



ISSN EN

LINEA 2661-6785

ISSN IMPRESO 2661-6793

<http://revistasojs.utn.edu.ec/index.php/recinatur/submission/wizard/3?submissionId=196>

<http://www.recinatur.periodikos.com.br/>

<http://dx.doi.org/>



Instituto de
Posgrado



eGIER

Grupo de Investigación
de Ciencias en RED
Universidad Técnica del Norte



Fecha de presentación Enero 2019-Fecha de aprobación Mayo 2019

CONSTRUCTION OF THE BIOSENSOR TO DETECT ARSENIC IN WATER BY APPLYING TECHNOLOGY DEVELOPED BY PUCE-SI

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

Edith Verónica Mejía Segovia¹, Santiago Xavier Mafla Andrade¹, Diego Javier Jauregui Sierra¹, Moraima Cristina Mera Aguas¹

¹Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales. e-mail evmejia@pucesi.edu.ec

Resumen

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

Palabras Claves: Biosensor bacteriano, Arsénico, *Escherichia coli*

Abstract

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

Key words: Bacterial biosensor, Arsenic, *Escherichia coli*

Introducción

El agua es un recurso natural indispensable para el desarrollo de la vida en la tierra. Por eso el tema de contaminación de este recurso hídrico se ha vuelto de gran interés a nivel mundial. (ATSDR, 2007). Actualmente en nuestro país existe un incremento de contaminación al agua debido a varios motivos, por ejemplo, la explotación minera tanto de forma artesanal como a mayor escala, siendo las mineras artesanales las que más contaminación de metales pesados aporta al ambiente debido a la falta de control. (Legarreta, 2015)

Las mineras tienen impactos negativos al medio físico, debido a la instalación de la maquinaria necesaria para el cumplimiento de la misma, que destruyen zonas de la naturaleza, como por ejemplo causa un cambio a la vista del paisaje, también emite material particulado y gases, vertiendo ácido de mina y lixiviados contaminantes sin control como por ejemplo el arsénico. Este metaloide es muy tóxico en su forma inorgánica. Su mayor amenaza para la salud pública reside en la utilización de agua contaminada para beber, preparar alimentos y regar cultivos alimentarios. El arsénico es una de las 10 sustancias químicas que la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera más preocupantes para la salud pública y el ambiente. (OMS, 2016)

En la actualidad existen diferentes técnicas convencionales para la detección y cuantificación de arsénico, las cuales pueden llegar a ser muy costosas y algunas pueden ser tóxicas para el ser humano. Una de estas técnicas es la Espectrometría de Absorción Atómica, esta técnica analítica es una de las más utilizadas, debido a su alta sensibilidad y poder de resolución. (Metalyser, 2013). No obstante, esta técnica no permite la identificación de los estados de oxidación ni complejos.

Otras técnicas con “kits” comerciales son: El Arsen- test (Merck), esta técnica trabaja con concentraciones entre $10 \mu\text{g. l}^{-1}$ y $100 \mu\text{g. l}^{-1}$. Sin embargo, produce gas de arsina durante su desarrollo. El Hach es otra técnica que permite la detección de arsénico, este posee una gama de colores más amplia, trabaja con concentraciones entre 10 y $70 \mu\text{g.L}$, atrapa el gas arsina que se produce en una determinación mediante los tubos de reacción que tiene la tapa. (Erickson, 2003).

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

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

- Oliver Valenzuela, (2010) realizó una evaluación de arsénico en agua empleando biosensores microbianos en México, utilizando la bacteria *E. coli* por medio de técnicas que permiten la

cuantificación de arsénico en muestras de agua. Se utilizó cepas transformadas de cepas de *E. coli* pMV132-arsR-ABS y *E. coli* pJAMA-arsR-ABS las cuales tienen insertado un plásmido que le concede una resistencia a la ampicilina, codificado para la β -galactosidasa y luciferaza respectivamente. Determinando las condiciones óptimas de operación en base a una serie de modificaciones a métodos por Stocker y Van Der Meer, posteriormente evaluó estos métodos junto con EAA y Wagtech Arsenator digital mediante un análisis estadístico, donde encontró que el EAA y Wagtech Arsenator tiene un intervalo de trabajo amplio, una mayor sensibilidad, y en comparación con otros biosensores probados no tiene ningún efecto matriz. (Valenzuela, 2010)

- Wackwitz, (2008) junto con sus compañeros, realizaron un estudio sobre la Calibración interna de bioensayos de arsenito con la utilización de múltiples líneas de células bioreportadoras, utilizando diferentes *Escherichia coli* que expresan citocromo o B-galactosidasa que fueron construidos tras la inducción de arsenito. Dando como resultado una producción de señal con varias intensidades en la misma concentración de arsenito, lo que les permitió utilizar combinaciones de líneas celulares para definir la concentración de arsenito gamas, en las cuales no dieron señales cualitativas en una o más líneas celulares. (Wackwitz, *et al.*, 2008)
- Stocker, junto con sus compañeros, en una publicación que realizaron en el 2003, sobre un desarrollo de un conjunto de Biosensores bacterianos para la rápida y Cuantitativa Medición de arsenito y arsenato en agua potable, donde utilizaron el mecanismo de resistencia natural de *E. coli* de un laboratorio no patógena contra el arsenito y el arseniato, con tres proteínas reporteras: la luciferaza bacteriana, la β -galactosidasa y la Proteína Verde Fluorescente (GFP). Dando como un resultado que el sistema más cuantitativo expresó la luciferaza bacteriana, siendo la proteína informadora, la cual respondió proporcionalmente a rangos de concentraciones más altas. (Stocker, *et al.*, 2003)

Por esta razón se propone realizar biosensores por medio de la aplicación de tecnología de los laboratorios de la PUCE – SI, utilizando la bacteria *Escherichia coli* modificada la cual es capaz de detectar la presencia de arsénico en un medio líquido.

Métodos

Esta Investigación experimental se realizó en el laboratorio de Biotecnología de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales de la Pontificia Universidad Católica Sede Ibarra.

Para el análisis de las variables de absorbancia se utilizó una estadística no paramétrico de Kruskal Wallis. Para la determinación de las variables dependientes, independientes y obtención de resultados de la presente investigación se realizó varios pasos que se describe a continuación:

Elaboración del Plásmido

Para la elaboración del plásmido se buscó las secuencias de los genes: Luminiscencia (permite

la emisión de luminiscencia), resistencia al arsénico (forma un complejo con la actividad de bombeo para poder expulsar el arsenito), (Marrero, Díaz, & Coto, 2010) en NCBI (National Center for Biotechnology Information). Posteriormente se envió a MACROGEN Inc Korea las secuencias para la síntesis de las mismas, dando como producto al plásmido pTOP Blunt V2.

Transformación bacteriana por el Método Físico de Electroporación

Se preparó Agar LB Luria Bertani - BD® LB Agar, Miller para proporcionar los nutrientes necesarios para el crecimiento y conservación de las bacteria *Escherichia Coli*. Se dejó en reposo el agar LB hasta que alcance una temperatura de 37°C (óptima) para poder colocar la ampicilina (Ampibex 250 mg Ampicilina life). Una vez solidificado el agar en las cajas Petri se colocó de X-Gal (Thermo Scientific™) en cada una, y se dejó en la Incubadora (Thermo Scientific™) por 1 hora a una temperatura de 37° C.

Se realizó la transformación de las células siguiendo el protocolo de Neon Transfection System (Thermo Scientific™). Una vez transformadas las células, se colocó en un tubo falcom las células transformadas y se adicionó 1ml de S.O.C. Medium (Thermo Scientific™), y se puso en Incubadora Shaking NB-205L N_BIOTEK® a 37° C, 225 rpm, por una hora. Se dispensó de 100 – 300 µL de la mezcla en las cajas Petri, esto se dejó dos días en la Incubadora (Thermo Scientific™) a 37° C.

Preparación del biosensor a diferentes concentraciones

Se inoculo en caldo LB (Luria Bertani) ® cepas bacterianas de *E.coli* transformada con As a diferentes concentraciones: 0ppm; 0,01ppm (límite máximo permisible para el consumo humano); 0,02ppm; 0,04ppm y 0,08ppm, después de 24 horas de incubación se colocó en un transiluminador UV LabNet™ Inc para poder visualizar la luminiscencia.

Finalmente se realizó el análisis de Arsénico por metodología de Espectrofotómetro de microplacas EPOCH a una absorbancia de 550 nm y por metodología de EAA (Espectroscopia de Absorción Atómica), para lo cual se trabajó con el espectrofotómetro de Absorción Atómica SensAA© de GBC Scientific Equipement. Debido a la naturaleza del metaloide se utilizó la técnica de absorción atómica (GFAAS) por medio del Sistema 5000 Horno de Grafito GBS.

Resultados y Discusión

Elaboración del Plásmido

El plásmido se obtuvo tras el envío de secuencias de genes previamente identificadas y seleccionadas a la empresa ©MACROGEN Inc, dando como resultado al plásmido pTOP_Blunt_V2:

- **Vector:** pTOP_Blunt_V2



Figura 1. Mapa esquemático del plásmido pTOP Blunt V2

Fuente: (MACROGEN Inc, 2018)

Características del plásmido:

El sitio del promotor Lac está ubicado en: 95-216, los sitios de clonación múltiple son: 234-357. El Gen de resistencia a la kanamicina (Kanr) está ubicado en: 1057-1989, mientras que el gen de resistencia a la Ampicilina (Amp) se encuentra en: 2007-2867. Los sitios de origen de pUC son: 3012-3685. (MACROGEN Inc, 2018)

Transformación bacteriana

A partir de las muestras electroporadas, las cepas presentaron un color blanco, indicando que las células fueron transformadas. Una vez identificadas, 3 colonias fueron sometidas a pruebas de tolerancia al arsénico mediante la siembra en medio de cultivo a diferentes concentraciones como única fuente de energía.



Figura 2. Cepas Transformadas por método de electroporación

Fuente: Autora

Los biosensores bacterianos fueron expuestos a diferentes concentraciones del metaloide:

0ppm; 0,01ppm (límite máximo permisible para el consumo humano según la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1108); 0,02ppm; 0,04ppm y 0,08ppm; para poder evaluar la capacidad de detectar arsénico. Los ensayos se determinaron por la presencia de Luminiscencia, presentes a las 24 horas. Dwivedi (2016) menciona en su investigación que la actividad luminiscente del gen de la luciferasa proporciona una medición simple y sensible de la expresión y de la regulación génica.

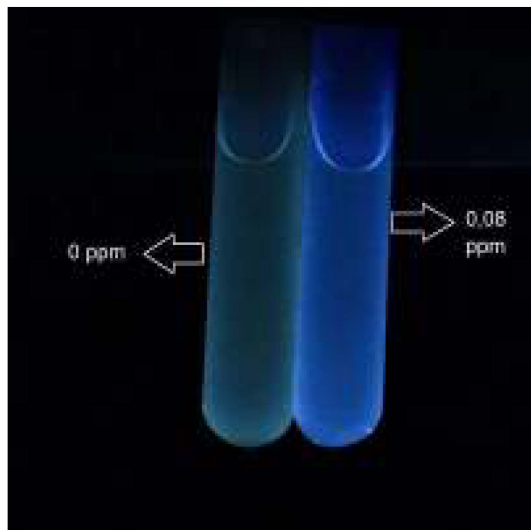


Figura 3. Expresión de luminiscencia a una concentración de 0,08 ppm

Fuente: Autora

Al evaluar la cepa *E. coli* transformada, frente a distintas concentraciones de arsénico (Figura 4). Los resultados demostraron que la intensidad del luminiscencia presente a las 24 horas de incubación a 37° C, fue diferente para cada concentración, donde se observó que la intensidad de luminiscencia aumentó a medida que aumentaba la concentración de arsénico a la que fue expuesta.

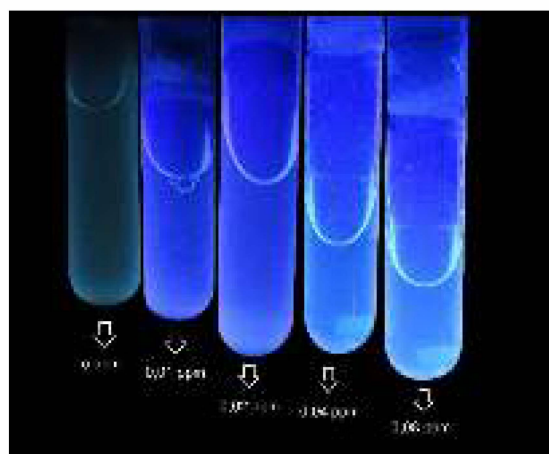


Figura 4. Determinación de luminiscencia a diferentes concentraciones de As

Fuente: Autora

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

Trang, et al., (2005) informan en un estudio similar, que la capacidad del bioinformador *E. coli* DH5 α (pJAMA-arsR) del gen de la luciferasa bacteriana (luxAB) *E. coli* DH5 α (pJAMA-arsR) puede detectar As en agua, esta señal luminiscente se expresó a las 2 horas. Al agregar concentraciones de arsénico en el agua, los biosensores demostraron un aumento correspondiente en la bioluminiscencia.

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

Cuantificación de As en Espectrofotómetro de microplacas EPOCH y Espectroscopia de Absorción Atómica en Horno de grafito (GFAAS)

En la Cuantificación de arsénico se utilizó la cepa de *E. coli* modificada, esta fue expuesta a diferentes concentraciones del metaloide, se realizó tres repeticiones obteniéndose una media de los valores de concentración. Se midió la absorbancia por medio de los equipos de Espectrofotómetro de Microplaca Epoch™ de Biotek instruments y Espectrofotómetro de Absorción Atómica SensAA© de GBC Scientific Equipement, para comparar y determinar el porcentaje de error de la absorbancia (Tabla 1) obtenida.

Al evaluar las muestras con diferentes concentraciones de arsénico (0; 0,01; 0,02; 0,04; 0,08 ppm), los resultados indicaron que aumentó la absorbancia con forme se incrementa la concentración de arsénico. En la figura 5 se presenta la curva de absorbancia obtenida con el Espectrofotómetro de microplacas EPOCH a una densidad óptica de 550 nm, se realizó una curva de calibración en base al metaloide, dividiendo en diferentes concentraciones en ppm, la curva presento una R² de 0,9999.

En la figura 6 se presenta la curva de absorbancia para la cuantificación de arsénico empleando en espectrofotometría de absorción atómica, donde se obtuvo una recta con una R² de 0,9975. Lo cual se asemeja con la investigación de Valenzuela (2010), quien menciona en su investigación que obtuvo una recta con una R² de 0,9999 en la cuantificación de arsénico en agua, por lo que se puede decir que se considera confiable.

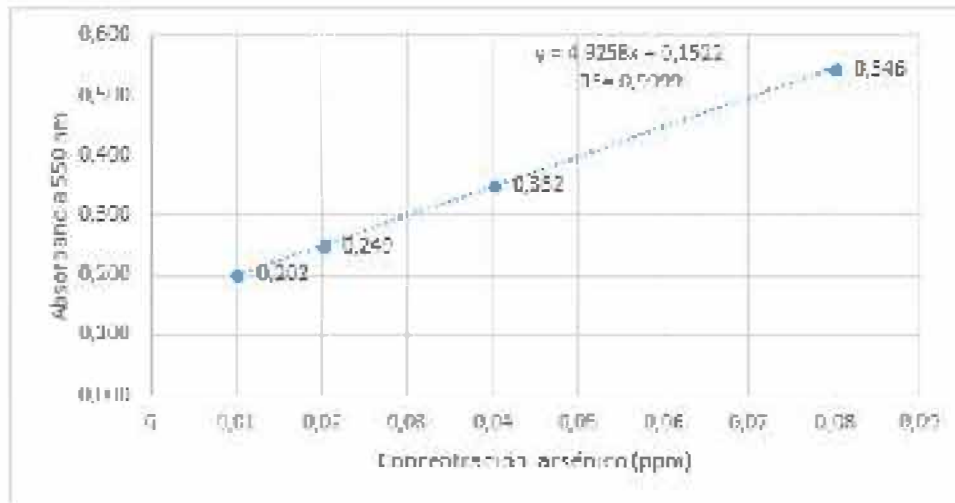


Figura 5. Curva de absorción a 550 nm por metodología de Espectrofotómetro de microplacas EPOCH de arsénico a diferentes concentraciones

Fuente: Autora

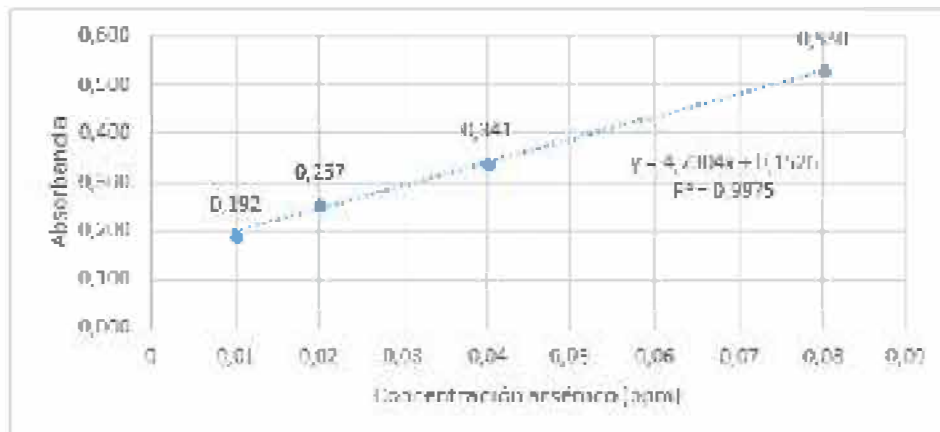


Figura 6. Curva de absorción por Espectroscopia de Absorción Atómica en Horno de grafito (GFAAS) de arsénico a diferentes concentraciones

Fuente: Autora

Al comparar los parámetros estadísticos del biosensor bacteriano con el método de EAA se puede observar que la recta obtenida para él primero, presentó un intervalo de trabajo con una R^2 de 0,9999 de 0 a 0,08 ppm, mientras que la del método de EAA presentó un intervalo de linealidad con una R^2 de 0,9975. Cumpliendo ambas con el requisito de ser lineales en un intervalo de concentración (Miller & Miller, 1993).

Por otro lado, tenemos que el intervalo de trabajo para el biosensor es de 0,202 a 0,546 unidades de absorbancia, siendo menor que el de EAA, por lo que éste último nos permite trabajar con muestras con baja o alta concentración de arsénico sin la necesidad de concentrarlas o diluirlas (Miller & Miller, 2002).

El biosensor puede medir concentraciones de As de 0,01 a 0,08ppm con un promedio de error de 2,8% con respecto a medición de EAA, lo que indica que los valores obtenidos experimentalmente se aproximan a los valores Teóricos.

Tabla 1. *Concentración de arsénico por metodología de Espectrofotómetro de microplacas EPOCH y Espectroscopia de Absorción Atómica en Horno de grafito (GFAAS)*

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

Fuente: Autora

Conclusiones

La proteína responsable de la luminiscencia se activa cuando el arsénico entra en contacto con el biosensor midiendo así, la cantidad de luz fluorescente y comparando la luz emitida con la cantidad de arsénico, permitiendo calcular la cantidad total de arsénico presente en la muestra.

El biosensor bacteriano con *E. coli* modificada permite detectar arsénico en agua, expresando mayor luminiscencia a medida que aumente la concentración del metaloide

El biosensor bacteriano puede medir concentraciones de arsénico desde 0,01 ppm hasta 0,08ppm con un error de 2,8 % con respecto a medición de Espectroscopia de Absorción Atómica, demostrando que es efectivo la detección de arsénico

Recomendaciones

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

Bibliografía /Referencias bibliográficas.

- BioTek. (2017). *BioTek*. Obtenido de Microplate Data Collection & Analysis Software: <https://www.biotek.es/es/products/liquid-handling/>
- Dwivedi, S. (2016). Microorganism - As Biosensor for Arsenic detection. *International Journal of Research in Science and Technology*, 1-13.
- Invitrogen. (2014). En Invitrogen, *Neon Transfection System* (págs. 4-15). Thermo Fisher Scientific Inc.
- Lobos, C. P. (Noviembre de 2007). *Uso de un Biosensor bacteriano, para detección de arsénico (III), en muestras ambientales.*

- MACROGEN Inc. (2018). *Humanizing Genomics macrogen*. Obtenido de Gene Synthesis Report: https://dna.macrogen.com/eng/quotation/ces/ces_quotaion_step1.jsp
- Metalyser. (2013). *Metalyser-Catalogo-Trace-2o*. Obtenido de <http://ansam.mx/wp-content/uploads/2014/04/Metalyser-Catalogo-Trace-2o.pdf>
- Microlab Industrial. (2015). *Absorción atómica: horno de grafito*. Obtenido de <http://www.microlabindustrial.com/laboratorio/ver/metales/3/absorcion-atmica-horno-de-grafito>
- Miller, J., & Miller, J. (1993). Estadística para la Química Analítica. Capítulo 5 Errores en análisis instrumental: Regresión y Correlación. *Addison-Wesley Iberoamericana*. México, 87 -119.
- Miller, J., & Miller, J. (2002). Estadística y Quimiometría para Química Analítica. Capítulo 5 Métodos de Calibración en Análisis Instrumental: Regresión y Correlación. *Prentice Hall*. Madrid, 11 -152.
- Pingarrón, J. M. (2013). *BIOSENSORES AMPEROMÉTRICOS COMPÓSITOS BASADOS EN PEROXIDASA*. Obtenido de <http://biblioteca.ucm.es/tesis/qui/ucm-t26582.pdf>
- Trang, P., Berg, M., Viet†, P. H., Mui, N. V., & Meer, J. R. (2005). Bacterial bioassay for rapid and accurate analysis of arsenic in highly variable groundwater samples. *Environmental science & technology* 39.19, 25-30.
- Valenzuela, O. (2010). *“EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ARSÉNICO EN AGUA EMPLEANDO BIOSENSORES MICROBIANOS*. Obtenido de <http://tesis.bnct.ipn.mx:8080/jspui/bitstream/123456789/9216/1/121.pdf>