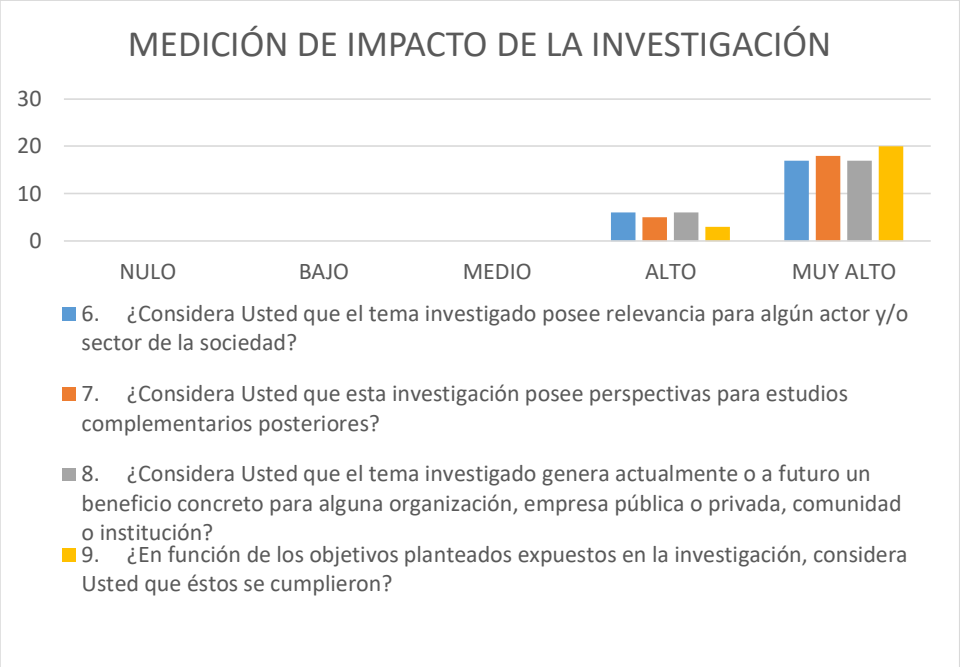
DETALLE DE VALORACION	1	2	3	4	5
ORGANIZACION DEL EVENTO DE SOCIALIZACION:					
1. ¿Considera Usted que la sala donde se desarrolló este evento brindó las comodidades necesarias?					
2. ¿Considera Usted que el material audiovisual utilizado en la presentación fue adecuado?					
EJECUCION DEL EVENTO POR 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?					
MEDICION DE IMPACTO DE LA INVESTIGACION:					
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 PROBLEMATICAS QUE A SU PARECER PODRIAN SER INVESTIGADAS Y QUE POSEAN IMPORTANCIA PARA ALGÚN ACTOR Y/O SECTOR DE NUESTRA COLECTIVIDAD					

INSTITUCIÓN U ORGANIZACIÓN A LA QUE PERTENECE EL ENCUESTADO	

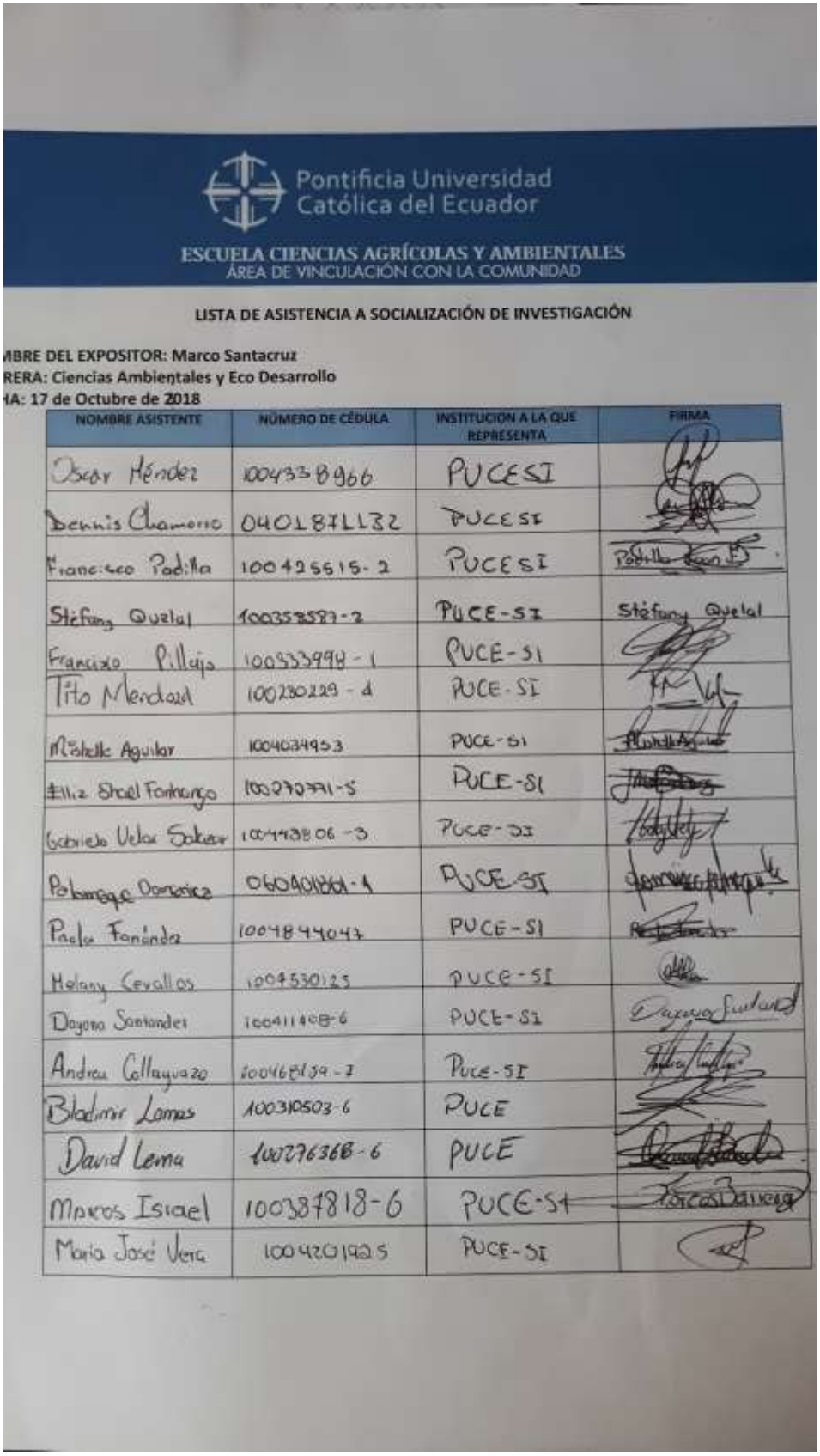
Anexo Nº 7 Resultados de las encuestas






MEDICIÓN DE IMPACTO DE LA INVESTIGACIÓN
30
20
10
0
NULO
BAJO
MEDIO
ALTO
MUY ALTO
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?

Anexo Nº 8 Listado de Asistentes



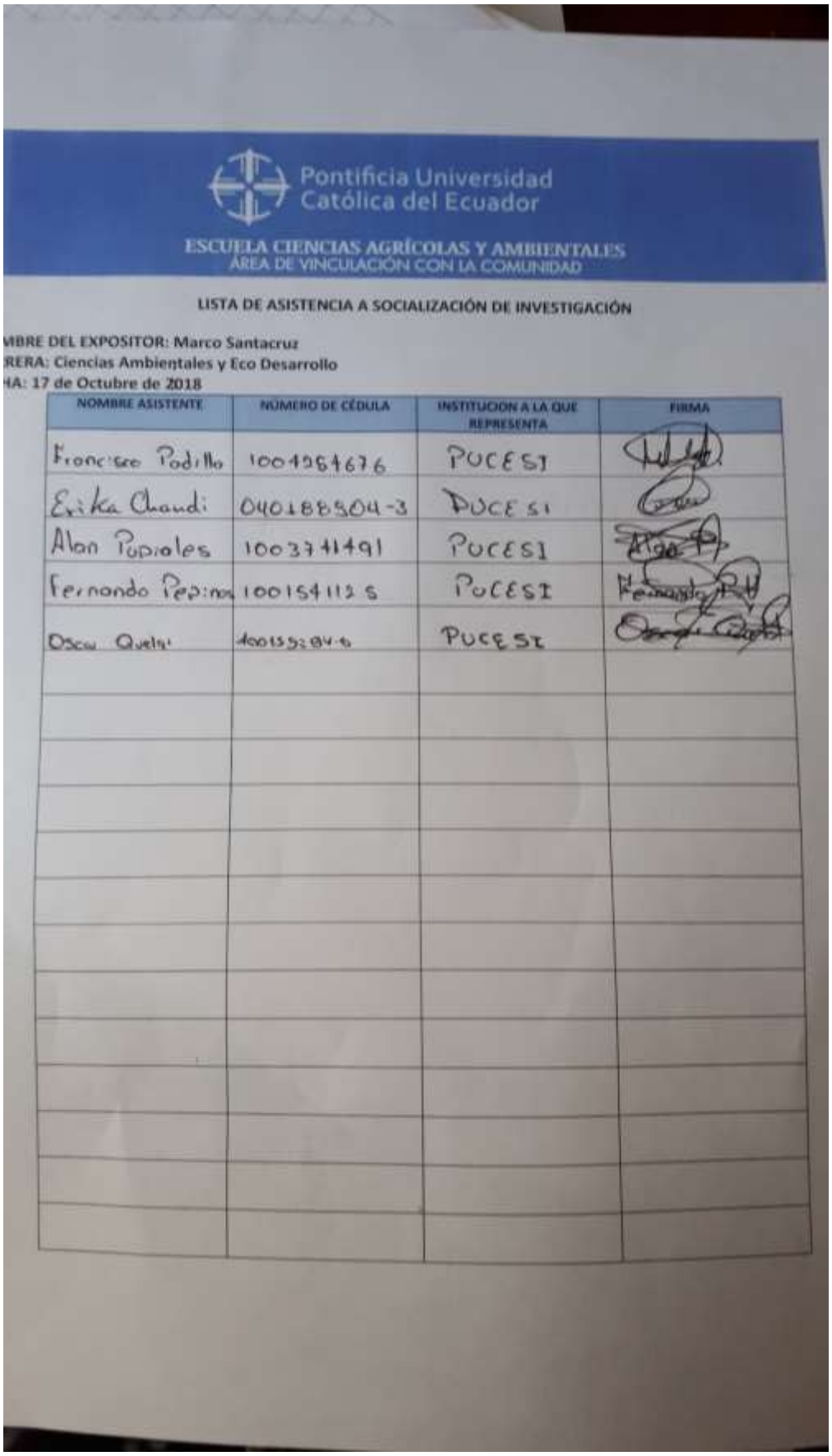
Pontificia Universidad Católica del Ecuador

ESCUELA CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES
ÁREA DE VINCULACIÓN CON LA COMUNIDAD

LISTA DE ASISTENCIA A SOCIALIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN

MBRE DEL EXPOSITOR: Marco Santacruz
RERA: Ciencias Ambientales y Eco Desarrollo
HA: 17 de Octubre de 2018

NOMBRE ASISTENTE	NÚMERO DE CÉDULA	INSTITUCION A LA QUE REPRESENTA	FIRMA
Oscar Méndez	1004338966	PUCESI	
Dennis Chamorro	0401871132	PUCESI	
Francisco Padilla	100425515-2	PUCESI	
Stéfany Quelal	1003585872	PUCE-SI	Stéfany Quelal
Francisco Pillajo	1003339941	PUCE-SI	
Tito Mendoza	100280229-4	PUCE-SI	
Mishelle Aguilar	1004034953	PUCE-SI	
Elliz Stael Fonseca	1002702391-5	PUCE-SI	
Gabriela Vela Salazar	1044938806-3	PUCE-SI	
Pabonegue Dominica	0604011864-1	PUCE-SI	
Paola Fonseca	1004844047	PUCE-SI	
Helany Cevallos	1004530125	PUCE-SI	
Dayana Santander	1004114068-6	PUCE-SI	
Andrea Callaguazo	1004681394-7	PUCE-SI	
Bladimir Lomas	100310503-6	PUCE	
David Lema	1002763668-6	PUCE	
Moxos Isiael	1003878186	PUCE-SI	
Maria José Vera	1004201925	PUCE-SI	



Pontificia Universidad Católica del Ecuador

ESCUELA CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES
ÁREA DE VINCULACIÓN CON LA COMUNIDAD

LISTA DE ASISTENCIA A SOCIALIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN

MBRE DEL EXPOSITOR: Marco Santacruz
RERA: Ciencias Ambientales y Eco Desarrollo
HA: 17 de Octubre de 2018

NOMBRE ASISTENTE	NUMERO DE CÉDULA	INSTITUCION A LA QUE REPRESENTA	FIRMA
Francisco Padilla	1004264676	PUCESI	
Erika Chaudi	040188904-3	PUCESI	
Alan Pupiales	1003741491	PUCESI	
Fernando Pedrosa	1001541125	PUCESI	
Oscar Quelal	1001552040	PUCESI	

Anexo Nº 9 Evidencia Fotográfica de la Socialización



