



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE GUAYAQUIL
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**DISEÑO DE UN BIOSENSOR BACTERIANO PARA LA IDENTIFICACIÓN
CUALITATIVA DE MERCURIO (HG)**

Trabajo de titulación previo a la obtención del
Título de Ingeniero/a en Biotecnología

**AUTORES: OSCAR HUGO ARANA VELOZ
AMBAR EUNICE URGILES VIDAL**

TUTORA: BRENDA PATRICIA LÓPEZ ULLOA

GUAYAQUIL - ECUADOR

2024

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotros, **Oscar Hugo Arana Veloz** con documento de identificación N° 0942091992 y **Ambar Eunice Urgiles Vidal** con documento de identificación N° 0952504090; manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Guayaquil, 31 de agosto del año 2024

Atentamente,



Oscar Hugo Arana Veloz

CI: 0942091992



Ambar Eunice Urgiles Vidal

CI: 0952504090

CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

Nosotros, **Oscar Hugo Arana Veloz** con documento de identificación N° 0942091992 y **Ambar Eunice Urgiles Vidal** con documento de identificación N° 0952504090, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo experimental: **DISEÑO DE UN BIOSENSOR BACTERIANO PARA LA IDENTIFICACIÓN CUALITATIVA DE MERCURIO (HG)**, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniero/a en Biotecnología*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 31 de agosto del año 2024

Atentamente,


Oscar Hugo Arana Veloz

CI: 0942091992


Ambar Eunice Urgiles Vidal

CI: 0952504090

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Brenda Patricia López Ulloa con documento de identificación N° 0960450922, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **DISEÑO DE UN BIOSENSOR BACTERIANO PARA LA IDENTIFICACIÓN CUALITATIVA DE MERCURIO (HG)**, realizado por **Oscar Hugo Arana Veloz** con documento de identificación N° 0942091992 y **Ambar Eunice Urgiles Vidal** con documento de identificación N° 0952504090, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo Experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 31 de agosto del año 2024

Atentamente,


Brenda Patricia López Ulloa

CI: 0960450922

DEDICATORIAS

Esta tesis está dedicada, en primer lugar, a Dios, quien me brindó la fortaleza en los momentos de mayor dificultad. Su presencia me permitió enfrentar y superar los problemas, guiándome en la búsqueda de soluciones. A Él debo todo lo que he logrado, pues sin su obra y la gracia del Espíritu Santo, nada de esto habría sido posible.

También quiero dedicar este trabajo a mis familiares, quienes han sido un pilar fundamental en la consecución de esta meta. Gracias a su apoyo constante y a los recursos que proporcionaron, fue posible desarrollar esta investigación. Sus esfuerzos y dedicación están reflejados en cada página de esta tesis, la cual marca la culminación de mi carrera universitaria.

RESUMEN

Los metales pesados son compuestos tóxicos para los seres vivos debido a su capacidad de bioacumulación, lo que provoca serios problemas en los ecosistemas. Entre ellos, el mercurio se destaca como uno de los contaminantes más tóxicos debido a su alta capacidad para causar problemas de salud en las especies expuestas. La técnica de referencia más utilizada para la detección de metales pesados es la espectrofotometría de absorción atómica, que se basa en la absorción de energía radiante por átomos en su estado fundamental. Sin embargo, esta técnica se caracteriza por largos tiempos de espera para obtener resultados y por los altos costos asociados a la adquisición y mantenimiento de equipos, así como a los reactivos necesarios.

El objetivo de la presente investigación es utilizar herramientas biotecnológicas para optimizar los procesos y mejorar la detección de metales pesados, como el mercurio. Para ello, se desarrolló un dispositivo biológico capaz de identificar este compuesto mediante la ingeniería de una secuencia genética destinada a la producción de una proteína marcador. El proceso se realizó en bacterias aisladas del golfo de Guayaquil, las cuales fueron sometidas a una transformación química para permitir su manipulación genética. Tras completar la transformación, se evaluó la capacidad selectiva la cual se observó un punto de inflexión a partir de 0,04 ppm en la concentración de cloruro de mercurio (HgCl_2), Sin embargo, no se detectó la producción de la proteína GFP en presencia de cadmio (Cd), cromo (Cr), plata (Ag) y plomo (Pb). Se evaluó la sensibilidad de las bacterias frente a diferentes concentraciones 0.5 a 3,25 ppm de mercurio (Hg) la cual se obtuvo una detección de mercurio (Hg) mediante la producción de la proteína verde fluorescente (GFP).

Palabras clave: Metal pesado, Biosensor, Mercurio, Modificación genética.

ABSTRACT

Heavy metals are toxic compounds for living beings due to their ability to bioaccumulate, which causes serious problems in ecosystems. Among them, mercury stands out as one of the most toxic pollutants due to its high capacity to cause health problems in exposed species. The most widely used reference technique for the detection of heavy metals is atomic absorption spectrophotometry, which is based on the absorption of radiant energy by atoms in their ground state. However, this technique is characterized by long waiting times for results and by the high costs associated with the acquisition and maintenance of equipment, as well as the necessary reagents. The objective of this research is to use biotechnological tools to optimize processes and improve the detection of heavy metals, such as mercury. To do this, a biological device was developed capable of identifying this compound by engineering a genetic sequence aimed at the production of a marker protein. The process was carried out on bacteria isolated from the Gulf of Guayaquil, which were subjected to a chemical transformation to allow their genetic manipulation. After completing the transformation, the selective capacity was evaluated, which showed a tipping point from 0.04 ppm in the concentration of mercury chloride (HgCl_2); however, the production of the GFP protein was not detected in the presence of cadmium (Cd), chromium (Cr), silver (Ag) and lead (Pb). The sensitivity of the bacteria to different concentrations 0.5 to 3.25 ppm of mercury (Hg) was evaluated, which was detected by mercury (Hg) through the production of green fluorescent protein (GFP).

Keywords: Heavy metal, Biosensor, Mercury, Genetic modification.

INDICE DE CONTENIDO

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN I	
CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA.....	III
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	IV
DEDICATORIAS.....	V
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT.....	VII
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
Objetivo general.....	3
Objetivos específicos.....	3
HIPÓTESIS.....	3
MARCO TEÓRICO.....	4
Metal pesado.....	4
Fuentes de metales pesados.....	5
Mercurio (Hg).....	6
Límites máximos permisibles de mercurio (Hg).....	7

	9
Contaminación por mercurio (Hg).....	7
Toxicidad del mercurio (Hg).....	8
Ciclo de mercurio (Hg).....	9
Operon <i>mer</i>	10
Técnicas de medición de mercurio (Hg).....	13
Biosensor.....	15
Constructo del biosensor.....	17
MARCO METODOLÓGICO.....	22
Lugar de desarrollo de la investigación.....	22
Zona de muestreo.....	22
Recolección de la muestra.....	23
Aislamiento e identificación.....	24
Aislamiento.....	24
Identificación macroscópica.....	25
Identificación microscópica.....	25
Pruebas de identificación bioquímicas.....	26
Diseño del inserto mediante herramientas bioinformáticas.....	28
Clonamiento.....	30
Digestión del inserto.....	30
Digestión del plasmido pSB1C3.....	30

	10
Verificación de digestión.....	31
Purificación.....	31
Ligación.....	32
Bacterias quimio competentes.....	33
Transformación bacteriana.....	34
PCR de colonia.....	34
Análisis del biosensor.....	35
Sensibilidad.....	35
Análisis estadístico del biosensor.....	37
RESULTADOS.....	38
Aislamiento e identificación de <i>Escherichia coli</i>	38
Diseño del Biosensor.....	42
Generación del biosensor.....	44
Análisis del biosensor.....	45
Sensibilidad del biosensor.....	47
DISCUSIÓN.....	50
CONCLUSION.....	54
RECOMENDACIONES.....	55
BIBLIOGRAFÍA.....	56
ANEXOS.....	71

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de los lugares de muestreo considerados en la investigación.....	23
Tabla 2. Características de las regiones del inserto.....	29
Tabla 3. Secuencias de los primers Forward y Reverse.....	35
Tabla 4. Recuento del crecimiento microbiano.....	39
Tabla 5. Colonias seleccionadas según su característica morfológica.....	39
Tabla 6. Porcentaje de tipo de bacterias por su coloración morfológica.....	40
Tabla 7. Resultados de la identificación bioquímicas de las colonias.....	41
Tabla 8. Valor de P de las variables de concentración y absorbancia.....	47

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los metales pesados que son perjudiciales para la salud y su método de detección en alimentos.....	5
Figura 2. Fuentes naturales y antropogénicos de contaminación por metales pesados y su desembocadura desde los ríos hacia el océano.....	6
Figura 3. Estado líquido del mercurio presente naturalmente en el ambiente.....	8
Figura 4. Ciclo del mercurio de forma natural o antropogénica y su transformación a metilmercurio presente en peces del océano.....	9
Figura 5. Proyección en 3D de MerA.....	12
Figura 6. Diagrama que ilustra la reacción catalítica de la enzima MerB.....	13
Figura 7. Estructura principal de un biosensor para detectar un analito de interés..	16
Figura 8. Estructura de un vector con las regiones de resistencia antibiótico, origen de replicación y sitio de restricción.....	19
Figura 9. Estructura 3D y química de la proteína verde fluorescente GFP.....	20
Figura 10. Puntos de muestreo en el Estero Salado en Ecuador.....	23
Figura 11. Estructura plasmido pSB1C3.....	29
Figura 12. Simulación del inserto en programa SnapGene.....	42
Figura 13. Simulación del inserto en programa Tinkercell.....	43
Figura 14. Visualización de peso molecular y corte de banda del inserto y vector previo a la purificación.....	44
Figura 15. Gel de electroforesis de la PCR en colonia.....	45
Figura 16. Diagrama de curva de Absorbancia (ABS) vs Metales pesados (ppm).....	46

Figura 17. Prueba de Mann-Whitney realizado en el simulador de Statgraphis.....	48
Figura 18. Diagrama de curva de Absorbancia (ABS) vs Cloruro de Mercurio (ppm)....	49
Figura 19. Niveles de absorbancia con respecto a la intensidad de color que la proteína GFP con relación a los niveles de concentración de cloruro de mercurio.....	49

INTRODUCCIÓN

Los metales pesados son elementos metálicos con propiedades distintivas de alta toxicidad y densidad, que persisten en el medio ambiente debido a la falta de mecanismos metabólicos específicos para su degradación. Aunque estos metales están presentes en concentraciones naturales generalmente bajas, lo que limita su impacto ecológico, ciertos metales como el mercurio (Hg), la plata (Ag), el cromo (Cr) y el plomo (Pb) representan una amenaza significativa incluso en niveles mínimos (Oggero *et al.*, 2021).

El mercurio, un metal pesado que destaca por su notable toxicidad, volatilidad y resistencia a la biorremediación. Aunque se encuentra en bajas concentraciones en la naturaleza, el mercurio ha causado impactos negativos significativos, particularmente en los ecosistemas acuáticos afectados por la contaminación derivada de actividades mineras. En estos entornos, el mercurio se incorpora a la cadena trófica y se acumula en organismos marinos como el atún. Dado que el mercurio se une firmemente a las proteínas en los peces, no puede ser eliminado mediante métodos convencionales de limpieza o cocción. Esta acumulación presenta graves riesgos para la salud humana, afectando en particular al sistema nervioso (Panduro *et al.*, 2020).

La exposición al mercurio a través del consumo de pescado contaminado representa un riesgo considerable para las mujeres embarazadas, dado su potencial para interferir con el desarrollo embrionario, causar efectos adversos durante la infancia y la adolescencia. El mercurio puede atravesar la barrera hematoencefálica del feto,

afectando el desarrollo neurológico desde etapas tempranas, pudiendo desencadenar trastornos neurológicos como el autismo, déficit de atención y trastornos del lenguaje (De Oliveira Dantas *et al.*, 2022).

Para abordar estos desafíos, se han desarrollado métodos avanzados para la detección y cuantificación de metales pesados en alimentos, como la espectrometría de masas, la digestión ácida seguida de espectrometría de absorción atómica con vapor frío (CVAAS), la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). Aunque estas técnicas son altamente precisas, confiables, sus altos costos, tiempos de análisis prolongados pueden retrasar la disponibilidad de productos en el mercado y limitar su aplicación en pequeñas empresas y en crecimiento (Limbeck *et al.*, 2017b). Es por esta razón que es importante el desarrollo de otras metodologías para la detección de mercurio.

OBJETIVOS

Objetivo general

Diseñar un biosensor mediante transformación bacteriana para la identificación cualitativa de mercurio.

Objetivos específicos

- I. Identificar y seleccionar secuencias genéticas que permitan la detección de mercurio (Hg) mediante búsqueda en bases de datos, y diseñar un sistema genético reportero.
- II. Generar bacterias quimio competentes y transformarlas con el plásmido que posee el casete genético que responde a la presencia de mercurio.
- III. Evaluar el biosensor usando diferentes concentraciones de mercurio

HIPÓTESIS

El diseño de un biosensor basado en plásmidos bacterianos modificados genéticamente permitirá la detección de mercurio (Hg), mostrando una respuesta detectable en presencia de mercurio (Hg) a través de la proteína verde fluorescente (GFP).

Variable independiente: Niveles de concentración de mercurio.

Variable dependiente: Niveles de concentración de la proteína reportera

MARCO TEÓRICO

Metal pesado

Los metales pesados son elementos químicos que están presentes en todo el planeta, algunos son usados como materia prima para la elaboración de productos como abonos, pilas, fluorescentes, combustibles para el transporte, y otros son esenciales para mantener la vida al participar en varias funciones biológicas en concentraciones trazas que equivale a menos de 100 ppm (Thai *et al.*, 2023).

Los metales pesados como el cobalto (Co), el cobre Cu), hierro (Fe), níquel (Ni), manganeso (Mn) y zinc (Zn) son considerados esenciales para la vida, usados como micronutrientes en pequeñas cantidades, mientras que el cadmio (Cd), el mercurio (Hg) y el plomo (Pb) son perjudiciales para los seres vivos, siendo categorizados como no esenciales para la vida (Bhat *et al.*, 2022). Los metales pesados se consideran una amenaza para el medio ambiente y la salud de los seres vivos (Figura 1), debido a su capacidad de bioacumulación y difícil proceso de eliminación (Xie, 2024)

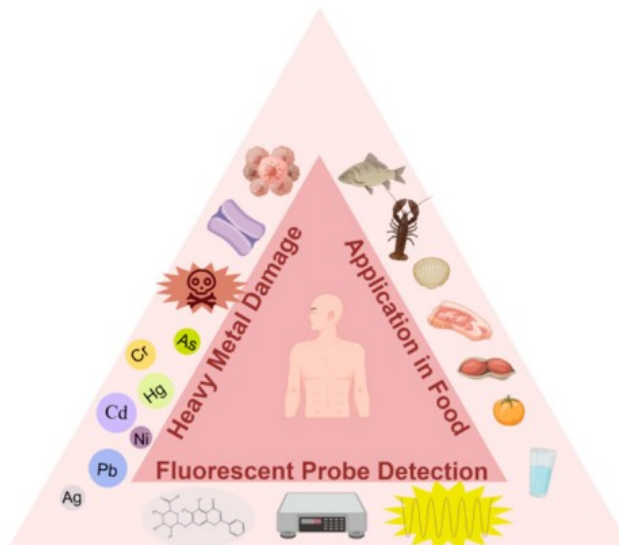


Figura 1. Clasificación de los metales pesados que son perjudiciales para la salud y su método de detección en alimentos. La determinación de metales pesado se puede realizando nuevos métodos como espectrometría de absorción atómica, fluorescencia de rayos X, entre otras. (Lai *et al.*, 2023)

Fuentes de metales pesados

Los metales pesados afectan distintos ecosistemas, acuáticos y terrestres, principalmente suelos, debido a actividades antropogénicas que provocan contaminación en la naturaleza y los seres vivos, alterando el equilibrio indispensable para la vida (Guerrero *et al.*, 2020).

Según Nnaji *et al.* (2023) las fuentes de emisión por metales pesados se clasifican en naturales y antropogénicas (Figura 2):

- Naturales: deposición atmosférica, erupciones volcánicas, formación del suelo, meteorización de rocas, rocas sedimentarias.
- Antropogénicas: desechos metálicos, gasolina, pinturas con plomo, aplicación de fertilizantes, pesticidas, lodos de depuradora, estiércol animal, etc.

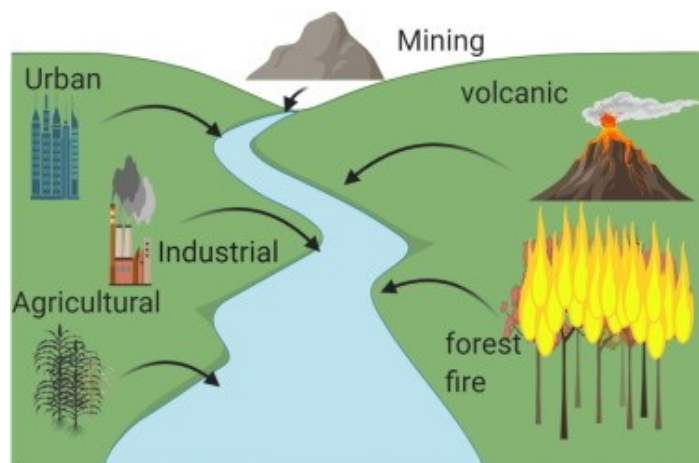


Figura 2. Fuentes naturales y antropogénicas de contaminación por metales pesados y su desembocadura desde los ríos hacia el océano. Las fuentes naturales de metales pesados incluyen los desechos arrastrados por el viento, incendios forestales, erupciones volcánicas, procesos biogénicos y sal marina. Mientras que las causas antropogénicas de la contaminación por metales pesados incluyen operaciones mineras, pesticidas, fertilizantes y el uso de herbicidas (Zaynab *et al.*, 2022).

Mercurio (Hg)

El mercurio es un elemento químico de número atómico de 80 que se encuentra en estado líquido de color gris plateado (Taux *et al.*, 2022). En la naturaleza se encuentra presente como mercurio elemental (Hg), inorgánico (Hg⁺², Hg⁺) y mercurio orgánico (MeHg) y es considerado un metal altamente tóxico para los seres vivos, causando graves problemas de salud como: daño a nivel neuronal debido al estrés oxidativo y aumento de glutamato en el espacio extracelular (Vennam *et al.*, 2019).

Se caracteriza por una alta densidad de 13,534 g/cm³, baja compresibilidad y elevada tensión superficial. Pertenece al grupo XII y al período 6 de la tabla periódica, con un punto de fusión de -38,83 °C y un punto de ebullición de 356,73 °C (Antonia & Rosa, 2018).

Límites máximos permisibles de mercurio (Hg)

Según el Reglamento (CE) nº 1881/2006 de la Comisión, los límites máximos permisibles de mercurio total son de 0,002 mg/L para agua de consumo humano, 0,001 mg/L para aguas de uso agrícola y 0,01 mg/l para agua de uso pecuario (Capriotti *et al.*, 2010). De acuerdo con la norma NTE INEN 1108 (Anexo 2), los límites máximos permitidos de mercurio en sustancias orgánicas para consumo humano son de 0,006 ppm (Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN], 2021).

Contaminación por mercurio (Hg)

Las principales causas de contaminación por mercurio son debido a procesos industriales y naturales como: volcanes, la minera de oro y plata, la fabricación de cemento, quema de basura y empresas que aún usan el carbón como materia prima para el funcionamiento de sus máquinas, estos procesos liberan contaminantes al medio ambiente que luego terminan en contacto con los seres vivos debido a que los residuos obtenidos por estas empresas llegan a desembocar a los ríos donde los peces y otras especies acuáticas son los animales más afectados (Pant *et al.*, 2024).

El mercurio en su estado volátil puede llegar a depositarse en los suelos y en aguas mediante diferentes vías de transferencia, siendo estos sitios muy expuestos a la contaminación y en donde los seres vivos están presentes y en comparación a otros metales pesados, su proceso de eliminación en el ecosistema conlleva varios procesos muy sofisticados que requiere de tecnología como: la oxidación, reducción y absorción para que el mercurio llegue a ser nocivo para los seres vivos (Pavithra *et al.*, 2023).

Toxicidad del mercurio (Hg)

El mercurio es un elemento considerado altamente tóxico para la vida, llegando a provocar diferentes tipos de enfermedades como insuficiencia orgánica, deformaciones en los fetos y en especial ataca el sistema nervioso central, debido que altera las funciones celulares, inhibiendo las proteínas y enzimas que son producidas por las células, las cuales son modificadas hasta un proceso de muerte celular (Dack et al., 2022). En el cuerpo humano el mercurio ingresa y se transporta por el torrente sanguíneo hacia diferentes órganos pasando por el cerebro hacia la médula espinal, las neuronas periféricas hasta llegar a su destino final que son los ganglios autónomos que son un conjunto de cuerpos neuronales ubicados fuera del Sistema Nervioso Central, en donde se almacena y se adhiere fuertemente causando diferentes síntomas (Paduraru *et al.*, 2022)



Figura 3. Estado líquido del mercurio presente naturalmente en el ambiente. La imagen muestra mercurio líquido en una superficie reflectante, donde un gotero libera pequeñas gotas plateadas que se agrupan en formas esféricas por su alta tensión superficial. El fondo oscuro resalta el brillo metálico del mercurio, ideal para ilustrar sus propiedades físicas o aplicaciones científicas (Navas-Jaramillo, 2024).

Ciclo de mercurio (Hg)

El metilmercurio (MeHg^+) es un compuesto orgánico que está unido a un carbono, siendo la forma más biodisponible en la tierra (Dack *et al.*, 2021). Se produce por la biometilación del mercurio orgánico por microorganismos acuáticos presentes en los océanos, llegando acumularse en los peces, los cuales representan una parte principal de la cadena alimentaria de los seres vivos (Figura 4) (Ke *et al.*, 2019).

El metilmercurio (MeHg^+) representa una grave preocupación tanto para la salud humana como para los ecosistemas debido a su naturaleza como una neurotoxina potente derivada del mercurio orgánico (Hg II), que se absorbe fácilmente en la corriente sanguínea (Gionfriddo *et al.*, 2024).

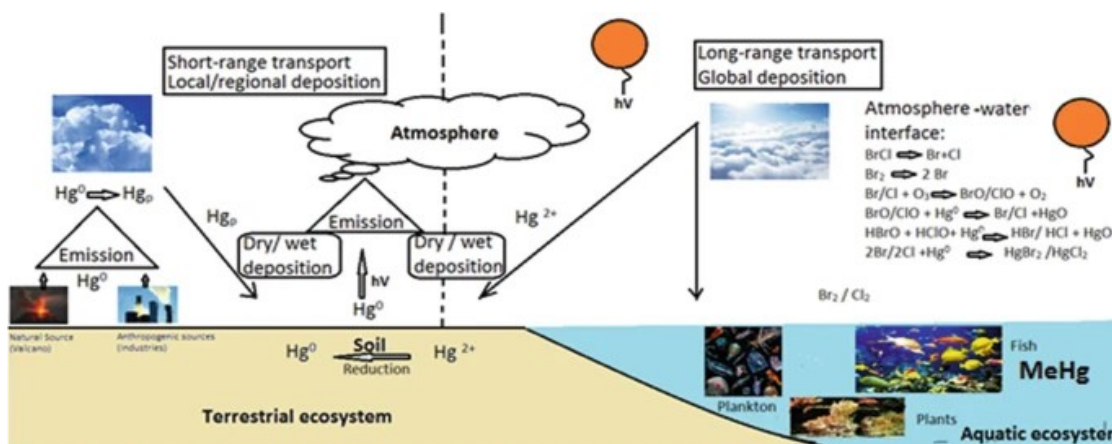


Figura 4. Ciclo del mercurio de forma natural o antropogénica y su transformación a metilmercurio presente en peces del océano. El mercurio suele estar biodisponible e ingresar a la red alimentaria como Metilmercurio, que puede magnificarse a medida que asciende por la cadena alimentaria. La forma natural del mercurio que se excreta fuera del área industrial es el mercurio inorgánico, iones de mercurio (II) y mercurio elemental. El mercurio elemental Hg^0 , existe en forma de líquido volátil procedente del flujo suelo-aire y otras liberaciones antropogénicas. Este mercurio puede convertirse de Hg^{2+} mediante oxidación y eventualmente residirá en el suelo o en el agua, para posteriormente convertirse en metilmercurio mediante un proceso de metilación por acción de bacterias anaeróbicas reductoras de azufre (Siddiqi, 2019b).

Existen algunas bacterias que tienen la capacidad de tolerar y desintoxicar el mercurio presente en el ambiente como *Escherichia coli*, *Bacillus* o *Streptomyces*, demostrando un papel importante en el ciclo del mercurio a través de procesos de oxidación o bioacumulación que se dan por la actividad hidroxidrolasa-catalasa (Bielko et al., 2023). La resistencia a mercurio se encuentra presente principalmente en bacterias Gramnegativas y esto se debe a la presencia del operón *merR*, siendo una de las primeras estrategias de defensas contra el mercurio y/o compuestos relacionados (Somayaji et al., 2022).

Operon *mer*

El operón *mer* es un conjunto de genes que funcionan de manera coordinada para conferir resistencia al mercurio en bacterias, lo que resulta esencial para su capacidad de supervivencia en entornos contaminados. (Registry of Standard Biological Parts [Jessica Tarnowski], 2014). El operón *mer* desempeña un papel fundamental en la conversión y neutralización del metilmercurio mediante la enzima MerB y en la detoxificación del mercurio inorgánico a través de MerA. Además, incluye varios genes que codifican proteínas transportadoras de membrana, como MerC, MerE, MerF, MerG, MerP y MerT, todos ellos esenciales para la resistencia bacteriana al mercurio (Bhat et al., 2024).

Gen *merR*

La familia de *merR* permite la sensibilidad a un sin número de metales, que dan lugar a la capacidad de construir sistemas de detección para dichos metales, debido al control estricto de la transcripción por medio de los factores transcripcionales (Ghataora *et al.*, 2023).

Se distinguen por la formación de complejos abiertos y de la activación de factores transcripcionales que actúan en promotores con un espaciador de 19bp que ocurre durante la unión al metal, distinguiendo su alta conservación en el dominio de unión al ADN y baja similitud de aminoácidos en el dominio de unión al efector C-terminal (Pellizza *et al.*, 2022). La proteína del operón *merR* es un factor de transcripción que regula la resistencia a mercurio y se encuentra constituido por un dominio de unión N-terminal, una hélice de dimerización central y un dominio de unión al ligando C-terminal (Fang & Zhang, 2021). Se caracteriza por su funcionalidad represora y activadora presentando una estructura cuaternaria independientemente de la presencia de iones de mercurio y/o compuestos asociados al mismo (Jung & Lee, 2019).

Gen *merA*

El gen *merA* es esencial para la reducción de mercurio en bacterias, ayudando a transformar iones mercuriales tóxicos en formas menos dañinas convirtiendo el ion mercurio (Hg^{2+}) en mercurio elemental (Hg^0), menos tóxico y más volátil (Trojańska *et al.*, 2022). Este proceso es esencial para la detoxificación del mercurio en microorganismos y plantas. En la fitorremediación, se utiliza en plantas transgénicas para eliminar el mercurio de suelos contaminados. Combinada con la enzima MerB, que transforma mercurio orgánico en mercurio inorgánico, MerA facilita la reducción y liberación del

mercurio, permitiendo que las plantas acumulen menos mercurio tóxico y produzcan alimentos más seguros (Li *et al.*, 2020).



Figura 5. Proyección en 3D de MerA. Estructura individual de la proteína MerA compuesta por dos subunidades idénticas (homodimeros), con un peso molecular de 125 kDA. (Shearer *et al.*, 2023)

Gen *merB*

El gen *merB*, que abarca 16 kilo bases, codifica una liasa esencial para la eliminación de compuestos tóxicos como el metilmercurio facilitando la conversión del compuesto altamente nocivo, en mercurio (Hg^{2+}) mediante la ruptura de enlaces carbono-mercurio a través de un proceso conocido como proteólisis (Figura 6), dicha enzima MerB, es parte del sistema de resistencia a mercurio (Mer) en algunas bacterias y juega un papel crucial en la desintoxicación de mercurio orgánico (Takanezawa *et al.*, 2019).

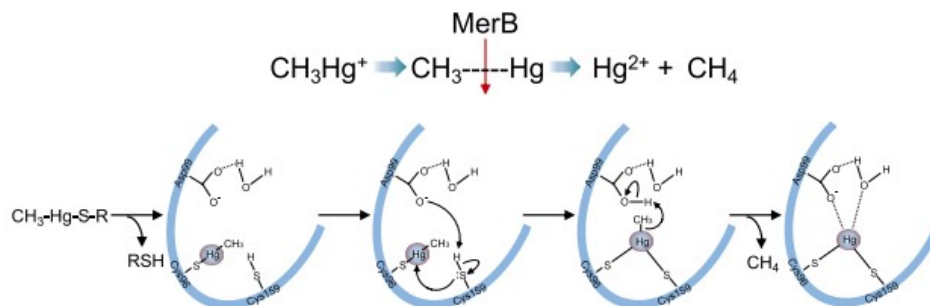


Figura 6. Diagrama que ilustra la reacción catalítica de la enzima MerB. Mecanismo de acción de la enzima MerB, que cataliza la descomposición del metilmercurio (CH_3Hg^+) en mercurio inorgánico (Hg^{2+}) y metano (CH_4), contribuyendo a la desintoxicación celular (Takanezawa *et al.*, 2023).

Técnicas de medición de mercurio (Hg)

Se han desarrollado técnicas como la espectrometría de absorción atómica (AAS), la espectrometría de emisión óptica de plasma acoplada inductivamente (ICP-OES), Microscopía electrónica de barrido (SEM) para la detección y medición de mercurio, debido a su alta toxicidad y a la necesidad de detectar concentraciones mínimas que pueden variar significativamente (Chirita *et al.*, 2023).

Espectroscopía de Absorción Atómica vapor frío (VC-AAS)

La espectroscopía de absorción atómica vapor frío es un método altamente sensible y selectivo para la detección de mercurio en diversas muestras complejas. Aprovecha la presión de vapor del mercurio a temperatura ambiente para reducir sus iones a mercurio gaseoso, que luego es arrastrado por un gas inerte hacia una célula de absorción de cuarzo. Esta técnica permite una introducción eficiente del mercurio en estado gaseoso a la fuente espectral, midiendo a 253,7 nm y logrando detectar

concentraciones extremadamente bajas, incluso en $\mu\text{g L}^{-1}$ o ng L^{-1} , lo que la hace ideal para análisis de rutina en laboratorios. Espectroscopia de Absorción Atómica con generación de hidruro (HG-AAS)

Espectroscopía de Absorción Atómica con generación de hidruro (HG-AAS CVG-HR-CS-QTAAS)

Es un método extremadamente sensible y selectivo para la detección de mercurio en muestras complejas. Este método se destaca por su capacidad de aprovechar la presión de vapor del mercurio a temperatura ambiente, permitiendo la reducción de iones de mercurio a su forma gaseosa. Después, este mercurio se transporta por un gas inerte hacia una célula de absorción de cuarzo, donde mide a 253,7 nm. La técnica es ideal para detectar concentraciones muy bajas de mercurio, lo que la hace útil para análisis de rutina en laboratorios. Además, su alta sensibilidad y la posibilidad de evitar interferencias no espectrales lo hacen especialmente valioso en el análisis de matrices complejas (Chirita *et al.*, 2023).

Espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES)

Para un monitoreo adecuado de los niveles de macro, micro y oligoelementos en alimentos como los cítricos, es vital realizar mediciones analíticas de forma regular. Cualquier variación que supere los límites críticos puede causar alteraciones importantes en el sistema fisiológico. Las técnicas de análisis más recomendadas para este propósito son ICP-MS e ICP-OES, debido a su alta sensibilidad, selectividad y capacidad para realizar análisis de varios elementos simultáneamente (Sloop *et al.*, 2022).

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido (SEM) es una técnica poderosa utilizada para examinar las superficies de los materiales con gran precisión. Esta metodología ha evolucionado para incluir capacidades avanzadas mediante la integración de detectores de transmisión, como los de microscopía electrónica de transmisión (STEM). La combinación de SEM y STEM permite no solo obtener imágenes detalladas de la topografía superficial, sino también realizar análisis detallados de la composición química de las muestras. En el caso de la detección de mercurio, esta técnica resulta muy útil, ya que puede identificar de manera precisa la presencia de este metal en concentraciones muy bajas y estudiar su distribución en distintas matrices, ofreciendo información valiosa para la evaluación de contaminantes en materiales diversos (Sun *et al.*, 2020).

Biosensor

Es un dispositivo usado como estrategia analítica donde su estructura se basa en un elemento biomimético unido a un sistema de transductores que emitirán la señal que se desea cuantificar de un contaminante, se clasifican en: biosensores de células libre, células completas, no específicos y los específicos (Huang *et al.*, 2023). Su principal funcionamiento es la detección de un analito de interés que se unirá al sitio específico del sensor biológico para su inmovilización (Velasco-Garcia & Mottram, 2003).

Los biosensores contemplan 4 partes importantes para su desarrollo: el receptor que es encargado de unirse a la muestra, un interfaz que ayuda en la conexión entre el receptor y el transductor, un transductor que se encarga de traducir la información

recibida en señales eléctricas, que luego pasará por un procesamiento de datos que permitirá dar un resultado adecuado para la interpretación (Figura 7) (Song *et al.*, 2021).

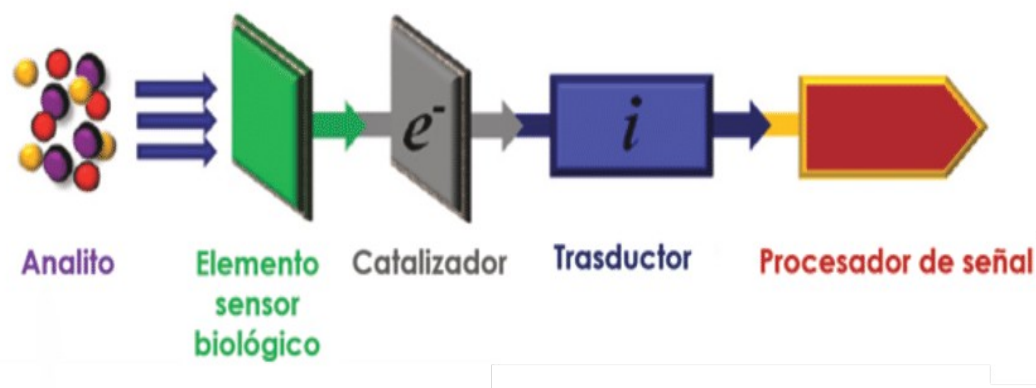


Figura 7. Estructura principal de un biosensor para detectar un analito de interés. Un biosensor está compuesto por varios elementos clave: una estructura de medición que es fundamental para la detección del analito de interés, un sensor biológico que facilita esta detección, y un catalizador que acelera el proceso. La señal obtenida es luego traducida y enviada al procesador de señales para generar una respuesta (Aguilar-Tapia & Zanella, 2018).

Como nos indica Naresh & Lee, 2021 un biosensor debe contar con las siguientes características:

- Selectividad: Característica importante que nos permite analizar un analito específico en presencia de otros elementos que no se desea analizar.
- Sensibilidad: Refiere a la capacidad de detectar un analito específico, referente a la mínima cantidad de concentración que puede estar presente en una muestra.
- Linealidad: Contribuye en la precisión de los resultados obtenidos de una muestra, cuanto mayor sea la linealidad, más preciso será el resultado obtenido.

- Tiempo de respuesta: Es el tiempo necesario para la realización del diagnóstico.
- Reproducibilidad: Se caracteriza por la capacidad de producir respuestas iguales, cuantas veces sea necesaria en una muestra y se acerca al valor real, destacando la precisión y exactitud durante el procedimiento.
- Estabilidad: Es el rango de vulnerabilidad que afecta en el resultado de las pruebas realizadas por el biosensor, debido a la presencia de factores físico, ambientales dentro y fuera del biosensor.

Constructo del biosensor

Vector plasmídico

Los plásmidos son usados ampliamente en el área de biotecnología e ingeniería genética como herramientas para el desarrollo de varios productos, y se dieron a conocer por primera vez en el papel de propagación de la resistencia a los antibióticos y son considerados elementos extracromosómicos encargados de la diferenciación entre especies (Rouches *et al.*, 2022).

Son muchos medios de transporte implicados en la transferencia de genes entre organismos, su estructura es casi idéntica a la de su cromosoma y se encuentra constituida por una cadena bicentenaria circular o lineal que permite adquirir habilidades durante su evolución, que en algunos casos no son necesarias para ciertos organismos (Briones, 2023).

La mayoría de los plásmidos son usados para estudio de nuevas estructuras genéticas capaces de producir nuevas proteínas, en comparación a sus progenitores, estas estructuras plasmídicas cuentan con secciones que son modificadas para la identificación o expresión de genes de interés, como son: un origen de replicación “ori”, un marcador de resistencia a un antibiótico y un origen de inserción de ADN exógeno (Figura 8) (Timmons & Densmore, 2020).

Para construir una secuencia plasmídica, debe constar de dos partes principales: un esqueleto y un casete de expresión en el que estarán presentes secuencias promotoras que regulan el proceso de traducción, sitio de unión a ribosomas y los genes que permitirán obtener una proteína de interés, y un terminador que detendrá el proceso de traducción del plásmido (Boye *et al.*, 2022).

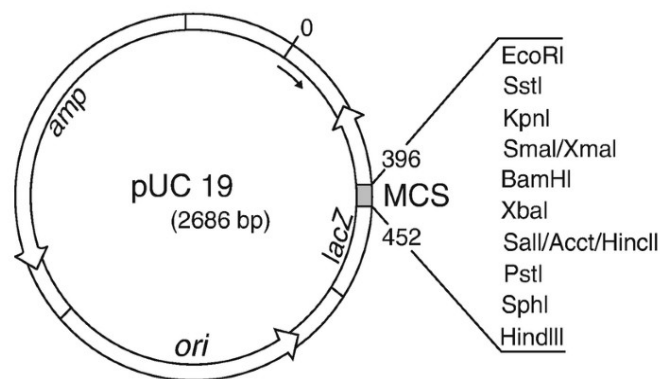


Figura 8. Estructura de un vector con las regiones de resistencia antibiótico, origen de replicación y sitio de restricción. El plásmido pUC de 2686 bp fue aislado a partir de *E. coli* que posee un sitio múltiple de clonación de 54bp con 13 sitios de corte para enzimas de restricción. Además, este plasmido posee resistencia a ampicilina e incorpora el operón *lacZ*. (Gautam, 2022).

Proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein – GFP)

Las proteínas fluorescentes son un grupo de proteínas utilizadas como etiquetas fluorescentes debido a su variabilidad genética que permite obtener una escala de

colores desde azul hasta rojo, su estructura está constituida de una sección de barril β cilíndrico, compuesto por 11 cadenas β , y un cromóforo formado dentro del barril β (Zhou *et al.*, 2020).

Hoy en día existen variedad de tipos de biosensores que son usados para la detección de analitos, uno de ellos son los biosensores basados en proteínas fluorescentes (FP) que permiten una amplia región espectral de colores, y debido al uso de luz de excitación por longitud de onda es considerado un riesgo menor porque permite la reducción de la fototoxicidad y la autofluorescencia durante la detección de los analitos (Zhang & Ai, 2020).

La proteína verde fluorescente (Figura 9) fue descubierta a inicios de la década de 1960 por el químico Osamu Shimomura, proveniente de la medusa *Aequorea victoria* la cual es considerada un organismo poco común (Ashworth *et al.*, 2022). Tiene un peso de alrededor de 26,9 kDa y constituido por 238 aminoácidos (aa), su núcleo se encuentra situado en el centro de un barril β de 11 hebras, formando un complejo que permite la unión de aminoácidos Ser65-Tyr66-Gly67 durante la reacción (Yang *et al.*, 2019).

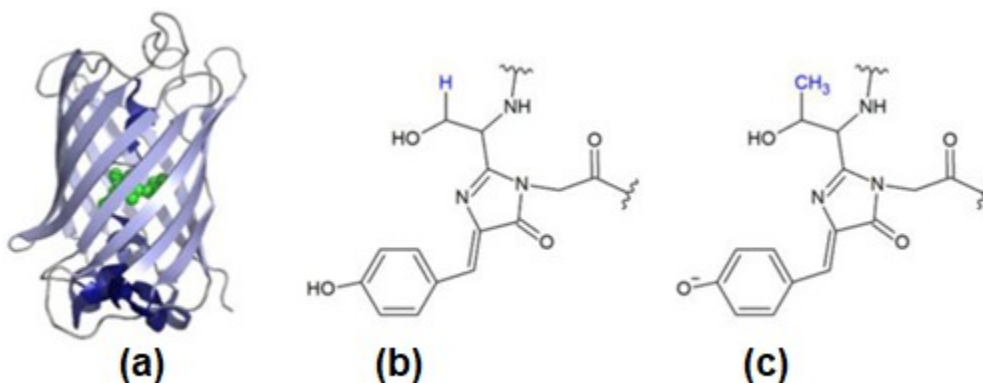


Figura 9. Estructura 3D y química de la proteína verde fluorescente GFP. (a) Estructura tridimensional de la proteína GFP, visualizando el sitio activo de cromóforo. (b) Estructura química del cromóforo de la proteína GFP aislada de *Aequorea victoria*. (c) Estructura química del cromóforo de la proteína GFP modificada con treonina en la posición 65 para una mejor visualización del cromóforo en presencia de luz azul (Krasowska *et al.*, 2021).

Células competentes

Las células competentes son células que tiene la capacidad de absorber material genético de su exterior, mediante un proceso de transformación natural como; conjugación y traducción, y transformación artificial como: electroporación o química usando cloruro de calcio, haciendo que las células tengan la capacidad expresar la información genética adquirida (iGEM [International Genetically Engineered Machine], 2019).

- Electroporación: La electroporación es una técnica de transformación en la que se aplica un campo eléctrico a las células, lo que provoca la apertura de microporos en sus membranas incrementando notablemente la permeabilidad de la membrana celular, permitiendo la entrada de macromoléculas extrañas como el ADN. Este método se centra en alterar el genoma nuclear (Mosey *et al.*, 2021).
- Químico-competencia: Usando una mezcla de sales e intervalos de cambios de temperatura entre 37 °C y 42 °C por medio de choques térmicos, las células son inducidas a abrir los poros presentes en la membrana celular permitiendo lograr adquirir el material genético presente en la solución, convirtiendo estas células en

células competentes capaces de expresar la información genética adquirida luego del proceso (Deshmukh *et al.*, 2022).

MARCO METODOLÓGICO

Lugar de desarrollo de la investigación

La investigación se realizó en los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana sede Guayaquil-Ecuador, en el km 19,5 vía la Costa.

Zona de muestreo

La elección de las zonas de muestreo se debe a la alta concentración de mercurio presente en el estero salado ubicado en el golfo de Guayaquil-Ecuador. Según Calle *et al* . (2018) las concentraciones excedían el límite máximo permisible de mercurio, en el cual a partir del 2008 se contabilizaron concentraciones de mercurio de 2.76 ± 1.88 mg kg⁻¹ dw, 2009 de 2.40 ± 1.60 mg kg⁻¹ dw, y en el 2014 las concentraciones de mercurio se encontraban en $1,03 \pm 0,32$ mg kg⁻¹ ps.

La metodología de muestreo es no probabilística por criterio, donde se recolectaron muestras de los 3 puntos como se muestra en la Tabla 1, tomando una única muestra en los diferentes puntos antes mencionados para los análisis microbiológicos.

Tabla 1. Descripción de los lugares de muestreo considerados en la investigación

Puntos	Lugar de muestreo	Coordenadas
P1	Puente velero	-2.1887692718156897 -79.90094316204073

P2	Puente 5 de Julio	-2.1860246943946464 -79.8984648064553
P3	Puente Urdesa	-2.177053910507212, -79.90355841150205

Fuente: (Autores,2024)

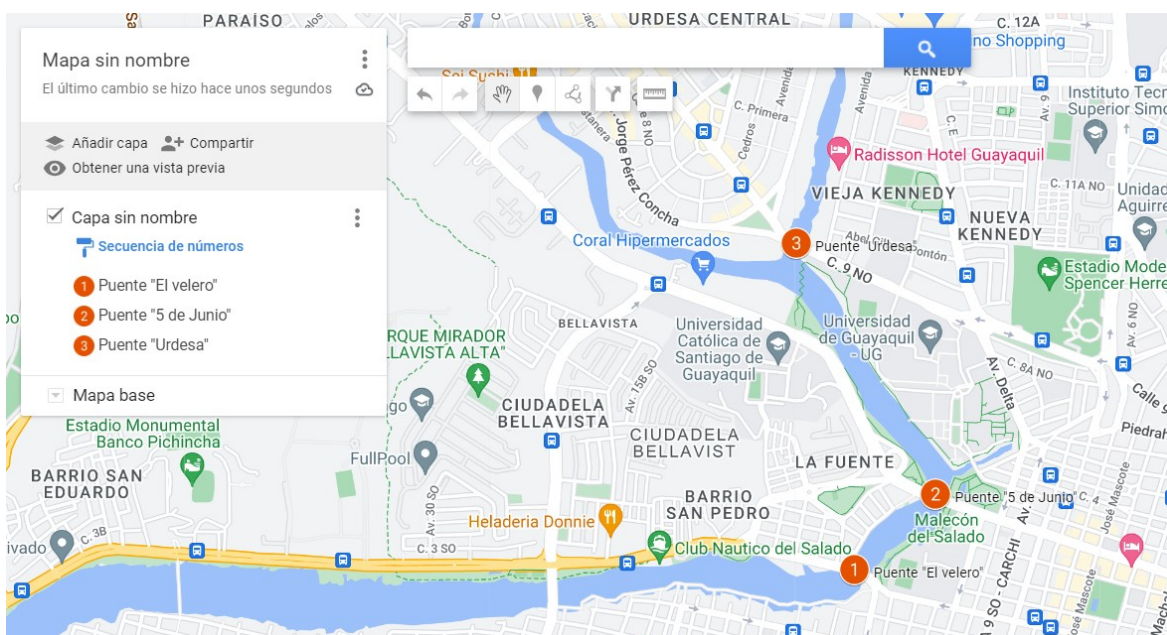


Figura 10. Puntos de muestreo en el Estero Salado en Ecuador. Se seleccionaron tres puntos de muestreos en el Golfo de Guayaquil, específicamente Puente “El velero”, Puente “5 de Junio” y Puente “Urdesa” (Autores,2024).

Recolección de la muestra

La muestra se recolectó invertidamente, con la tapa hacia abajo, sumergiéndola en el agua para la recolección directa de la muestra y se colocaron en una hielera para su transporte al laboratorio de la Universidad Politécnica Salesiana sede Guayaquil-Ecuador.

En base a la Norma NTE INEN 2176:2013 (Anexo 5) se usaron recipientes de plástico de la mejor calidad con tapa tipo tornillo, bandas elásticas de silicona libres de

contaminantes tóxicos y microorganismos, las botellas plásticas que se lavaron con detergente y con agua destilada para la recolección (García-Ávila *et al.*, 2020).

Según lo establecido por la Norma NTE INEN 1105:1983, la esterilización de los utensilios usados para la recolección de la muestra y el aislamiento fueron autolavados a una temperatura de 120°C por 15 minutos (González-Osorio *et al.*, 2022).

Aislamiento e identificación

Aislamiento

Después de recolectar las muestras, se unificaron para obtener un volumen final de 600 mL, que se utilizó como solución madre con el objetivo de obtener un recuento significativo de microorganismos. A partir de esta solución madre, se realizaron diluciones seriadas con un factor de dilución de 1:10, desde 10^{-1} hasta 10^{-10} , manteniendo la homogeneidad durante el proceso. Luego, se inocularon por duplicado en medio de cultivo Mueller-Hinton (MH) (Titan Media, MeDILW01, USA) y se utilizaron placas CompactDry® EC (Shimadzu Diagnostics Corporation, Tokyo, Japan) para la detección de *Enterobacterias totales* (colonias de color rojo/rosa) y *Escherichia coli*. (colonias azules). Posteriormente, las muestras se incubaron en una incubadora de la marca (B055F, Elos Breed) a 37°C durante un período de 24 a 48 horas. Tras la incubación, se procedió al conteo de colonias (Alderman & Smith, 2001).

Identificación macroscópica

Una vez pasado el tiempo de incubación se observó con un estereoscopio las características morfológicas de las colonias como; el tamaño (Puntiforme, pequeña, mediana, grande), forma (circular, fusiforme, rizoide, filamentosa, irregular), tipo de borde (entero, rizoide, filamentoso, ondulado, lobulado, rizado), transparencia (opaca, transparente), brillo (sin brillo, con brillo), color (no pigmentadas, pigmentadas), textura (lisa, rugosa), elevación (plana, elevada, convexa, pulvinada, umbilicada), consistencia (dura, suave, mucoide).

Identificación microscópica

Se preparó un frotis sobre una placa portaobjeto que se sometió a la tinción de Gram. Primero, se aplicó cristal violeta (Quimical Scientipic Diagnostic, CRIVIONOV18/25) durante 60 segundos, seguido por una aplicación de solución de Lugol durante 60 segundos. Luego, se trató la muestra con una mezcla de alcohol-acetona durante 10 segundos. Finalmente, se añadió safranina (LOBA CHEMIE OVT.LTD., 50240) durante 30 segundos. Entre cada paso, se lavó la muestra con agua destilada para eliminar los reactivos. La observación microscópica se realizó con un objetivo de 100x para determinar si las bacterias eran Gram positivas o Gram negativas (Tripathi & Sapra, 2023).

Después de la observación microscópica de las colonias aisladas en el medio Mueller-Hinton, que presentaron un bajo nivel de crecimiento microbiano, se realizó una resiembra en medio MacConkey (Merck Millipore, 1002050500, Alemania) para la obtención de bacterias Gramnegativas.

Pruebas de identificación bioquímicas

En base a Villota-Calvachi *et al.* (2022) se realizaron las pruebas bioquímicas de: catalasa, citrato, urea, TSI (Sulfuro - Indol - Movilidad), SIM (Sulfuro - Indol - Movilidad), I isina y que nos permitirá identificar qué tipo de microorganismo se encuentra presente en el medio de cultivo.

Prueba de catalasa

La prueba de catalasa se realizó con peróxido de hidrogeno (Merck, mfc00011333, Alemania) donde se colocó 1 gota de H₂O₂ en un portaobjeto y con un asa se inoculo la bacteria de investigación, en el cual se podrá observar si existe o no formación de burbujas.

Prueba del citrato

Se realizo en tubos inclinados con medio de citrato (Condalab,1014, España) con ayuda de un asa en punta se tomó una colonia y se inoculo en forma de estría en el pico del medio inclinado, posteriormente de llevo a incubar a 35°C durante 24 a 48 horas con la tapa semiabierta.

Prueba de urea

Se realizo en tubos inclinados con medio de urea (Condalab, 2180, España) con ayuda de un asa en punta se tomó una colonia y se inoculo en la superficie del agar inclinado posteriormente se insertó el asa en la base del medio. Se llevo a incubar a 35 °C con la tapa semiabierta durante 24 a 36 horas.

Prueba de SIM

Se realizo en tubos rectos con medio semisólido de SIM (Condalab,1514, España) con ayuda de un asa de punta se seleccionó una colonia aislada y se introdujo de manera recta hasta la mitad del medio. Se llevo a incubar a 35 °C con la tapa semiabierta durante 18 a 24 horas, luego se adiciono 4 gotas del reactivo de Kovacs para la observación de producción de indol.

Prueba de lisina

Se realizo en tubos inclinados con medio lisina (Condalab,1208, España) con ayuda de un asa de punta se seleccionó una colonia asilas y se inoculo en la base del medio con 3 pinchadas seguido se realizó una siembra en estría en la superficie del medio. Se llevo a incubar a 35 °C con la tapa semiabierta durante 24 a 36 horas.

Prueba TSI

Se realizo en tubos inclinado con medio TSI (Condalab, 1046, España) con ayuda de un asa en punta se selecciona una colonia aislada y se pica el fondo de la base y se realiza una extensión en estría en la superficie del medio. Se llevo a incubar a 35 °C con la tapa semiabierta durante 24 horas.

Diseño del inserto mediante herramientas bioinformáticas

Para la elaboración del constructo se realizó una búsqueda en la base de datos en el NCBI (National Center for Biotechnology Information) y iGEM (International Genetically Engineered Machine), para la simulación gráfica del constructo se la realizo mediante el programa Tinkercell (Version: 1.2.926, BSD License), y el desarrollo del inserto junto con el vector se la realizo mediante el programa SnapGene (Versión: 7.2.1, EE.UU.). Una vez realizado el inserto se mandó a sintetizar a la compañía MACROGEN Inc Korea.

El inserto está diseñado en dos regiones. La primera región está estructurada por un promotor constitutivo, seguido de un RBS, el gen *merR* y su terminador. La segunda región está estructurada por un promotor *PmerT*, la secuencia RBS, y el gen de la proteína reportera GFP (Green Fluorescent Protein) y el terminador como se detalla en la Tabla 2.

El vector backbone usado es el pSB1C3 (Novoprolabs, V012415, USA) estructurado por un gen de resistencia a cloranfenicol (*CmR*), sitio de restricción y un origen de replicación (ori) como se indica en la figura 11. (Gräwe *et al.*, 2019).

Tabla 2. Características de las regiones del inserto

Región	Secuencias reguladoras	Código de la secuencia
1era Región	Promotor constitutivo	J23104
	RBS	B0034
	Gen <i>merR</i> y Terminador	K1758340
2da Región	Promotor PmerT	K346002
	RBS	B0034
	Proteína reportera GFP y terminador	K1789003

Fuente: (Autores, 2024).

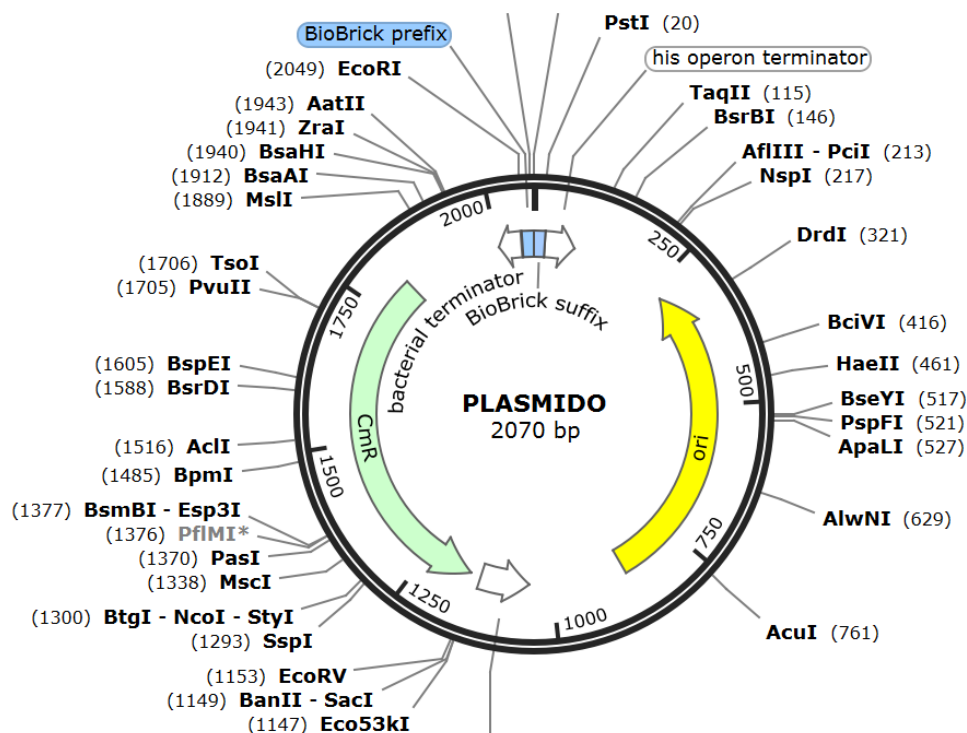


Figura 11. Estructura plásmido pSB1C3. El pSB1C3 es una estructura plásmidica que en su interior contiene el gen *CmR* el cual transmite la resistencia al cloranfenicol, contiene *EcoRI* y *PstI* que son puntos de cortes en el plásmido, además tiene un origen de replicación es un *pMB1* (Shehata, 2018).

Clonamiento

Digestión del inserto

En un tubo Eppendorf de 0.5 mL, se agregaron 7 μ L del inserto, 1 μ L de la enzima FastDigest EcoRI (#FD0274, Thermo Scientific, United States), 1 μ L de la enzima FastDigest PstI (#FD0614, Thermo Scientific, United States), 2 μ L del buffer FastDigest a una concentración de 10X, y se aforó con 9 μ L de agua libre de nucleasa de la marca Thermo Scientific (#R0581, Thermo Scientific, USA) hasta obtener un volumen de 20 μ L. La mezcla se homogeneizó suavemente con una pipeta, evitando la formación de burbujas y se llevó a vortex durante 1 minuto. Posteriormente, se llevó a incubación a 37 °C durante 15 minutos en un termociclador (miniPCR BIO, QP-1000-16, USA). Para inactivar las enzimas se incubó a 80 °C durante 5 minutos.

Digestión del plasmido pSB1C3

En un tubo Eppendorf de 0.5 mL, se agregaron 8 μ L del inserto, 1 μ L de la enzima FastDigest EcoRI, 1 μ L de la enzima FastDigest PstI, 2 μ L del buffer FastDigest a una concentración de 10X, y 1 μ L de fosfatasa alcalina termosensible (#EF0651, Thermo Scientific, USA). Luego, se aforó con 7 μ L de agua libre de nucleasas hasta obtener un volumen de 20 μ L. La mezcla se homogeneizó suavemente con una pipeta, evitando la formación de burbujas, y se llevó a vortex durante 1 minuto. Luego se incubó a 37 °C durante 15 minutos en un termociclador de la marca miniPCR® mini16. Posteriormente se incubó a 80 °C durante 5 minutos.

Verificación de digestión

Para se realizó un gel de agarosa al 1% (#CM02852, ABclonal, Germany) con 3 μ L de bromuro de etidio (#J66192.03, Thermo Scientific, USA), el cual se gelificó en la cámara de electroforesis de la marca BlueGel™ (QP-1500-01, BlueGel™, EE. UU). En el primer pocillo se colocó 3 μ L del marcador de peso molecular (ladder) Opti-DNA de 100 pb (#G106, abm, EE. UU), luego en el segundo pocillo 25 μ L de la muestra del inserto y en el tercer pocillo 25 μ L del vector, previamente preparados en la digestión. La electroforesis se corrió durante 1 a 2 horas a 70 voltios.

Purificación

Para el proceso de purificación del inserto y el vector se usó el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (A6750, Promega, USA). Luego de la observación de las bandas del inserto y el vector en el gel de agarosa, se realizaron los cortes de las bandas y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml registrando el peso del gel para cada uno.

Se agrego la solución de unión de membrana (A9281, Promega, EE. UU) en una proporción de 1 μ L por 1 mg de porción de gel de agarosa y se realizó vortex, luego se llevó a incubación entre 50-65 °C durante 10 minutos hasta que la porción del gel se disuelva por completo.

En un conjunto de minicolumna SV se transfirió la mezcla de gel disuelto e incubo durante 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugo a 14 000 rpm durante 1 minuto. Se retiró la minicolumna SV del conjunto y se desechó el líquido del tubo recolector. En

un nuevo tubo recolector se colocó la minicolumna con 700 μL de solución de lavado de membrana y se centrifugó a 14 000 rpm durante 1 minuto. Se repitió el proceso anterior con 500 μL de solución de lavado de membrana, centrifugando a 14 000 rpm por 5 minutos.

Posteriormente se transfirió la minicolumna SV a un tubo eppendorf limpio de 1,5 ml con 50 μL agua libre de nucleasas (#R0581) dentro de la minicolumna SV, se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto y posteriormente se centrifugó a 14 000 rpm durante 1 minuto. Finalmente se desecha la minicolumna SV obteniendo el producto final en el tubo eppendorf.

La obtención del producto final del inserto y vector purificado, se verificó mediante una cuantificación de la concentración y calidad del ADN empleando Thermo Scientifics NanoDrop 2000c Spectrophometer, agregando 2 μL de la muestra en el lector y obteniendo 23.1 ng/ μL del inserto y 20.3 ng/ μL del vector respectivamente.

Ligación

Una vez purificados el inserto y el vector, se llevó a cabo el proceso de ligación con la enzima Ligasa de ADN T4 (5U/ μL) (Thermo Scientific™, EL0014, USA). Para el cálculo de los volúmenes requeridos del inserto y del vector, se usó el programa nebiocalculator (SOFTWARE, VERSION 1.15.7, NEW ENGLAND BIOLABS), donde se ingresó las concentraciones y los pares de bases del inserto en relación molar 7:1 sobre el vector, obtenido los resultados se preparó la solución con 2,5 μL del vector, 12 μL del inserto, 2 μL de 10x ADN T4 tampón de ligasa, 0,4 U (Thermo Scientific, EL0016, USA) y

3,5 μ L de agua libre de nucleasas, obteniendo un volumen final de 20 μ L. Posteriormente la mezcla se llevó a vortex y se incubó durante 1 hora a 22 °C. Finalmente, la ligasa se inactivó mediante un tratamiento térmico a 65 grados centígrados durante 10 minutos.

Bacterias quimio competentes.

Las bacterias previamente asiladas e identificadas fueron sometidas a tratamiento de quimio competencia, donde se inoculo una colonia de la bacteria en 15 mL medio en caldo de Luria Bertani (LB) (Condalab, 1551, España) previamente autoclavado, al cual se le añadió 0,525 mL de sulfato de magnesio estéril a una concentración de 35 mM y 0,375 mL glucosa al 1% esterilizado mediante filtrado por membrana de jeringa, luego se llevó a incubación a 37°C con agitación y con el equipo de Thermo Scientifics NanoDrop 2000c Spectrophometer se midió el OD600 hasta un valor de entre 0,4 y 0,6.

Posteriormente se procedió a enfriar el cultivo a 4°C durante 15 minutos, transfiriendo 2 mL del cultivo a un tubo Eppendorf y centrifugando a 14 000 rpm durante 45 segundos. Se retiró el sobrenadante y se le agregaron 700 μ l de buffer CCMBO helado (10 mL de 10 mM KOAc, 11,8 g/L de 80 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4 g/L de 20 mM de $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2 g/L de 10 mM de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 100 ml/L de 10% glicerol). La mezcla se homogenizo con ligeros movimientos de pipeteo, evitando la formación de burbujas, y se incubó en frío sobre hielo entre 12 a 15 minutos. Luego, se centrifugó nuevamente a 14 000 rpm durante 45 segundos y se colocó en un bloque de enfriamiento para retirar el sobrenadante. Finalmente, se resuspendió el pellet en 100 μ l de buffer CCMBO frío, obteniendo así las células competentes.

Transformación bacteriana

Para el proceso de transformación, se usaron 100 μL de células competentes con 1 μL del plásmido del biosensor luego de la fase de ligación. La mezcla se incubó en hielo durante 20 a 30 minutos. Posteriormente, se realizó un choque térmico a 42°C durante 1 minuto, seguido de una incubación en hielo durante 5 minutos.

Después de la incubación en hielo, se añadió 1 mL de medio Super Optimal Broth SOB (Condalab, 1541, España). La mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora, se centrifugó y se desechó 950 μL del sobrenadante, luego el sedimento se resuspendió con el sobrenadante restante. Se usaron placas Petri con medio LB (Condalab ,1552, España) con el antibiótico cloranfenicol para la siembra del biosensor.

Para la siembra en las placas Petri, se añadió 10 μL del microorganismo en cada placa y se distribuyeron con perlas de vidrio sobre el medio para homogeneizar la muestra. Después se retiraron las perlas y se llevó a incubación a 37 °C por 24 horas. Luego del crecimiento de la bacteria transformada se seleccionó una colonia y se inoculó en 250 ml de medio caldo Lurian Berthani durante 16 horas hasta lograr obtener un OD 600 de entre 0,4 a 0,5 logrando alcanzar la mitad de su fase de crecimiento para posteriormente evaluar el biosensor.

PCR de colonia

Se realizó una PCR de colonia para verificar el vector transformado usando una PCR Máster Mix (9PIM750, Promega, EE. UU), donde se agregó 2,5 μL de los primers Forward y Reverse (Tabla 3) luego se colocó con un asa las colonias seleccionadas

dentro del tubo y se llevó a un termociclador a 95°C por 15 minutos para el proceso de lisis celular, retiro los tubos del termociclador y se agregó la solución de PCR Máster Mix. Las condiciones de amplificación fueron utilizadas para la amplificación: 95°C por 270 segundos, seguida por 30 ciclos con las siguientes características: desnaturalización 95°C por 30 segundos, hibridación a 53°C por 30 segundos y extensión de 68°C por 60 segundos. Luego de realizar el número de ciclos señalados, la etapa de extensión final se realizó a 68°C por 300 segundos. El producto de PCR se verifico por medio de una electroforesis con gel de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. La corrida se realizó por una hora, utilizando 3 µL del marcado de peso molecular.

Tabla 3. Secuencias de los primers Forward y Reverse.

Primer	Secuencia	Tm	GC%	Longitud
Forward	5'-TTCACGAACTTTACGCGCAC-3'	59.77°C	50%	20bp
Reverse	5'-CGTTTCTACCAGCGCAAAGG-3'	59.83°C	55%	20bp

Fuente: (Autores, 2024)

Análisis del biosensor

Sensibilidad

Para determinar la capacidad que tiene el biosensor de detectar el mercurio, se evaluaron las siguientes concentraciones: 0,5; 0,75; 1; 1,5; 1,75; 2; 2,25; 2,50; 2,75; 3; 3,25 ppm partiendo de Cloruro de mercurio al 5%. En una placa multipocillos se agregó

120 μL de medio caldo Luria Bertani (LB, 1552, Condalab) con biosensor en fase de crecimiento.

Para la primera fila se agregó por triplicado las concentraciones antes mencionadas hasta un volumen de 150 μL dejando las 3 primeras columnas como el control o blanco y posteriormente se realizó una micro dilución con 30 μL desde la fila A hasta la fila H. Una vez que los pocillos estuvieron en un volumen final de 130 μL se llevó a incubación con agitación a 37° por 16 horas. Pasado las 16 horas se llevó al lector de microplacas para la lectura de la absorbancia con una longitud de onda de entre 405 y 450nm.

Especificidad

Para conocer la capacidad de selectividad del biosensor, se evaluaron diversos compuestos como: cloruro de mercurio, nitrato de plata, nitrato de plomo, nitrato de cadmio y cloruro de cromo en concentraciones de 1; 5; 5; 5; 5; 5 ppm. En una placa multipocillos se agregó 120 μL de medio caldo Luria Bertani (LB, 1552, Condalab) con biosensor en fase de crecimiento.

Para la primera fila se agregó por duplicado las concentraciones antes mencionadas hasta un volumen de 150 μL dejando las 2 ultimas columnas como el control o blanco y posteriormente se realizó una micro dilución con 30 μL desde la fila A hasta la fila H. Una vez que los pocillos estuvieron en un volumen final de 130 μL se llevó a incubación con agitación a 37° por 16 horas. Pasado las 16 horas se llevó al lector de microplacas para la lectura de la absorbancia con una longitud de onda de entre 405 y 450nm.

Análisis estadístico del biosensor

El análisis del biosensor se realizó mediante el software Statgraphics (Centurión, Versión 19, USA). Donde se realizó una ANOVA multifactorial para comparar la especificidad del biosensor con varios metales pesados como: Plomo, Cadmio, Cromo, Plata y Mercurio y ANOVA simple para la sensibilidad del biosensor con diferentes niveles de concentración.

RESULTADOS

Aislamiento e identificación de *Escherichia coli*

El análisis de crecimiento bacteriano en diferentes diluciones mostro una disminución progresiva en el recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC) tanto en el medio Mueller Hinton (MH) como en CompactDry EC (Tabla 4). En el medio MH el recuento inicial sin diluir resulto TNTC (Too Numerous To Count, demasiado numerosos para contar), mientras que las diluciones sucesivas 1:100, 1:1.000, 1:10.000 y 1:100.000 registraron 340, 180, 32 y 6 UFC respectivamente.

El medio CompactDry EC, el recuento de *Enterobacterias totales* se detectó un patrón similar al observado en el medio MH con 286 UFC en la dilución 1:100 y una disminución a 3 UFC en la dilución 1:100.000. En contraste, el recuento de *Escherichia coli* solo detecto crecimiento bacteriano en las diluciones 1:100 y 1:1000 con 46 y 8 colonias, respectivamente. Estos resultados demuestran que el medio Mueller Hinton es eficiente para el crecimiento bacteriano, de igual manera, el medio CompactDry EC fue capaz de detectar el crecimiento de bacterias coliformes y *E.coli*, por lo tanto, con ambos métodos se pudieron aislar bacterias que podrían ser utilizadas para el desarrollo del biosensor.

Tabla 4. Recuento del crecimiento microbiano

N° Placa	Factor de dilución	Mueller Hinton UFC/ml	CompactDry EC	
			Coliformes	<i>Escherichia coli</i>
1	1:10	TNTC	TNTC	46
2	1:100	340	286	8
3	1:1.000	180	171	SIN CRECIMIENTO
4	1:10.000	32	34	SIN CRECIMIENTO
5	1:100.000	6	5	SIN CRECIMIENTO

Fuente: (Autores, 2024)

Una vez identificadas las diluciones con menor carga microbiana, se seleccionaron las colonias con características morfológicas diferentes a las demás, las cuales se le asignaron un rótulo como se observa en la Tabla 5. Estos resultados muestran una diversidad fenotípica de las colonias bacterianas aisladas.

Tabla 5. Colonias seleccionadas según su característica morfológica

Colonia	Factor de dilución	Características morfológicas
A	1:1.000	Colonia oxida el medio de cultivo con color rojo – rosado, textura rugosa
B	1:100.000	Colonia pigmentada de color amarillo, textura lisa
C	1:100.000	Colonia pequeña no pigmentada blanco hueso, textura lisa, consistencia suave
D	1:100.000	Colonia pequeña no pigmentada blanco hueso, textura lisa, consistencia mucoide

Fuente: (Autores,2024).

La tinción de Gram realizadas a las colonias aisladas evidencio que en la colonia A existen bacterias con forma bastones y coloración rojo carmesí característico del reactivo safranina, lo que indica la presencia de bacterias gramnegativas. La colonia B mostró una forma de bastones de color rojo carmesí con una disposición más densa, indicando presencia de bacterias bacilos gramnegativo. La colonia C presentó una forma de bastones de color rojo carmesí característico de bacterias bacilos gramnegativos y esferas azules característico de bacterias cocos grampositivos. La bacteria D mostró una morfología de bastones con coloración carmesí denotando presencia de bacilos Gramnegativos (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de tipo de bacterias por su coloración morfológica.

Colonia	Gram Positivo	Gram Negativo
A	0%	100%
B	0%	100/
C	30%	70%
D	0%	100%

Fuente: (Autores, 2024)

Una vez realizado la tinción de gram a las colonias previamente seleccionadas, se realizó una siembra por estrías de agotamientos en medio MacConkey, el cual es un medio diferencial para bacterias de tipo Gramnegativas. Pasado las 24 horas de

incubación a temperatura de 37°C se observó colonias puras y en algunos casos aisladas, donde la colonia A se observó un crecimiento de colonias diminutas con características mucosas y translucidas. La colonia B se observó colonias aisladas de color rojo y redondas. La colonia C se observó un cambio de color a amarillo en el medio con colonias mucoides y de forma irregular. La colonia D se observó colonias aisladas redondas y de tipo mucoides.

Identificación bioquímica

Las pruebas bioquímicas realizadas a las colonias A, B, C y D dieron como resultados microorganismos como *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli*, en un lapso de entre 18 a 24 horas de incubación a 37°C. Donde se pueden observar las diferencias de reacciones en los medios Lisina, SIM, Urea, Citrato y TSI permitiendo interpolar los microorganismos presentes en el Medio MacConkey.

Tabla 7. Resultados de la identificación bioquímicas de las colonias

Pruebas bioquímicas	Colonia			
	A	B	C	D
TSI *	A/A	A/A	A/A	A/A
GAS	++	+	++	+
H ₂ S	-	-	-	-
CITRATO	+	-	+	-/+
UREA	+/-	-	-	+/-
SIM	+	+	+	+
INDOL	-	+	-	-
LISINA	+	+	+	+
CATALASA	+	+	+	+

BACTERIA	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
-----------------	-----------------------------	-------------------------	-------------------------------	-----------------------------

Fuente: (Autores,2024).

* Nota: interpretación siglas en medio de TSI (“A” ácido-amarillo; “K” alcalino rojo) y posición (Bisel/Taco), simbología (“+” positivo, “-” negativo).

Diseño del Biosensor

Mediante la búsqueda de secuencias en base de datos internacionales como el NCBI y iGEM se construyó un inserto genético con el objetivo de expresar la proteína GFP. El inserto de 1470 bp contiene sitios de restricción para permitir su clonación. La característica principal del inserto es que el gen GFP flanqueado por secuencias promotoras y terminadoras, aguas arriba del gen GFP se localiza el gen *merR*, el cual codifica para un regulador transcripcional, gracias a esta organización de los genes y de los elementos reguladores la expresión de GFP está bajo el control del producto de *merR*. (Figura 12).

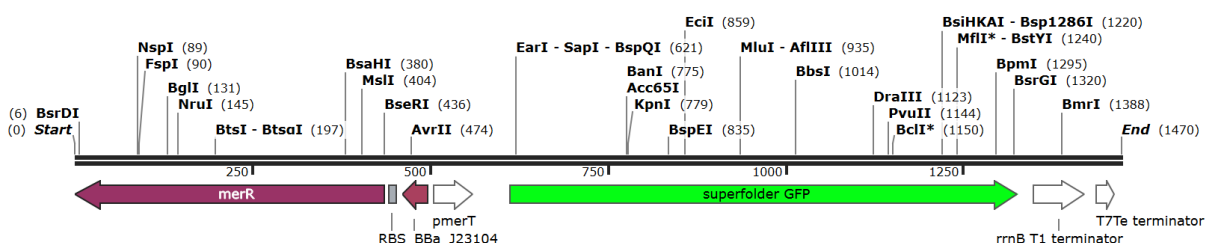


Figura 12. Simulación del inserto en programa SnapGene.

Fuente: (Autores,2024)

Con la ayuda del programa Tinkercell, se desarrolló la reacción de interacción del biosensor con la molécula de mercurio (Figura 13).

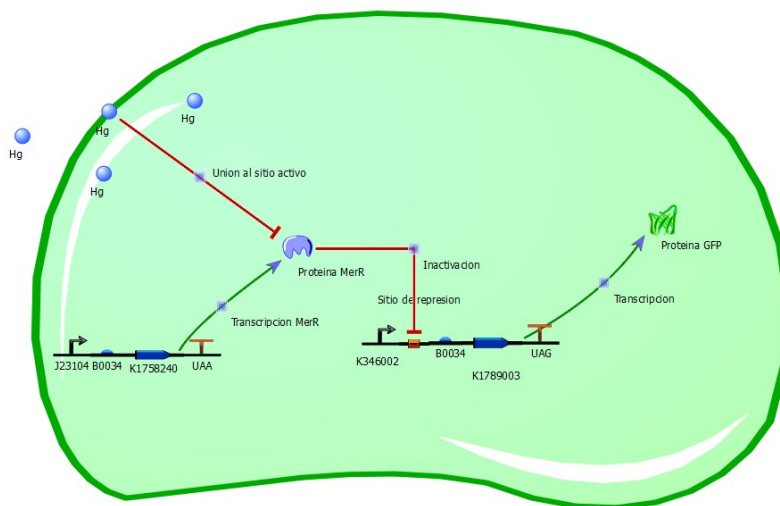


Figura 13. Simulación del inserto en programa Tinkercell

Fuente: (Autores,2024)

El primer estado en que se encuentra el biosensor consiste en cuando la proteína MerR que es sintetizada por el operón K1758240 interactúa con el sitio de restricción del promotor K346002, haciendo que el proceso de transcripción de la proteína GFP sintetizada por el operón K1789003 este inhibido, considerando que no existe respuesta alguna del biosensor. El segundo estado del biosensor se activa cuando en presencia de moléculas de mercurio la proteína MerR sintetizada por el operón k175820 se inactiva, debido a que el mercurio se sitúa en el sitio activo de la enzima, provocando que no se una al sitio de restricción del promotor K346002, permitiendo el proceso de transcripción de la proteína GFP sintetizada por el operón K1789003, y por lo tanto existe respuesta del biosensor la cual se detecta gracias a la presencia de la proteína GFP.

Generación del biosensor.

Para poder realizar el proceso de clonamiento, tanto el inserto como el plásmido pSB1C3 fueron tratados con las enzimas de restricción EcoRI y PstI, la evaluación de dichos cortes se realizó en gel de agarosa al 0,1%. Como se observa en la Figura 14 el inserto presentó un peso molecular de valor de 90 ng/5 μ l con un tamaño de 1470 bp, mientras que el vector tuvo un peso molecular de valor de 35 ng/5 μ l con un tamaño de 2070 pb. Posteriormente, las bandas fueron purificadas y se procedió a realizar el proceso de clonning, en donde se ligaron el inserto y el plásmido pSB1C3.

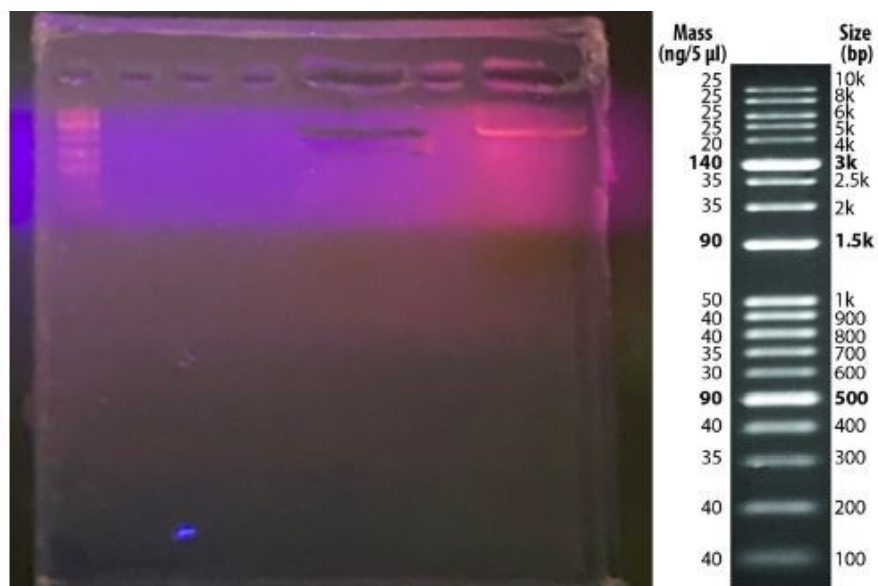


Figura 14. Visualización de peso molecular y corte de banda del inserto y vector previo a la purificación.

Fuente: (Autores,2024)

Una vez obtenida la construcción recombinante, se procedió a transformar las células de *E. coli*, la cual fue aislada e identificada del sedimento (colonia B). Previamente, estas células bacterianas fueron sometidas a un tratamiento de

quimiocompetencia para incrementar su permeabilidad y facilitar la entrada del ADN plasmídico, siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos.

Para la verificación del clonning se realizó una PCR de colonias según el protocolo descrito en la metodología, donde se seleccionaron tres colonias al azar y el producto de PCR se visualizó en un gel de agarosa donde se obtuvieron las bandas del vector con 1470 pb, indicándonos que está presente el plásmido dentro de la bacteria aislada (Figura 15).

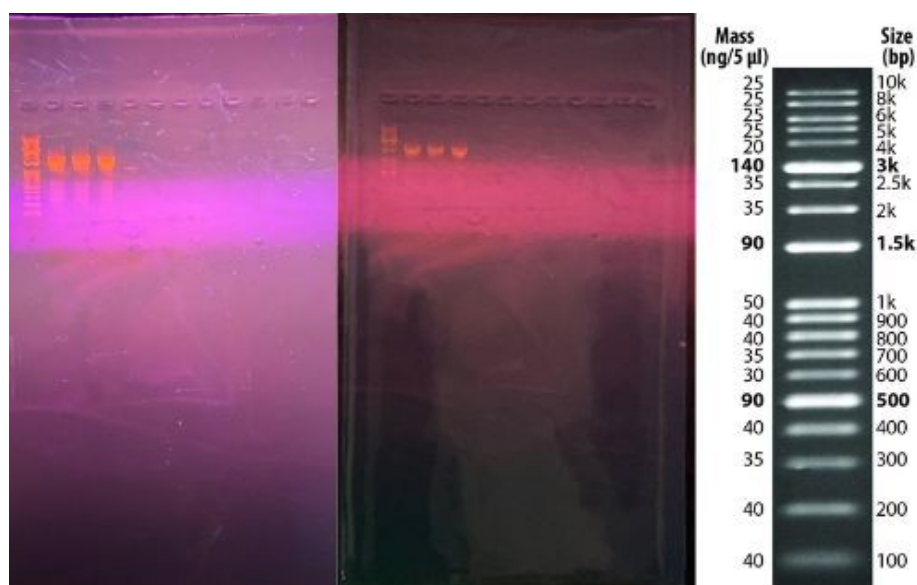


Figura 15. Gel de electroforesis de la PCR en colonia

Fuente: (Autores,2024)

Análisis del biosensor

Para la evaluación del biosensor se realizó un análisis estadístico de la especificidad y sensibilidad del biosensor con diferentes metales pesados y niveles de

concentración de cloruro de mercurio (HgCl_2) con ayuda del lector de placa, se realizaron las micro diluciones y se cuantificó el nivel de absorbancia que la proteína GFP que logra emitir aplicando una longitud de excitación de entre 405 a 450 nm.

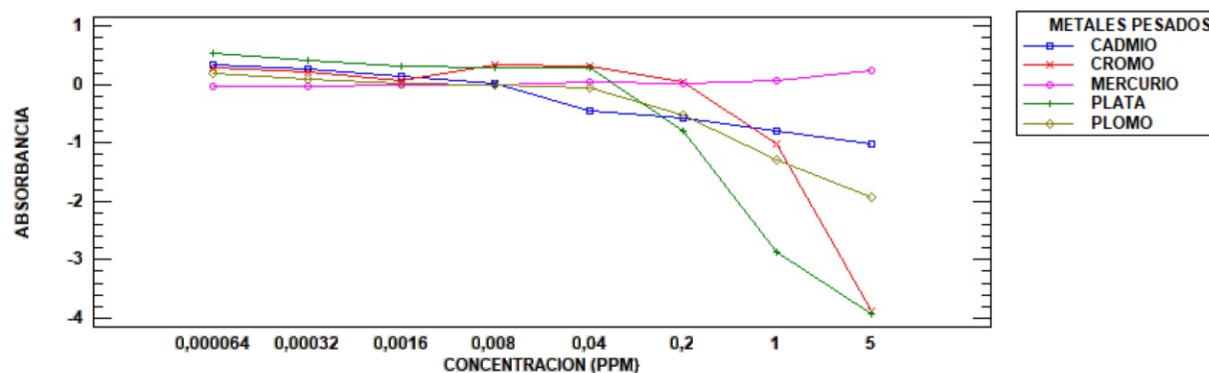


Figura 16. Diagrama de curva de Absorbancia (ABS) vs Metales pesados (ppm)

Fuente: (Autores,2024).

La Figura 16 nos indica la relación de absorbancia del biosensor debido a la proteína GFP y la concentración de metales pesados: Cadmio (Cd), Cromo (Cr), Plata (Ag), Mercurio (Hg) y Plomo (Pb), donde se observa un punto inflexión a partir de 0,04 ppm cuando el biosensor comienza a producir la proteína reportera GFP en presencia de cloruro de mercurio y no se observa presencia de la proteína reportera GFP en los metales pesados restantes. Existiendo una diferenciación en la especificidad del biosensor al mercurio.

Sensibilidad del biosensor

El nivel de sensibilidad del biosensor se evaluó hasta una concentración de 3,25 ppm de cloruro de mercurio al 5% realizando micro diluciones en niveles de concentración iniciales de 0.5, 0.75, 1, 1.5, 1.75, 2, 2.25, 2.5, 2.75, 3, 3,25 ppm.

Prueba de normalidad

Ho: Los datos siguen una distribución normal

Hi: Los datos no siguen una distribución normal

Tabla 8. Valor de P de las variables de concentración y absorbancia.

TEST		STATISTIC	P VALUE
SHAPIRO WILK	CONCENTRACION	0,489018	6,66134E-16
	ABSORBANCIA	0,613050	7,03881E-14

Fuente: (Autores, 2024)

p concentración es menor de alfa: 0,05

p absorbancia es menor de alfa: 0,05

Se concluye que no existe una distribución en la concentración y la absorbancia correspondiente al biosensor (Figura 16)

Comparison of Medians

Median of sample 1: 0,005

Median of sample 2: 0,0574

Mann-Whitney (Wilcoxon) W-test to compare medians

Null hypothesis: median1 = median2

Alt. hypothesis: median1 NE median2

Average rank of sample 1: 76,1591

Average rank of sample 2: 100,841

W = 4958,0 P-value = 0,00131904

Reject the null hypothesis for alpha = 0,05.

Figura 17. Prueba de Mann-Whitney realizado en el simulador de Statgraphis.

Fuente: (Statgraphis, 2024)

Al conocer que nuestros datos obtenidos por el biosensor sobre el nivel de absorbancia emitida por la proteína GFP, no existe una distribución normal entre los niveles de concentración y los niveles de absorbancia, se realiza un análisis de las medianas de ambos factores para determinar la aceptación de nuestra hipótesis. Donde el valor de “ p ” dio como resultado 0.00131904, siendo menor que nuestro nivel de significancia que equivale al 95 % de confianza. Esta comparación entre el valor de “ p ” y nivel de significancia, nos permite dar énfasis en que se acepta nuestra hipótesis alternativa de la investigación donde: “El diseño de un biosensor basado en plásmidos bacterianos modificados genéticamente permitirá la detección de mercurio (Hg), mostrando una respuesta detectable en presencia de mercurio (Hg) a través de la proteína verde fluorescente (GFP).

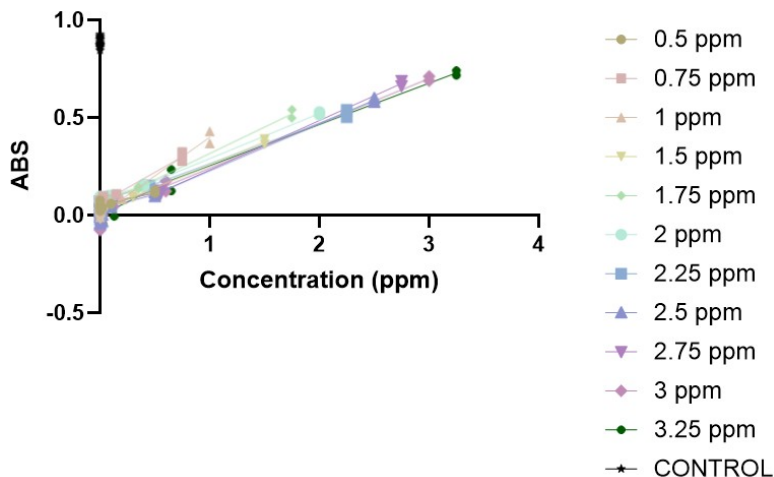


Figura 18. Diagrama de curva de Absorbancia (ABS) vs Cloruro de Mercurio (ppm).

Fuente: (Autores,2024)

La Figura 18 nos muestra la relación entre las concentraciones de cloruro de mercurio (HgCl_2) y el nivel de absorbancia emitida por la proteína GFP que el biosensor sintetiza. El biosensor bacteriano tuvo la capacidad de detectar mercurio en límite inferior de 0,04 ppm y fue capaz de expresar la proteína reportera GFP hasta un nivel más alto de concentración como se observa en la Figura 19.

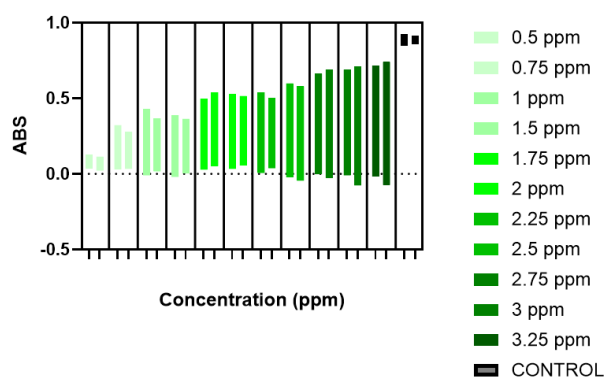


Figura 19. Niveles de absorbancia con respecto a la intensidad de color que la proteína GFP con relación a los niveles de concentración de cloruro de mercurio.

Fuente: (Autores,2024).

DISCUSIÓN

Hoy en día los microorganismos son usados para el desarrollo de nuevas herramientas moleculares, debido a su facilidad de manipulación genética y rápido crecimiento que algunos microorganismos tienen como por ejemplo las bacterias gram negativo en el cual se destaca su membrana externa por su capacidad de transferencia de moléculas grandes y proporcionar un entorno adecuado para las proteínas que son sintetizadas durante el proceso de traducción. A diferencia de las bacterias gram positivas que carecen de una membrana que las envuelvan, permitiendo la secreción de las proteínas y metabolitos que son sintetizados, siendo estas facilidades de obtener por métodos de purificación.

Se ha descrito que en bacterias que prosperan en ambientes contaminados con mercurio se encuentra presente el operon *mer*. Este contiene genes que confieren resistencia al mercurio y es regulado por la proteína MerR, que funciona como un represor-activador. En ausencia de mercurio, MerR mantiene la expresión génica bajo control, evitando la producción innecesaria de proteínas (Ghosh et al., 2018). Sin embargo, cuando los iones de mercurio (Hg^{2+}) están presentes, MerR experimenta un cambio conformacional que desencadena la transcripción de genes necesarios para la detoxificación del mercurio (Wang et al., 2021).

El gen *merR* y su promotor han captado un interés creciente en la biotecnología y la biología sintética debido a su potencial en la creación de biosensores para detectar metales pesados, especialmente mercurio. Este interés se debe a la capacidad del gen *merR* para responder a la presencia de iones metálicos, regulando la expresión de genes

que permiten la detección y detoxificación de estos contaminantes (Zhang et al., 2021; Ghosh et al., 2018). A continuación, se examinan las características y aplicaciones del gen *merR* y su promotor en el desarrollo de biosensores, basándonos en investigaciones recientes (Barkay et al., 2003; Miller et al., 2007).

El promotor *merR* es especialmente eficiente en la detección de iones mercurio, mostrando una respuesta rápida y específica a su presencia. Esta alta especificidad y capacidad de respuesta hacen que el operón *merR* sea un excelente candidato para el desarrollo de biosensores destinados a detectar mercurio en diversos entornos, como agua, suelos y alimentos (Zhang et al., 2022; Lee et al., 2021). Esta precisión es esencial para detectar concentraciones muy bajas de mercurio, como las que se encuentran en el rango nanomolar, cruciales para la vigilancia de ambientes contaminados (Zhang et al., 2021). Los biosensores basados en MerR son capaces de identificar niveles extremadamente bajos de mercurio, lo cual es vital dado el riesgo que representan incluso pequeñas cantidades de este metal (Ghosh et al., 2018).

Por otra parte, el promotor MerR puede ser vinculado a genes reporteros como la proteína verde fluorescente (GFP) o luciferasa, lo que permite la creación de biosensores que generan señales visibles en presencia de mercurio. Esta capacidad de emitir señales detectables facilita una monitorización rápida y en tiempo real, algo especialmente útil para aplicaciones en campo, donde la rapidez y la precisión son fundamentales (Wang et al., 2021; Zhang et al., 2022). La efectividad de los biosensores basados en el sistema MerR se basa en dos características esenciales: su estabilidad y su capacidad de respuesta rápida. El operón *merR* mantiene una estabilidad significativa incluso en condicio-

nes ambientales variables, lo cual es crucial para la confiabilidad de los biosensores que emplean este sistema. Esta combinación de características hace que el sistema MerR sea particularmente adecuado para aplicaciones que requieren una respuesta inmediata, como la vigilancia ambiental en tiempo real (Zhang et al., 2021).

El biosensor desarrollado tiene un límite de detección de mercurio (HgCl_2) de hasta 0,04 ppm, lo que representa una mejora significativa en comparación con otros biosensores bacterianos reportados con un límite de detección de aproximadamente 0,1 ppm con un biosensor similar en *Escherichia coli*. La diferencia en la sensibilidad podría deberse a avances en el diseño del plásmido o ajustes en las condiciones experimentales, como la calibración de la longitud de onda en el ensayo de fluorescencia (Kang et al., 2020). La capacidad del biosensor para responder a una amplia gama de concentraciones de mercurio, verificada mediante mediciones de absorbancia precisas, resalta su utilidad en entornos con niveles variados de contaminación. Esta característica es vital para la vigilancia ambiental, donde los niveles de contaminantes pueden variar considerablemente (Chen et al., 2019).

A pesar de las numerosas ventajas que ofrece el operón *merR* y su promotor en la creación de biosensores, su implementación presenta ciertos desafíos. Uno de los principales problemas es la posibilidad de respuestas no específicas ante otros metales que podrían inducir la expresión del operón, aunque con una menor eficacia en comparación con el mercurio. Aunque MerR muestra una alta especificidad para el mercurio, existe un riesgo menor de respuesta cruzada con metales como el cadmio, lo cual podría comprometer la precisión del biosensor (Ghosh et al., 2018). No obstante, el biosensor desarro-

llado en esta investigación muestra una notable capacidad para detectar mercurio sin registrar respuestas significativas a otros metales pesados como cadmio, cromo, plata o plomo, encontrando una selectividad para mercurio en sus biosensores. La capacidad de detectar mercurio con alta precisión indica una ventaja en la diferenciación del mercurio frente a otros contaminantes, esencial para evitar falsos positivos (Ghosh *et al.*, 2018) (Zhang *et al.*, 2021).

Para garantizar la validez de los resultados del biosensor, se han utilizado análisis estadísticos rigurosos. La prueba de normalidad y el análisis de medianas confirmaron la efectividad del biosensor en la detección de mercurio. El valor p (0.00131904), que es inferior al nivel de significancia del 95%, respalda la efectividad del biosensor en diferentes concentraciones de mercurio. Este enfoque estadístico se utiliza para validar la efectividad de sus biosensores. La inclusión de análisis estadísticos es crucial para la validación científica y la potencial aplicación comercial de nuevas tecnologías (Huang *et al.*, 2020). En comparación con otros estudios, el biosensor desarrollado muestra una capacidad competitiva tanto en sensibilidad como en especificidad, lo que lo hace adecuado para aplicaciones de monitoreo ambiental. La alta sensibilidad para detectar mercurio a niveles bajos es especialmente relevante para cumplir con las regulaciones ambientales que requieren detección precisa de contaminantes (Li *et al.*, 2021). La combinación de alta sensibilidad y especificidad es ideal para biosensores portátiles de detección rápida, lo que podría revolucionar las prácticas de evaluación de la calidad del agua en el campo (Chen *et al.*, 2020).

CONCLUSION

- El biosensor que sintetiza la proteína reportera GFP, demuestran una alta especificidad en la detección de mercurio en presencia de otros metales pesados como el cadmio, cromo, plomo y plata, permitiendo también destacar el límite inferior de 0.04 ppm de concentración que el biosensor permite comenzar la expresar la proteína reportera GFP.
- El biosensor desarrollado tiene una alta sensibilidad ya que detecta el mercurio a concentración de 0,04 ppm.

RECOMENDACIONES

- Realizar diferentes análisis en alimentos utilizando el biosensor, con el fin de evaluar su efectividad y determinar el tiempo de detección en matrices alimentarias. Es fundamental llevar a cabo pruebas, ensayos para estandarizar el procedimiento para garantizar la fiabilidad de los resultados obtenidos.
- Desarrollar métodos para utilizar el biosensor de forma comercial. Este enfoque debe facilitar su uso y asegurar su efectividad en diferentes contextos.
- Comparar los resultados obtenidos con el biosensor con los de otras metodologías establecidas, con el objetivo de evaluar la exactitud de la detección de la proteína GFP y fortalecer la validez del biosensor en aplicaciones futuras.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Tapia, A., & Zanella, R. (2018). Las nanopartículas bimetálicas y algunas de sus aplicaciones. *Mundo Nano*, 10(19), 72. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2017.19.61783>
- Alderman, D., & Smith, P. (2001). Development of draft protocols of standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases. *Aquaculture*, 196(3–4), 211–243. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(01\)00535-x](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(01)00535-x)
- Ashworth, E. K., Stockett, M. H., Kjær, C., Page, P. C. B., Meech, S. R., Nielsen, S. B., & Bull, J. N. (2022). Complexation of Green and Red Kaede Fluorescent Protein Chromophores by a Zwitterion to Probe Electrostatic and Induction Field Effects. *The Journal Of Physical Chemistry A*, 126(7), 1158-1167. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.1c10628>
- Barkay, T., et al. (2003). Mercury bioremediation and resistance mechanisms in microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 208-213. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00064-5](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00064-5)
- Bhat, A., Sharma, R., Desigan, K., Lucas, M. M., Mishra, A., Bowers, R. M., Woyke, T., Epstein, B., Tiffin, P., Pueyo, J. J., & Paape, T. (2024). Horizontal gene transfer of the Mer operon is associated with large effects on the transcriptome and increased tolerance to mercury in nitrogen-fixing bacteria. *BMC Microbiology*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-024-03391-5>
- Bhat, S. A., Bashir, O., Haq, S. A. U., Amin, T., Rafiq, A., Ali, M., Américo-Pinheiro, J. H. P., & Sher, F. (2022). Phytoremediation of heavy metals in soil and water: An eco-friendly,

sustainable and multidisciplinary approach. *Chemosphere*, 303, 134788.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134788>

Biełło, K. A., Olaya-Abril, A., Cabello, P., Rodríguez-Caballero, G., Sáez, L. P., Moreno-Vivián, C., Luque-Almagro, V. M., & Roldán, M. D. (2023). Quantitative Proteomic Analysis of Cyanide and Mercury Detoxification by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT 5344. *Microbiology Spectrum*, 11(4). <https://doi.org/10.1128/spectrum.00553-23>

Boye, C., Arpag, S., Francis, M., DeClemente, S., West, A., Heller, R., & Bulysheva, A. (2022). Reduction of plasmid vector backbone length enhances reporter gene expression. *Bioelectrochemistry*, 144, 107981. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.107981>

Briones, C. (2023). Plasmid. En Springer eBooks (p. 2388). https://doi.org/10.1007/978-3-662-65093-6_1236

Chen, J., et al. (2019). Fluorescent biosensors for the detection of heavy metals: A review. *Environmental Science & Technology*, 53(11), 6414-6429.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.9b00952>

Chen, L., et al. (2020). Advancements in portable biosensors for environmental monitoring: Sensitivity and specificity in detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 310, 127838.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.127838>

Calle, P., Monserrate, L., Medina, F., Delgado, M. C., Tirapé, A., Montiel, M., Barzola, O. R., Cadena, O. A., Dominguez, G. A., & Alava, J. J. (2018). Mercury assessment, macrobenthos diversity and environmental quality conditions in the Salado Estuary (Gulf of Guayaquil, Ecuador) impacted by anthropogenic influences. *Marine Pollution Bulletin*, 136, 365-373. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.09.018>

- Capriotti, A. L., Foglia, P., Gubbiotti, R., Roccia, C., Samperi, R., & Laganà, A. (2010). Development and validation of a liquid chromatography/atmospheric pressure photoionization-tandem mass spectrometric method for the analysis of mycotoxins subjected to commission regulation (EC) No. 1881/2006 In cereals. *Journal of Chromatography A*, 1217(39), 6044–6051. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.07.018>
- De Oliveira Dantas, A., Da Silva de Castro, T. D. S., De Magalhães Câmara, V., De Souza Espindola Santos, A., Asmus, C. I. R. F., & Vianna, A. D. S. (2022). Maternal Mercury Exposure and Hypertensive Disorders of Pregnancy: A Systematic Review. *Revista Brasileira Ginecologia E Obstetrícia*, 44(12), 1126-1133. <https://doi.org/10.1055/s-0042-1760215>
- Dack, K., Fell, M., Taylor, C. M., Havdahl, A., & Lewis, S. J. (2021). Mercury and Prenatal Growth: A Systematic Review. *International Journal Of Environmental Research And Public Health/International Journal Of Environmental Research And Public Health*, 18(13), 7140. <https://doi.org/10.3390/ijerph18137140>
- Dack, K., Fell, M., Taylor, C. M., Havdahl, A., & Lewis, S. J. (2022). Prenatal mercury exposure and Neurodevelopment up to the age of 5 years: A Systematic review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(4), 1976. <https://doi.org/10.3390/ijerph19041976>
- Deshmukh, S., Kulkarni, R., & Bose, K. (2022). Transformation and Protein Expression. En *Textbook on Cloning, Expression and Purification of Recombinant Proteins* (pp. 83-114). Kakoli Bose. https://doi.org/10.1007/978-981-16-4987-5_4

- Esteticanarias.com. (2020, 3 abril). Mesolux ST - Electroporación - esteticanarias.com. Esteticanarias.com - Material Médico Para Profesionales. <https://esteticanarias.com/producto/mesolux-st/>
- Fang, C., & Zhang, Y. (2021). Bacterial MerR family transcription regulators: activation<?A3B2 ACK?>by distortion. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 54(1), 25-36. <https://doi.org/10.3724/abbs.2021003>
- Ghosh, S., et al. (2018). Design and application of MerR-based biosensors for mercury detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 255, 1090-1097. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400517309119>
- Guaman, J. F. I., Moreno, C. G. R., & Guaman, C. F. I. (2022). DETERMINANTES GENÉTICOS y SUS MECANISMOS DE ACCIÓN IMPLICADOS EN LA RESISTENCIA BACTERIANA a METALES PESADOS: UNA REVISIÓN. *Perfiles*, 1(27), 26-38. <https://doi.org/10.47187/perf.v1i27.147>
- García-Ávila, F., Sánchez-Alvarracín, C., Cadme-Galabay, M., Conchado-Martínez, J., García-Mera, G., & Zhindón-Arévalo, C. (2020). Relationship between chlorine decay and temperature in the drinking water. *MethodsX*, 7, 101002. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.101002>
- Gautam, A. (2022). Isolation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis. En *Techniques in life science and biomedicine for the non-expert* (pp. 55-61). https://doi.org/10.1007/978-3-030-94230-4_6
- Gautam, A. (2022). Isolation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis. En *Techniques in life science and biomedicine for the non-expert* (pp. 55-61). https://doi.org/10.1007/978-3-030-94230-4_6

- Ghataora, J. S., Gebhard, S., & Reeksting, B. J. (2023). Chimeric MerR-Family Regulators and Logic Elements for the Design of Metal Sensitive Genetic Circuits in *Bacillus subtilis*. *ACS Synthetic Biology*, 12(3), 735-749. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.2c00545>
- Gionfriddo, C. M., Lin, H., & Moreau, J. W. (2024). Microbial interactions with the Mercury cycle. En *Geomicrobiology: Natural and Anthropogenic Settings* (pp. 11-32). Lucian C. Staicu. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-54306-7>
- González-Osorio, B. B., Saá-Yáñez, L. M., Simba-Ochoa, L. F., Barragán-Monrroy, R., & Cadme-Arevalo, M. L. (2022). Vegetación riparia y la calidad del recurso hídrico en la zona centro del litoral Ecuatoriano. *Terra Latinoamericana*, 40. <https://doi.org/10.28940/terra.v40i0.1070>
- Gräwe, A., Dreyer, A., Vornholt, T., Barteczko, U., Buchholz, L., Drews, G., Ho, U. L., Jackowski, M. E., Kracht, M., Lüders, J., Bleckwehl, T., Rositzka, L., Ruwe, M., Wittchen, M., Lutter, P., Müller, K., & Kalinowski, J. (2019b). A paper-based, cell-free biosensor system for the detection of heavy metals and date rape drugs. *PLoS ONE*, 14(3), e0210940. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210940>
- Guerrero, S. E. P., Benítez, R. B., Villa, R. A. S., & Corredor, J. A. G. (2020). Contaminación del agua por metales pesados, métodos de análisis y tecnologías de remoción. Una revisión. *Entre Ciencia E Ingeniería/Entre Ciencia E Ingeniería*, 14(27), 9-18. <https://doi.org/10.31908/19098367.1734>
- Gutierrez, R. M. P., Mendez, J. V. M., & Vazquez, I. A. (2017). A novel approach to the oral delivery of bionanostructures for systemic disease. In *Elsevier eBooks* (pp. 27–59). <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-47720-8.00002-x>

- Huang, W., et al. (2020). Statistical validation of biosensor performance for heavy metal detection: A comprehensive approach. *Journal of Environmental Monitoring*, 22(4), 876-889. <https://doi.org/10.1039/C9EM00530A>
- Huang, C., Lin, C., Nguyen, M. K., Hussain, A., Bui, X., & Ngo, H. H. (2023). A review of biosensor for environmental monitoring: principle, application, and corresponding achievement of sustainable development goals. *Bioengineered*, 14(1), 58-80. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2095089>
- iGEM [International Genetically Engineered Machine]. (2019). Protocols/Competent cells. Registry Of Standard Biological Parts. Recuperado 29 de agosto de 2024, de https://parts.igem.org/Help:Protocols/Competent_Cells
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. (2021). NTE INEN 1108: Agua potable. Requisitos. <https://www.insistec.ec/images/insistec/02-cliente/07-descargas/NTE%20INEN%201108%20-%20AGUA%20POTABLE.%20REQUISITOS.pdf>
- Jung, J., & Lee, S. J. (2019). Biochemical and Biodiversity Insights into Heavy Metal Ion-Responsive Transcription Regulators for Synthetic Biological Heavy Metal Sensors. *Journal Of Microbiology And Biotechnology*, 29(10), 1522-1542. <https://doi.org/10.4014/jmb.1908.08002>
- Kang, S., et al. (2020). Development of a biosensor for mercury detection using *Escherichia coli* and its application for environmental monitoring. *Journal of Hazardous Materials*, 391, 122258. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122258>
- Ke, T., Gonçalves, F. M., Gonçalves, C. L., Santos, A. A. D., Rocha, J. B. T., Farina, M., Skalny, A., Tsatsakis, A., Bowman, A. B., & Aschner, M. (2019). Post-translational modifications

in MeHg-induced neurotoxicity. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis Of Disease*, 1865(8), 2068-2081. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.10.024>

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, Procop GW, et al. *Diagnóstico microbiológico: Texto y atlas color. 5ª ed.* Buenos Aires: Médica Panamericana; 2003

Krasowska, J., Pierzchała, K., Bzowska, A., Forró, L., Sienkiewicz, A., & Wielgus-Kutrowska, B. (2021). Chromophore of an Enhanced Green Fluorescent Protein Can Play a Photoprotective Role Due to Photobleaching. *International Journal Of Molecular Sciences*, 22(16), 8565. <https://doi.org/10.3390/ijms22168565>

Lee, J., et al. (2021). Real-time environmental monitoring using MerR-based biosensors. *Analytical Chemistry*, 93(12), 5678-5685. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.1c00215>

Li, X., et al. (2021). Development of a portable biosensor for rapid and sensitive detection of mercury in environmental water samples. *Environmental Science & Technology*, 55(14), 9623-9632. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c01422>

Lai, L., Yan, F., Chen, G., Huang, Y., Huang, L., & Li, D. (2023). Recent Progress on Fluorescent Probes in Heavy Metal Determinations for Food Safety: A Review. *Molecules/Molecules Online/Molecules Annual*, 28(15), 5689. <https://doi.org/10.3390/molecules28155689>

Li, R., Wu, H., Ding, J., Li, N., Fu, W., Gan, L., & Li, Y. (2020). Transgenic merA and merB expression reduces mercury contamination in vegetables and grains grown in mercury-contaminated soil. *Plant Cell Reports*, 39(10), 1369–1380. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02570-8>

- Limbeck, A., Bonta, M., & Nischkauer, W. (2017b). Improvements in the direct analysis of advanced materials using ICP-based measurement techniques. *Journal Of Analytical Atomic Spectrometry*, 32(2), 212-232. <https://doi.org/10.1039/c6ja00335d>
- Mardalisa, M., Suhandono, S., & Ramdhani, M. (2020). Isolation and Characterization of str Promoter from Bacteria *Escherichia coli* DH5 α using Reporter Gene *AmilCP* (*Acropora millepora*). *IOP Conference Series Earth And Environmental Science*, 430(1), 012014. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/430/1/012014>
- Maity, T., & Mahata, C. (2021). Succussed Serial Dilutions in Water Carry Solute Information via Solute-Specific Water Structures—A Theory Based on Quantum Electrodynamics. *Homeopathy*, 110(04), 277-282. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1726007>
- Mercurio y trastornos del neurodesarrollo en niños: una revisión sistemática. (2023). *Archivos Argentinos de Pediatría*, 121(5). <https://doi.org/10.5546/aap.2022-02838>
- Mosey, M., Douchi, D., Knoshaug, E. P., & Laurens, L. M. (2021). Methodological review of genetic engineering approaches for non-model algae. *Algal Research*, 54, 102221. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102221>
- Navas-Jaramillo, S. J. (2024). Convenio de Minamata: Actividades desarrolladas en Japón y su incidencia en las emisiones de mercurio. *FIGEMPA Investigación y Desarrollo*, 17(1), 67-76. <https://doi.org/10.29166/revfig.v17i1.5162>
- Naresh, V., & Lee, N. (2021). A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. *Sensors*, 21(4), 1109. <https://doi.org/10.3390/s21041109>

- Nnaji, N. D., Onyeaka, H., Miri, T., & Ugwa, C. (2023). Bioaccumulation for heavy metal removal: a review. *SN Applied Sciences/SN Applied Sciences*, 5(5). <https://doi.org/10.1007/s42452-023-05351-6>
- Oggero, A. S., Nakayama, H., Avalos, C. R., Cantero, I., Benitez, J. V., Ayala, J., Elkhaili, R., & Peralta, I. (2021). Eficiencia de la absorción de cobre (Cu) y cromo (Cr), una propuesta de fitorremediación de efluentes mediada por *Typha domingensis*. *Revista de la Sociedad Científica del Paraguay*, 26(2), 100-113. <https://doi.org/10.32480/rscp.2021.26.2.100>
- Paduraru, E., Iacob, D., Rarinca, V., Rusu, A., Jijie, R., Ilie, O., Ciobica, A., Nicoara, M., & Doroftei, B. (2022). Comprehensive review regarding mercury poisoning and its complex involvement in Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 1992. <https://doi.org/10.3390/ijms23041992>
- Panduro, G., Rengifo, G. C., Barreto, J. L., Arbaiza-Peña, K., Iannaccone, J., Alvarino, L., & Crnobra, B. (2020). Bioacumulación por mercurio en peces y riesgo por ingesta en una comunidad nativa en la amazonia peruana. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(3), e18177. <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i3.18177>
- Pant, R., Mathpal, N., Chauhan, R., Singh, A., & Gupta, A. (2024). A Review of Mercury Contamination in Water and Its Impact on Public Health. *Earth And Environmental Sciences Library*, 93-115. https://doi.org/10.1007/978-3-031-48817-7_4
- Pavithra, K. G., SundarRajan, P., Kumar, P. S., & Rangasamy, G. (2023). Mercury sources, contaminations, mercury cycle, detection and treatment techniques: A review. *Chemosphere*, 312, 137314. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137314>
- Pellizza, L., Bialer, M. G., Sieira, R., & Aran, M. (2022). MliR, a novel MerR-like regulator of iron homeostasis, impacts metabolism, membrane remodeling, and cell adhesion in the

marine Bacteroidetes *Bizionia argentinensis*. *Frontiers In Microbiology*, 13.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.987756>

Registry of Standard Biological Parts [Jessica Tarnowski] (Ed.). (2014). Mer operon, biological system found to detoxify organic and inorganic forms of mercury. Registry Of Standard Biological Parts. https://parts.igem.org/Part:BBa_K1420000

Rouches, M. V., Xu, Y., Cortes, L. B. G., & Lambert, G. (2022). A plasmid system with tunable copy number. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31422-0>

Shearer, H. L., Loi, V. V., Weiland, P., Bange, G., Altegoer, F., Hampton, M. B., Antelmann, H., & Dickerhof, N. (2023). MerA functions as a hypochlorite reductase and defense mechanism in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 119(4), 456–470. <https://doi.org/10.1111/mmi.15035>

Shehata, M. (2018). Using recombinant *E. coli* displaying surface heavy metal binding proteins for removal of Pb²⁺ from. . . ResearchGate. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.34572.62089>

Siddiqi, Z. M. (2019b). Transport and Fate of Mercury (Hg) in the Environment: Need for Continuous Monitoring. In Springer eBooks (pp. 2317-2335). https://doi.org/10.1007/978-3-319-73645-7_56

Sloop, J. T., Donati, G. L., & Jones, B. T. (2022). Multi-internal standard calibration applied to inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 1190, 339258. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339258>

Somayaji, A., Dhanjal, C. R., Lingamsetty, R., Vinayagam, R., Selvaraj, R., Varadavenkatesan, T., & Govarthanan, M. (2022). An insight into the mechanisms of homeostasis in

extremophiles. *Microbiological Research*, 263, 127115.

<https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127115>

Song, M., Lin, X., Peng, Z., Xu, S., Jin, L., Zheng, X., & Luo, H. (2021). Materials and Methods of Biosensor Interfaces With Stability. *Frontiers In Materials*, 7.

<https://doi.org/10.3389/fmats.2020.583739>

Soo, H. L., Kyung-Hoon, J., & Dong, S. L. (1989). Determination of mercury in environmental samples by cold vapour generation and atomic-absorption spectrometry with a gold-coated graphite furnace. *Talanta*, 36(10), 999–1003. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(89\)80182-1](https://doi.org/10.1016/0039-9140(89)80182-1)

Sureka, S., Chakravorty, A., Holmes, E. C., Spassibojko, O., Bhatt, N., Wu, D., & Turgeon, B. G. (2014). Standardization of Functional Reporter and Antibiotic Resistance Cassettes to Facilitate the Genetic Engineering of Filamentous Fungi. *ACS Synthetic Biology*, 3(12), 960-962. <https://doi.org/10.1021/sb5000143>

Svitkova, B., Selc, M., Nemethova, V., Razga, F., Gabelova, A., Ursinyova, M., & Babelova, A. (2022). Plate reader spectroscopy as an alternative to atomic absorption spectroscopy for the assessment of nanoparticle cellular uptake. *Heliyon*, 8(11), e11595. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11595>

Takanezawa, Y., Ishikawa, K., Nakayama, S., Nakamura, R., Ohshiro, Y., Uraguchi, S., & Kiyono, M. (2023). Conversion of methylmercury into inorganic mercury via organomercurial lyase (MerB) activates autophagy and aggresome formation. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-47110-y>

Takanezawa, Y., Nakamura, R., Matsuda, H., Yagi, T., Egawa, Z., Sone, Y., Uraguchi, S., Adachi, T., & Kiyono, M. (2019). Intracellular demethylation of methylmercury to inorganic

mercury by organomercurial lyase (MERB) strengthens cytotoxicity. *Toxicological Sciences*, 170(2), 438–451. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz094>

Taux, K., Kraus, T., & Kaifie, A. (2022). Mercury exposure and its health effects in Workers in the Artisanal and Small-Scale Gold Mining (ASGM) Sector—A Systematic Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(4), 2081. <https://doi.org/10.3390/ijerph19042081>

Thai, T. D., Lim, W., & Na, D. (2023). Synthetic bacteria for the detection and bioremediation of heavy metals. *Frontiers In Bioengineering And Biotechnology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1178680>

Timmons, J. J., & Densmore, D. (2020). Repository-based plasmid design. *PloS One*, 15(1), e0223935. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223935>

Tripathi, N., & Sapra, A. (2023, 14 agosto). Gram staining. StatPearls - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/>

Trojańska, M., Rogala, M., Kowalczyk, A., Chyc, M., Latowski, D., & Bojko, M. (2022). Is the merA gene sufficient as a molecular marker of mercury bacterial resistance? *Acta Biochimica Polonica*. https://doi.org/10.18388/abp.2020_6399

Trojańska, M., Rogala, M., Kowalczyk, A., Chyc, M., Latowski, D., & Bojko, M. (2022). Is the merA gene sufficient as a molecular marker of mercury bacterial resistance? *Acta Biochimica Polonica*. https://doi.org/10.18388/abp.2020_6399

Uddin, S., Khanom, S., & Islam, M. R. (2024). Source and Distribution of Mercury in Environment —A Review. *Earth And Environmental Sciences Library*, 3-43. https://doi.org/10.1007/978-3-031-48817-7_1

UF1668 - Análisis de agua potable y residual. (s. f.). Google Books.

[https://books.google.es/books?](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=u8ZWDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA3&dq=recoleccion+de+muestras+de+gua+no+probabilistico+por+criterio+&ots=gUhfHP6Qq7&sig=7gqGOXj5g4bNUCqDE5fA8Ctbf3M#v=onepage&q=recoleccion%20de%20muestras%20de%20gua%20no%20probabilistico%20por%20criterio&f=false)

[hl=es&lr=&id=u8ZWDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA3&dq=recoleccion+de+muestras+de+gua+no+probabilistico+por+criterio+&ots=gUhfHP6Qq7&sig=7gqGOXj5g4bNUCqDE5fA8Ctbf3M#v=onepage&q=recoleccion%20de%20muestras%20de%20gua%20no%20probabilistico%20por%20criterio&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=u8ZWDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA3&dq=recoleccion+de+muestras+de+gua+no+probabilistico+por+criterio+&ots=gUhfHP6Qq7&sig=7gqGOXj5g4bNUCqDE5fA8Ctbf3M#v=onepage&q=recoleccion%20de%20muestras%20de%20gua%20no%20probabilistico%20por%20criterio&f=false)

Velasco-Garcia, M. N., & Mottram, T. (2003). Biosensor Technology addressing Agricultural Problems. *Biosystems Engineering*, 84(1), 1-12. [https://doi.org/10.1016/s1537-5110\(02\)00236-2](https://doi.org/10.1016/s1537-5110(02)00236-2)

Vennam, S., Georgoulas, S., Khawaja, A., Chua, S., Strouthidis, N. G., & Foster, P. J. (2019). Heavy metal toxicity and the aetiology of glaucoma. *Eye*, 34(1), 129-137. <https://doi.org/10.1038/s41433-019-0672-z>

Villota-Calvachi, G. E., Marín, K. V. G., Moreno, S. M. M., Vanegas, N. F. G., Ortega, D. S. V., Henao, L. A. O., Betancur, L. C., Morales, C. G., & Montes, N. R. (2022). Aislamiento y caracterización de bacterias productoras de biopolímeros a partir de efluentes industriales. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 24(1), 27-45. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v24n1.76660>

Wang, H., et al. (2021). Highly sensitive biosensors based on MerR operon for environmental mercury detection. *Analytical Chemistry*, 93(5), 3451-3458. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.0c04925>

Xie, S. (2024). Biosorption of heavy metal ions from contaminated wastewater: an eco-friendly approach. *Green Chemistry Letters And Reviews*, 17(1). <https://doi.org/10.1080/17518253.2024.2357213>

- Xue, Y., Du, P., Shendi, A. A. I., & Yu, B. (2022). Mercury bioremediation in aquatic environment by genetically modified bacteria with self-controlled biosecurity circuit. *Journal Of Cleaner Production*, 337, 130524. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.130524>
- Yang, L., Nian, S., Zhang, G., Sharman, E., Miao, H., Zhang, X., Chen, X., Luo, Y., & Jiang, J. (2019). Role of Hydrogen Bonding in Green Fluorescent Protein-like Chromophore Emission. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47660-0>
- Zaynab, M., Al-Yahyai, R., Ameen, A., Sharif, Y., Ali, L., Fatima, M., Khan, K. A., & Li, S. (2022). Health and environmental effects of heavy metals. *Journal Of King Saud University. Science/Mağallaġ Ğāmi'aġ Al-malik Sa'ūd. al-'Ulūm*, 34(1), 101653. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101653>
- Zhang, L., et al. (2021). Engineering MerR-based biosensors for heavy metal detection. *Biotechnology Advances*, 50, 107806. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107806>
- Zhang, S., & Ai, H. (2020). A general strategy to red-shift green fluorescent protein-based biosensors. *Nature Chemical Biology*, 16(12), 1434-1439. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0641-7>
- Zhang, X., et al. (2022). Enhanced sensitivity of mercury biosensors based on MerR operon: Application to environmental monitoring. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 358, 131440. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400519308091>
- Zhou, S., Feng, S., Brown, D., & Huang, B. (2020). Improved yellow-green split fluorescent proteins for protein labeling and signal amplification. *PLoS ONE*, 15(11), e0242592. <https://doi.org>

ANEXOS

ANEXO 1: Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes.



PRESIDENCIA DE LA REPUBLICA

**NORMA DE CALIDAD AMBIENTAL Y DE
DESCARGA DE EFLUENTES : RECURSO
AGUA**

LIBRO VI ANEXO 1

0 INTRODUCCIÓN

La presente norma técnica ambiental es dictada bajo el amparo de la Ley de Gestión Ambiental y del Reglamento a la Ley de Gestión Ambiental para la Prevención y Control de la Contaminación Ambiental y se somete a las disposiciones de éstos, es de aplicación obligatoria y rige en todo el territorio nacional.

La presente norma técnica determina o establece:

- a) Los límites permisibles, disposiciones y prohibiciones para las descargas en cuerpos de aguas o sistemas de alcantarillado;
- b) Los criterios de calidad de las aguas para sus distintos usos; y,
- c) Métodos y procedimientos para determinar la presencia de contaminantes en el agua.

1 OBJETO

La norma tiene como objetivo la Prevención y Control de la Contaminación Ambiental, en lo relativo al recurso agua.

El objetivo principal de la presente norma es proteger la calidad del recurso agua para salvaguardar y preservar la integridad de las personas, de los ecosistemas y sus interrelaciones y del ambiente en general.

Las acciones tendientes a preservar, conservar o recuperar la calidad del recurso agua deberán realizarse en los términos de la presente Norma.

2 DEFINICIONES

Para el propósito de esta norma se consideran las definiciones establecidas en el Reglamento a la Ley de Gestión Ambiental para la Prevención y Control de la Contaminación Ambiental, y las que a continuación se indican:

2.1 Agua costera

LIBRO VI

ANEXO 1

286

Fuente: (Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes, n/f).

ANEXO 2: Reglamento (ce) no 1881/2006 de la comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.

20.12.2006

ES

Diario Oficial de la Unión Europea

L 364/5

REGLAMENTO (CE) Nº 1881/2006 DE LA COMISIÓN

de 19 de diciembre de 2006

por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios

(Texto pertinente a efectos del EEE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Visto el Reglamento (CEE) nº 315/93 del Consejo, de 8 de febrero de 1993, por el que se establecen procedimientos comunitarios en relación con los contaminantes presentes en los productos alimenticios ⁽¹⁾, y, en particular, su artículo 2, apartado 3,

Considerando lo siguiente:

(1) El Reglamento (CE) nº 466/2001 de la Comisión, de 8 de marzo de 2001, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios ⁽²⁾, ha sido modificado sustancialmente en muchas ocasiones. Es necesario volver a modificar el contenido máximo de determinados contaminantes a fin de tener en cuenta la nueva información y la evolución del Codex Alimentarius. Al mismo tiempo, debería clarificarse el texto cuando sea pertinente. Por consiguiente, debe sustituirse el Reglamento (CE) nº 466/2001.

(2) En interés de la salud pública, resulta esencial mantener el contenido de los contaminantes en niveles aceptables desde el punto de vista toxicológico.

(3) Vistas las disparidades existentes entre las legislaciones de los Estados miembros y las distorsiones de la competencia que estas pueden acarrear, es necesario tomar medidas a escala comunitaria para algunos contaminantes a fin de garantizar la unidad del mercado, respetando al mismo tiempo el principio de proporcionalidad.

(4) El contenido máximo debe establecerse a un nivel estricto

consideran cancerígenos genotóxicos o en los casos en los que la exposición actual de la población o de los grupos vulnerables de la población se aproxime a la ingesta tolerable o la supere, deben establecerse contenidos máximos tan bajos como sea razonablemente posible (*as low as reasonably achievable, ALARA*). Estos planteamientos garantizan que los explotadores de empresas alimentarias apliquen, en la medida de lo posible, medidas para prevenir y reducir la contaminación, con el fin de proteger la salud pública. Además, es apropiado para la protección de la salud de los lactantes y los niños de corta edad, un grupo vulnerable, establecer los contenidos máximos más bajos que pueden conseguirse mediante una selección estricta de las materias primas utilizadas para la producción de alimentos para lactantes y niños de corta edad. Esta selección estricta de las materias primas también es apropiada para la producción de algunos alimentos específicos tales como el salvado para el consumo humano directo.

(5) A fin de permitir que se apliquen contenidos máximos a productos desecados, diluidos, transformados y compuestos, cuando no se hayan establecido contenidos máximos comunitarios específicos, los explotadores de empresas alimentarias deben proporcionar los factores específicos de concentración y dilución acompañados por los datos experimentales adecuados que justifiquen el factor propuesto.

(6) A fin de garantizar una protección eficaz de la salud pública, los productos que contengan contaminantes que superen los contenidos máximos no deben comercializarse como tales, ni tras su mezcla con otros productos alimenticios, ni utilizarse como ingrediente en otros alimentos.

(7) Está demostrado que la selección u otros tratamientos físicos permiten reducir el contenido de aflatoxinas de las partidas de cacahuets, frutos de cáscara, frutos secos y maíz. Con el fin de minimizar las repercusiones sobre el comercio, es conveniente permitir contenidos de aflatoxinas más elevados en los productos que no se destinan al consumo humano directo o como ingrediente de productos alimenticios. En estos casos, los contenidos máximos de aflatoxinas deben establecerse teniendo en cuenta la efectividad de los tratamientos mencionados a fin de reducir el contenido de aflatoxinas en productos

Fuente: (Reglamento y la comisión, 2006)

ANEXO 3: FDA GRAS Letter 934



Claire L. Kruger, PhD, DABT
 Managing Partner
 Spherix Consulting Group, Inc.
 11821 Parklawn Drive, Suite 310
 Rockville, MD 20852

Re: GRAS Notice No. GRN 000934

Dear Dr. Kruger:

The Food and Drug Administration (FDA, we) completed our evaluation of GRN 000934 that you submitted on behalf of CABIO Biotech (Wuhan) Co., Ltd (CABIO). We received this notice on April 21, 2020 and filed it on July 20, 2020. CABIO submitted amendments to the notice on August 7, 2020, October 14, 2020, November 11, 2020, March 2, 2021, March 10, 2021 and June 4, 2021 that clarified the identity, composition, intended uses, production organism, manufacturing process, and stability of the ingredient, and amended fatty acid and microbial specifications.

The subject of the notice is algal oil from *Schizochytrium* sp. strain CABIO-A-2 containing ≥35% docosahexaenoic acid (algal oil (≥35% DHA)), for use as an ingredient in the food categories listed in 21 CFR 184.1472(a)(3) (Menhaden oil) at levels up to 29% of the levels specified, excluding products under USDA jurisdiction, and as the sole added source of DHA in any given food category so that the total dietary exposure to DHA will be no more than 1.5 g/person (p)/day (d), CABIO also intends to use algal oil (≥35% DHA) as an ingredient in cow milk- and soy-based, non-exempt infant formula for term infants at a maximum level of 0.5% (w/w) of total fat as DHA in combination with a safe and suitable source of arachidonic acid (ARA) at a ratio ranging from 1:1 to 1:2 DHA to ARA. The notice informs us of CABIO's view that these uses of algal oil (≥35% DHA) are GRAS through scientific procedures.

Our use of the term, "algal oil (≥35% DHA)" in this letter is not our recommendation of that term as an appropriate common or usual name for declaring the substance in accordance with FDA's labeling requirements. Under 21 CFR 101.4, each ingredient must be declared by its common or usual name. In addition, 21 CFR 102.5 outlines general principles to use when establishing common or usual names for nonstandardized foods. Issues associated with labeling and the common or usual name of a food ingredient are under the purview of the Office of Nutrition and Food Labeling (ONFL) in the Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN). The Office of Food Additive Safety (OFAS) did not consult with ONFL regarding the appropriate common or usual name for "algal oil (≥35% DHA)."

U.S. Food and Drug Administration
 Center for Food Safety & Applied Nutrition
 5091 Campus Drive
 College Park, MD 20740
www.fda.gov

Fuente: (Food Drug Administration, 2020).

ANEXO 4: FDA GRAS Notice 822



John Endres, ND
 AIBMR Life Sciences, Inc.
 2800 E. Madison, Suite 202
 Seattle, WA 98112

Re: GRAS Notice No. GRN 000822

Dear Dr. Endres:

The Food and Drug Administration (FDA, we) completed our evaluation of GRN 000822. We received the notice that you submitted on behalf of Laurus Labs Ltd. (Laurus Labs) on November 26, 2018, and filed it on December 13, 2018. Laurus Labs submitted amendments to the notice on March 24, 2019 and May 23, 2019 that included clarification of the identity of the starting material, additional batch analyses, updated dietary exposure estimates, additional narrative regarding the results of toxicological studies, and data and information supporting the non-genotoxicity of curcumin.

The subject of the notice is synthetic curcumin for use as an ingredient in food categories and at levels specified in Table 1. The notice informs us of Laurus Labs' view that this use of synthetic curcumin is GRAS through scientific procedures.


Table 1. Food categories and intended maximum use levels of synthetic curcumin.

Food category	Use level (mg/100 g)
Fats and oils	0.5
Meat substitutes, mainly legume proteins	2
Milk, fluid, evaporated and condensed; sweet dairy cream; shellfish; soups, broths, extracts from meat, poultry, fish base ^a ; gravies from meat, poultry, fish base ^a ; soups with legumes as major ingredient; soups with grain product as major ingredient; bars; pancakes; dark-green vegetable soups; tomato soups; vegetable soups; white potato with meat, poultry, fish (mixtures) ^a ; Puerto Rican stews or soups with starchy vegetables (viandas); regular salad dressings; jellies, jams, preserves; crackers and salty snacks; cookies, cakes, pies, breakfast pastries; egg dishes	5
Yogurt; puddings, custards, and other milk desserts; finfish; other seafood; sandwiches with meat, poultry, or fish ^a ; nuts; waffles, French toast; candies; fruit drinks; cereals and cereals grains ready to eat and cooked; cheeses	10
Milk desserts, frozen; ices or popsicles; flavored milk and milk drinks, regular and imitation	15
Dried peas, lentils, and mixtures; potato recipes; other cooked vegetables, cooked with sauces, batters, casseroles; coffee; tea; nutrition drinks; other functional beverages; breads and pasta; beverages non-fruit, fruit and veggie juices; vegetables	20

U.S. Food and Drug Administration
 Center for Food Safety & Applied Nutrition
 5001 Campus Drive
 College Park, MD 20740
www.fda.gov

Fuente: (Food Drug Administration, 2019)

ANEXO 5: NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 2176:2013

CDU: 614.777:620.113 ICS: 13.060.01		CIU: 4100 AL 01.06-203
Norma Técnica Ecuatoriana Voluntaria	AGUA. CALIDAD DEL AGUA. MUESTREO. TÉCNICAS DE MUESTREO	NTE INEN 2176:2013 Primera revisión 2013-06
<p style="text-align: center;">1. OBJETO</p> <p>1.1 Esta norma establece guías sobre las técnicas de muestreo usadas para obtener los datos necesarios en los análisis de control de calidad, de las aguas naturales, aguas contaminadas y aguas residuales para su caracterización.</p> <p style="text-align: center;">2. ALCANCE</p> <p>2.1 Esta norma se aplica a las técnicas de muestreo generales.</p> <p>2.2 No se aplica a los procedimientos para situaciones especiales de muestreo.</p> <p style="text-align: center;">3. DEFINICIONES</p> <p>3.1 Para el propósito de esta norma, se aplican las siguientes definiciones:</p> <p>3.1.1 <i>Muestra compuesta.</i> Es la formada por dos o más muestras o submuestras, mezcladas en proporciones conocidas, de la cual se puede obtener un resultado promedio de una característica determinada. Las proporciones para la mezcla se basan en las mediciones del tiempo y el flujo.</p> <p>3.1.2 <i>Muestra instantánea, puntual, individual.</i> Es la muestra tomada al azar (con relación al tiempo y/o lugar de un volumen de agua).</p> <p>3.1.3 <i>Equipo de muestreo:</i> Es el equipo usado para obtener una muestra de agua, para el análisis de varias características predefinidas.</p> <p>3.1.4 <i>Muestreo.</i> Es el proceso de tomar una porción, lo más representativa, de un volumen de agua para el análisis de varias características definidas.</p> <p style="text-align: center;">4. DISPOSICIONES GENERALES</p> <p>4.1 Tipos de muestra. Son necesarios para indicar la calidad del agua, todos los datos analíticos obtenidos mediante la determinación de parámetros como: las concentraciones de material inorgánico, minerales o químicos disueltos, gases disueltos, materia orgánica disuelta y materia en suspensión en el agua o en el sedimento en un tiempo y lugar específicos o a intervalos de tiempo y en un lugar en particular.</p> <p>4.1.1 Ciertos parámetros, como las concentraciones de gases disueltos deben medirse "in situ", para obtener resultados exactos. Se debe tener en cuenta que los procesos para conservar la muestra se realizará en los casos específicos (ver NTE INEN 2169).</p> <p>4.1.2 Se recomienda separar las muestras que van a ser usadas en los análisis químicos, microbiológicos y biológicos, debido a que el proceso y el equipo para la recolección y manejo de las muestras es diferente.</p> <p>4.1.3 Las técnicas de muestreo varían de acuerdo a situaciones específicas. Los diferentes tipos de muestreo son descritos en el capítulo 5.</p> <p>4.1.4 Es necesario diferenciar el muestreo para agua estancada y el muestreo para agua corriente.</p>		

Fuente: (Food Drug Administration, 2019)

ANEXO 6: Tabla de resultados de absorbancia sobre la especificidad del biosensor cuantificado por equipo de lector de placa Elisa.

9:00 am													
Concentración (ppm)	HgCl ₂		Concentración (ppm)	AgNO ₃		Pb(NO ₃) ₂		Cd(NO ₃) ₂		CrCl ₃		CONTROL	
	ABS	ABS		ABS	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS
1,00	0,58	0,55	5,00	4,72	4,75	2,63	2,85	1,07	1,00	4,71	4,68	0,81	0,81
0,20	0,79	0,79	1,00	3,68	3,78	2,29	2,03	1,63	1,70	1,88	1,88	0,87	0,86
0,04	0,86	0,85	0,20	1,44	1,88	1,72	1,07	1,44	1,44	0,82	0,82	0,88	0,86
0,01	0,82	0,84	0,04	0,64	0,55	0,97	0,91	1,30	1,35	0,57	0,58	0,88	0,86
0,00	0,88	0,88	0,01	0,56	0,57	0,87	0,85	0,85	0,83	0,54	0,53	0,86	0,86
0,00	0,85	0,90	0,00	0,54	0,56	0,86	0,85	0,77	0,76	0,79	0,78	0,86	0,86
0,00	0,88	0,88	0,00	0,84	0,85	0,88	0,86	0,82	0,80	0,83	0,84	0,85	0,87
0,00	0,87	0,87	0,00	0,84	0,84	0,89	0,85	0,88	0,85	0,86	0,88	0,87	0,86
11:00 am													
Concentración (ppm)	ABS		Concentración (ppm)	ABS		ABS		ABS		ABS		ABS	
1,00	0,65	0,66	5,00	4,84	4,70	2,42	2,58	1,10	1,03	4,77	4,89	0,88	0,85
0,20	0,80	0,81	1,00	3,77	3,88	2,13	1,99	1,65	1,74	1,99	1,97	0,85	0,86
0,04	0,81	0,84	0,20	1,46	1,90	1,72	1,07	1,46	1,45	0,84	0,83	0,85	0,84
0,01	0,88	0,87	0,04	0,67	0,59	0,96	0,90	1,43	1,48	0,57	0,56	0,85	0,85
0,00	0,93	0,86	0,01	0,59	0,60	0,87	0,84	0,94	0,62	0,53	0,52	0,83	0,84
0,00	0,89	0,88	0,00	0,57	0,56	0,84	0,84	0,75	0,75	0,79	0,77	0,83	0,83
0,00	0,90	0,87	0,00	0,82	0,82	0,83	0,82	0,79	0,77	0,81	0,81	0,81	0,85
0,00	0,89	0,88	0,00	0,86	0,85	0,89	0,88	0,86	0,80	0,84	0,83	0,85	0,88

Fuente: (Autores,2024)

ANEXO 7:Tabla de resultados de absorbancia de la proteína GFP sintetiza por el biosensor en presencia de varios metales pesados y cuantificado por equipo de lector de placa Elisa.

9:00 AM								
<i>HgCl2</i>		Concentració n (ppm)	AgNO3 ABS	Pb(NO3) 2 ABS	Cd(NO3)2 ABS	CrCl3 ABS	CONTROL	
Concentración (ppm)	ABS						Concentració n (ppm)	ABS
1,00	0,25	5,00	-3,92	-1,93	-0,23	-3,88	0,00	0,81
0,20	0,07	1,00	-2,87	-1,29	-0,80	-1,02	0,00	0,86
0,04	0,02	0,20	-0,79	-0,53	-0,57	0,05	0,00	0,87
0,01	0,04	0,04	0,28	-0,07	-0,45	0,30	0,00	0,87
0,00	-0,01	0,01	0,30	0,00	0,02	0,33	0,00	0,86
0,00	-0,01	0,00	0,31	0,00	0,09	0,07	0,00	0,86
0,00	-0,02	0,00	0,02	-0,01	0,05	0,02	0,00	0,86
0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,87

11:00 AM								
<i>HgCl2</i>		Concentració n (ppm)	AgNO3 ABS	Pb(NO3) 2 ABS	Cd(NO3)2 ABS	CrCl3 ABS	CONTROL	
Concentración (ppm)	ABS						Concentració n (ppm)	ABS
1,00	0,21	5,00	-3,91	-1,64	-0,20	-3,96	0,00	0,86
0,20	0,05	1,00	-2,97	-1,20	-0,84	-1,13	0,00	0,85
0,04	0,02	0,20	-0,83	-0,55	-0,60	0,01	0,00	0,85
0,01	-0,03	0,04	0,22	-0,08	-0,61	0,29	0,00	0,85
0,00	-0,06	0,01	0,24	-0,02	0,05	0,31	0,00	0,83
0,00	-0,05	0,00	0,26	-0,01	0,08	0,05	0,00	0,83
0,00	-0,05	0,00	0,01	0,00	0,05	0,02	0,00	0,83
0,00	-0,02	0,00	0,01	-0,02	0,03	0,03	0,00	0,87

Fuente: (Autores,2024)

ANEXO 8: Tabla de la placa 1 sobre los resultados de absorbancia de sensibilidad a concentraciones de 0-0,5-0,75-1 ppm del biosensor cuantificado por equipo de lector de placa Elisa.

<i>09:00 AM</i>																
		1	2	3		4	5	6		7	8	9		10	11	12
	PP M		ABS		PP M	ABS	ABS	PP M	ABS	PP M	ABS	PP M	ABS	PP M	ABS	
A	0,00	0,89	0,86	0,87	0,50	0,74	0,74	0,76	0,75	0,58	0,52	0,56	1,00	0,43	0,44	0,47
B	0,00	0,90	0,87	0,85	0,10	0,83	0,81	0,82	0,15	0,79	0,74	0,76	0,20	0,78	0,76	0,82
C	0,00	0,89	0,87	0,86	0,02	0,84	0,82	0,84	0,03	0,79	0,75	0,80	0,04	0,76	0,80	0,82
D	0,00	0,94	0,86	0,85	0,00	0,84	0,84	0,84	0,01	0,83	0,84	0,83	0,01	0,81	0,82	0,86
E	0,00	0,91	0,82	0,81	0,00	0,82	0,82	0,79	0,00	0,81	0,81	0,83	0,00	0,82	0,85	0,89
F	0,00	0,96	0,91	0,83	0,00	0,85	0,82	0,81	0,00	0,83	0,82	0,82	0,00	0,83	0,86	0,90
G	0,00	0,98	0,92	0,88	0,00	0,89	0,89	0,87	0,00	0,87	0,89	0,88	0,00	0,89	0,90	0,94
H	0,00	0,97	0,93	0,85	0,00	0,87	0,84	0,90	0,00	0,83	0,81	0,88	0,00	0,84	0,85	0,93
<i>11:00 AM</i>																
		1	2	3		4	5	6		7	8	9		10	11	12
	PP M		ABS		PP M	ABS	ABS	PP M	ABS	PP M	ABS	PP M	ABS	PP M	ABS	
A	0,00	0,95	0,88	0,88	0,50	0,79	0,78	0,80	0,75	0,66	0,60	0,63	1,00	0,50	0,49	0,63
B	0,00	0,91	0,87	0,85	0,10	0,82	0,80	0,81	0,15	0,78	0,75	0,76	0,20	0,78	0,77	0,82
C	0,00	0,89	0,87	0,85	0,02	0,84	0,82	0,84	0,03	0,79	0,75	0,79	0,04	0,75	0,79	0,84
D	0,00	0,91	0,84	0,84	0,00	0,84	0,84	0,85	0,01	0,83	0,84	0,83	0,01	0,82	0,82	0,85
E	0,00	0,90	0,85	0,84	0,00	0,83	0,83	0,81	0,00	0,82	0,82	0,83	0,00	0,83	0,84	0,86
F	0,00	0,93	0,90	0,83	0,00	0,85	0,83	0,82	0,00	0,83	0,82	0,83	0,00	0,83	0,85	0,87
G	0,00	0,94	0,89	0,87	0,00	0,87	0,86	0,85	0,00	0,86	0,87	0,86	0,00	0,86	0,86	0,91
H	0,00	0,94	0,92	0,88	0,00	0,86	0,85	0,87	0,00	0,85	0,84	0,86	0,00	0,86	0,86	0,94

Fuente: (Autores,2024)

ANEXO 9: Tabla de la placa 2 sobre los resultados de absorbancia de sensibilidad a concentraciones de 1,5-1,75-2-2,25 ppm del biosensor cuantificado por equipo de lector de placa.

09:00 AM																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12				
	PP M	ABS		PPM		ABS		PP M	ABS		PPM		ABS			
A	1,50	0,58	0,4 3	0,44	1,75	0,3 9	0,37	0,37	2,00	0,32	0,3 7	0,35	2,25	0,32	0,35	0,34
B	0,30	0,78	0,7 8	0,76	0,35	0,7 4	0,74	0,73	0,40	0,73	0,7 3	0,72	0,45	0,72	0,73	0,72
C	0,06	0,86	0,8 2	0,80	0,07	0,8 0	0,79	0,81	0,08	0,79	0,7 7	0,80	0,09	0,76	0,80	0,80
D	0,01	0,89	0,8 6	0,84	0,01	0,8 3	0,83	0,81	0,02	0,83	0,8 1	0,83	0,02	0,81	0,83	0,86
E	0,00	0,91	0,8 5	0,84	0,00	0,8 2	0,82	0,81	0,00	0,82	0,8 1	0,81	0,00	0,82	0,85	0,85
F	0,00	0,91	0,8 6	0,84	0,00	0,8 2	0,82	0,82	0,00	0,82	0,8 2	0,83	0,00	0,82	0,85	0,87
G	0,00	0,91	0,8 7	0,86	0,00	0,8 4	0,83	0,82	0,00	0,84	0,8 2	0,83	0,00	0,85	0,84	0,88
H	0,00	0,91	0,8 7	0,87	0,00	0,8 4	0,84	0,84	0,00	0,85	0,8 2	0,83	0,00	0,80	0,85	0,91
11:00 AM																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12				
	PP M	ABS		PPM		ABS		PP M	ABS		PPM		ABS			
A	1,50	0,73	0,4 2	0,48	1,75	0,3 6	0,38	0,35	2,00	0,32	0,4 2	0,43	2,25	0,32	0,45	0,45
B	0,30	0,84	0,7 6	0,75	0,35	0,7 3	0,73	0,73	0,40	0,71	0,7 2	0,72	0,45	0,71	0,73	0,74
C	0,06	0,88	0,8 0	0,78	0,07	0,7 8	0,77	0,79	0,08	0,77	0,7 5	0,78	0,09	0,75	0,78	0,80
D	0,01	0,89	0,8 3	0,82	0,01	0,8 2	0,81	0,80	0,02	0,82	0,7 9	0,82	0,02	0,80	0,80	0,85
E	0,00	0,90	0,8 3	0,83	0,00	0,8 1	0,81	0,80	0,00	0,81	0,8 0	0,80	0,00	0,80	0,82	0,84
F	0,00	0,91	0,8 4	0,83	0,00	0,8 1	0,81	0,81	0,00	0,82	0,8 1	0,81	0,00	0,79	0,82	0,85
G	0,00	0,94	0,8 7	0,85	0,00	0,8 3	0,81	0,82	0,00	0,82	0,8 1	0,81	0,00	0,83	0,82	0,87
H	0,00	0,94	0,8 9	0,88	0,00	0,8 5	0,86	0,85	0,00	0,86	0,8 3	0,84	0,00	0,82	0,85	0,94

Fuente: (Autores,2024)

ANEXO 10: Tabla de la placa 3 sobre los resultados de absorbancia de sensibilidad a concentraciones de 2,5-2,75-3-3,25 ppm del biosensor cuantificado por equipo de lector de placa.

09:00 AM																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12				
	PP M	ABS			PP M	ABS			PP M	ABS			PP M	ABS		
A	2,50	0,29	0,28	0,26	2,75	0,21	0,21	0,23	3,00	0,19	0,19	0,19	3,25	0,15	0,16	0,16
B	0,50	0,75	0,76	0,76	0,55	0,73	0,76	0,75	0,60	0,68	0,70	0,71	0,65	0,63	0,64	0,66
C	0,10	0,84	0,82	0,80	0,11	0,79	0,79	0,79	0,12	0,79	0,80	0,80	0,13	0,78	0,80	0,82
D	0,02	0,90	0,89	0,85	0,02	0,84	0,82	0,83	0,02	0,84	0,86	0,82	0,03	0,83	0,84	0,87
E	0,00	0,88	0,86	0,86	0,00	0,85	0,85	0,84	0,00	0,86	0,86	0,85	0,01	0,85	0,86	0,88
F	0,00	0,89	0,89	0,87	0,00	0,84	0,84	0,84	0,00	0,85	0,86	0,87	0,00	0,86	0,87	0,88
G	0,00	0,91	0,89	0,89	0,00	0,86	0,85	0,85	0,00	0,88	0,87	0,86	0,00	0,86	0,87	0,89
H	0,00	0,95	0,92	0,90	0,00	0,87	0,89	0,91	0,00	0,93	0,90	0,90	0,00	0,85	0,87	0,89
11:00 AM																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12				
	PP M	ABS			PP M	ABS			PP M	ABS			PP M	ABS		
A	2,50	0,30	0,36	0,32	2,75	0,21	0,20	0,24	3,00	0,19	0,20	0,19	3,25	0,14	0,18	0,18
B	0,50	0,77	0,78	0,78	0,55	0,74	0,77	0,78	0,60	0,72	0,75	0,77	0,65	0,73	0,73	0,78
C	0,10	0,87	0,79	0,82	0,11	0,82	0,81	0,80	0,12	0,82	0,83	0,83	0,13	0,85	0,87	0,91
D	0,02	0,93	0,89	0,87	0,02	0,86	0,85	0,85	0,02	0,86	0,88	0,85	0,03	0,87	0,89	0,96
E	0,00	0,95	0,87	0,88	0,00	0,86	0,86	0,85	0,00	0,88	0,88	0,89	0,01	0,89	0,89	0,96
F	0,00	0,92	0,89	0,89	0,00	0,85	0,86	0,86	0,00	0,86	0,87	0,90	0,00	0,89	0,91	0,95
G	0,00	0,93	0,90	0,89	0,00	0,87	0,86	0,87	0,00	0,89	0,91	0,91	0,00	0,90	0,93	0,97
H	0,00	1,00	0,94	0,92	0,00	0,91	0,94	0,97	0,00	0,99	0,97	1,00	0,00	0,95	0,98	1,03

Fuente: (Autores,2024)