

Universidad de Panamá

Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología

Escuela de Biología



TESIS DE GRADO

“Construcción de un Biosensor Bacteriano para la Detección de Cianuro Basado en la Expresión
de la Proteína Fluorescente E2-Crimson”

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN BIOLOGÍA CON ORIENTACIÓN EN
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

PRESENTADA POR

Jafeth Abdul Carrasco

Panamá, 2022

Este trabajo ha sido posible gracias al financiamiento de la **Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación** (SENACYT) a través de los fondos de la Convocatoria Pública de Nuevos Investigadores 2018 con número de propuesta **APY-NI-2018-23**.

Dedicatoria

Dedico esta tesis a Jafeth Carrasco; por su paciencia, perseverancia y resiliencia, a pesar de las muchas veces que quiso renunciar a esta investigación.

Agradecimiento

Quiero agradecer a mis tutores Dalila Montañez, Ariel Magallón, Jordi Querol y Carmenza Spadafora por toda la disposición y tiempo invertido en mi en transmitirme parte de sus conocimientos. Sin mis tutores este trabajo no se hubiese logrado. Además, me gustaría agradecer a Natasha y Dafne, por involucrarme en este proyecto, a Laura Pineda y todos los que me ayudaron en INDICASAT. Finalmente, quiero agradecerme a mi madre y Dios.

¡Muchas gracias!
Jafeth

Índice General

Resumen.....	4
Introducción	1
Objetivos	10
Marco teórico	14
Biología Sintética como Herramienta en el Desarrollo de Biosensores	14
Extracción de ADN Plasmídico	14
Cebadores o Primers.....	14
Amplificación Mediante PCR	15
Electroforesis	15
Digestión con Enzimas de Restricción	15
Ligación.....	16
Clonación de Plásmido por Digestión con Enzimas de Restricción	16
Transformación.....	16
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) como Chasis de Biosensores	17
Secuenciación del ADN.....	17
Materiales y Métodos	21
Preparación de Medios de Cultivo y Soluciones Madre.....	21
Medio Líquido Luria-Bertrani (LB)	21

Medio Sólido	21
Preparación de Soluciones Madre de Antibióticos	21
Preparación de Ampicilina	21
Preparación de gentamicina	22
Cepas Bacterianas y Plásmidos	22
Ácidos nucleicos	23
Cebadores	23
Inserto	24
Crecimiento y Conservación de Cepas	25
Transformación Bacteriana	26
Preparación de Células Competentes	26
Transformación por Choque Térmico	26
Preparación de ADN	27
Extracción de ADN Plasmídico	27
Amplificación del Inserto	27
Purificación de Producto de PCR del inserto	28
Análisis de ADN	28
Cuantificación de ADN	28
Electroforesis en Gel de Agarosa	28
Construcción de Plásmido Recombinante	30

Digestiones Enzimáticas	30
Digestión del Plásmido pUCP20T-E2Crimson	30
Digestión del Inserto	31
Ligación de ADN	31
Verificación del plásmido recombinante.....	32
Ensayo de Sensibilidad a Cianuro	32
Ensayo de Fluorescencia de E2-Crimson	33
Análisis Estadístico	33
Resultados y Discusión	37
Diseños in silico de Inserto y plásmido pJAC.	37
Diseño in silico del inserto	37
Diseño in silico del plásmido recombinante pJAC.....	37
Clonaje Mediante Digestión con Enzimas de Restricción.....	38
Amplificación del Inserto.....	38
Digestión del Plásmido pUCP20T-E2Crimson y Digestión del Inserto.....	39
Verificación de plásmido recombinante pJAC	41
Ensayo de Sensibilidad del Biosensor al Cianuro	43
Ensayo de Fluorescencia de E2-Crimson	49
Conclusiones.....	54
Recomendaciones.....	58

Referencias Bibliográficas	62
----------------------------------	----

Índice de Figuras

Figura 1. Concentraciones de Cianuro Permitidas en Agua Potable en Diferentes Países.....	3
Figura 2. Esquema Típico de un Biosensor.	4
Figura 3. Esquema de Biosensor Microbiano Fluorescente.....	5
Figura 4. Promotor Bacteriano.....	7
Figura 5. El Grupo de Genes <i>cynFABDS</i> de <i>Pseudomonas. pseudoalcaligenes</i> CECT534.....	8
Figura 6. Proceso de ligación enzimática.....	13
Figura 7. Esquema del Inserto.....	23
Figura 8. Marcadores de peso molecular.....	27
Figura 9. Estrategia para la construcción de plásmido pJAC.....	28
Figura 10. Diseño <i>in silico</i> del Inserto.....	35
Figura 11. Diseño <i>in silico</i> de pJAC.....	36
Figura 12. Electroforesis de PCR del inserto.....	37
Figura 13. Digestión del Inserto y pUCP20T-E2Crimson.....	38
Figura 14. Inserto y pUCP20T-E2Crimson.....	38
Figura 15. Comprobación de clonación mediante digestión enzimática.....	39

Figura 16. PCR de pJAC-10Beta.....41

Figura 17. Inducción de la actividad cianasa en distintas condiciones.....48

Índice de gráficos

Gráfico 1. Crecimiento de DH5 α en distintas concentraciones de KCN (mM).....43

Gráfico 2. Crecimiento de NEB-10Beta en distintas concentraciones de KCN (mM).....43

Gráfico 3. Crecimiento de DH5 α -pJAC en distintas concentraciones de KCN (mM).....44

Gráfico 4. Crecimiento de 10Beta-pJAC en distintas concentraciones de KCN (mM).....44

Gráfico 5. Tasa de crecimiento de DH5 α vs DH5 α -pJAC.....45

Gráfico 6. Tasa de crecimiento de NEB-10Beta vs 10Beta-pJAC.....46

RESUMEN

Resumen

El cianuro es un compuesto potencialmente letal, actuando como tóxico a través de la inhibición del complejo citocromo c oxidasa, lo que por ende bloquea la cadena transportadora de electrones, sistema central del proceso de respiración celular. La contaminación ambiental causada por cianuro se ha convertido en un problema importante para la salud humana y los ecosistemas. El cianuro es un compuesto mayormente utilizado en las industrias de plásticos y minería. Sin embargo, este compuesto puede filtrarse de los sitios mineros, afectando la calidad del agua corriente abajo, y causando toxicidad aguda y crónica en los organismos vivos que dependen de esas fuentes hídricas. Por tal razón, la detección oportuna de cianuro en muestras de agua es menester para salvaguardar la salud humana y nuestros ecosistemas. Debido a esta necesidad, el objetivo principal de este trabajo fue desarrollar un biosensor para detectar compuestos cianurados en campo, basado en la expresión de la proteína fluorescente E2-crimson. Entre todas las posibles técnicas empleadas en el diseño y desarrollo de biosensores, se utilizó la técnica Clonación de Plásmidos por digestión enzimática. Se lograron clonar con éxito los genes *cynF* y el promotor del operón *cynFABDS* de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CEC4453, dando como producto el plásmido pJAC conteniendo ambas secuencias. Las cepas de *Escherichia coli*, DH5 α y NEB 10-Beta, fueron transformadas con el plásmido pJAC. Las nuevas cepas DH5 α -pJAC y 10Beta-pJAC fueron cultivadas en medio Luria-Bertani a distintas concentraciones de cianuro de potasio (KCN). Aunque no se detectó fluorescencia ante el estímulo, las cepas transformadas DH5 α -pJAC y 10Beta-pJAC, mostraron mayor tolerancia al KCN que las cepas que no poseían el plásmido pJAC, sugiriendo la posible degradación del cianuro por estas bacterias transformadas. Por lo tanto, no se descarta la posibilidad de utilizar las cepas DH5 α -pJAC y 10beta-pJAC en sistemas de biorremediación de cianuro.

SUMMARY

SUMMARY

Cyanide is a potentially lethal compound, acting as a toxin through the inhibition of the cytochrome c oxidase complex, therefore blocking the electron transport chain, the central system of the cellular respiration process. Environmental pollution caused by cyanide has become a major problem for human health and ecosystems. Cyanide is a compound mostly used in the plastic and mining industries. However, this compound can leak from mining sites, affecting downstream water quality, and causing acute and chronic toxicity to living organisms that depend on those water sources. For this reason, the timely detection of cyanide in water samples is necessary to safeguard our and the health of our environment. Due to this need, the main objective of this work was to develop a biosensor to detect cyanide compounds in the field, based on the expression of the fluorescent protein E2-crimson. Among all the possible techniques used in the design and development of biosensors, the Plasmid Cloning technique by enzymatic digestion was used. The *cynF* genes and the promoter of the *cynFABDS* operon of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CEC4453 were successfully cloned, yielding plasmid pJAC, containing both sequences, as a product. *Escherichia coli* strains DH5 α and NEB 10-Beta, were transformed with the plasmid pJAC. The new strains DH5 α -pJAC and 10Beta-pJAC were cultivated in Luria-Bertani medium at different concentrations of potassium cyanide (KCN). Even though no fluorescence was detected by the stimulus, the transformed strains Dh5 α -pJAC and 10Beta-pJAC showed greater tolerance to KCN than the strains that did not possess the pJAC plasmid, suggesting a possible degradation of cyanide by these transformed bacteria. Therefore, the possibility of using the DH5 α -pJAC and 10beta-pJAC strains in cyanide bioremediation systems is not ruled out.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Introducción

La contaminación ambiental es la alteración de los componentes físicos y biológicos del sistema tierra/atmósfera hasta el punto de que los procesos ambientales normales se ven afectados negativamente. Un contaminante puede ser cualquier sustancia química, organismo o producto biológico y/o sustancia física que el hombre libera intencional o inadvertidamente al ambiente (Muralikrishna & Manickam, 2017).

La adición continua de efluentes industriales al medioambiente ha dado lugar a un gran aumento de contaminantes tóxicos. Estos contaminantes pueden ser compuestos orgánicos e inorgánicos (Schwarzenbach et al., 2010). Entre los orgánicos se encuentran halocarburos, nitroaromáticos, polímeros sintéticos, bifenilos policlorados y dioxinas. Por otro lado, se encuentran los contaminantes inorgánicos, como metales pesados, sulfatos, nitrilos, por ejemplo, cianato y cianuro (V.M. Luque-Almagro et al., 2005).

La contaminación ambiental causada por cianuro se ha convertido en un problema importante para la salud humana y ecosistemas. El cianuro es un compuesto mayormente utilizado en las industrias de plásticos y minería (Mahendran et al., 2020). Sin embargo, este compuesto puede filtrarse de los sitios mineros, afectando la calidad del agua corriente abajo, y causar toxicidad aguda y crónica en los organismos vivos (Adekunle et al., 2019). El cianuro es un compuesto altamente tóxico debido a su unión química a la citocromo c oxidasa, enzima clave de la cadena transportadora de electrones. Esta unión puede bloquear el proceso de respiración celular (Henretig et al., 2019).

La exposición a pequeñas cantidades de cianuro puede ser mortal independientemente de la ruta de exposición. La gravedad de los efectos nocivos depende en parte de la forma del cianuro, como el gas de cianuro de hidrógeno (HCN) o las sales de cianuro, como cianuro de sodio (NaCN) y cianuro de potasio (KCN). La exposición a altos niveles de cianuro por un período corto de tiempo daña el cerebro y el corazón, e incluso puede causar coma y la muerte. El cianuro produce efectos tóxicos a concentraciones de 0.05 miligramos de cianuro por decilitro de sangre (mg/dL) o más, y se han producido muertes a concentraciones de 0.3 mg/dL y más (un decilitro equivale a 100 mililitros) (ATSDR, 2006).

La concentración de cianuro en el agua potable varía de 0,001 a 0,011 ppm (1 ppm equivale a 1 parte en peso en 1 millón de partes en volumen de agua) en los Estados Unidos y Canadá. El cloruro de cianógeno (CNCl) que se puede formar en el proceso de cloración del agua, se ha encontrado en concentraciones que van de 0,00045 a 0,0008 ppm en el agua potable de 35 ciudades de EE. UU (ATSDR, 2006).

La Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) establece regulaciones sobre la cantidad de cianuro permitida en el agua potable. La mayor cantidad permitida son 200 microgramos de cianuro por litro de agua, lo que equivale a 0,2 ppm. La EPA, también, requiere que las industrias reporten derrames de 1 libra o más de argentocianuro de potasio $[AgK(CN)_2]$ y 10 libras o más de HCN, KCN, NaCN, CaCN o CuCN (Brisbin, 2020).

Las cantidades de cianuro en agua potable permitidas en los distintos países presentan una alta variabilidad. Según la OMS el valor recomendado es de 0.07 mg/L. El 44.44% de los

países permiten concentraciones mayores a esta, que alcanzan un máximo de 0.2 mg/L. Entre estos se encuentran Canadá, Estados Unidos, Chile, Argentina, Brasil, Colombia, Ecuador y Uruguay. Por el contrario, Costa Rica, El Salvador, Nicaragua, República Dominicana y Panamá establecen límites inferiores a los de la OMS, que oscilan entre 0.001 y 0.05 mg/L, para un total del 27.77%. Finalmente, el 27.77% restante de los países adoptan la recomendación de la OMS, estos son México, Guatemala, Bolivia, Perú y Venezuela (figura 1) (Truque, 2003).

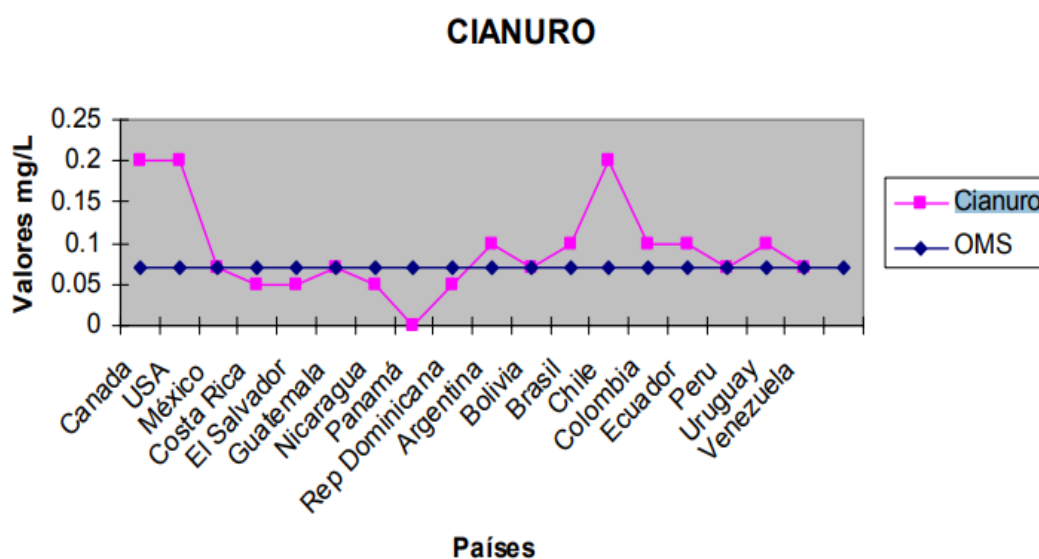


Figura 1. Concentraciones de Cianuro Permitidas en Agua Potable en Diferentes Países. La línea azul representa el valor máximo permitido de cianuro en agua potable recomendado por la OMS (0.07 mg/L). La línea rosada representa los valores permitidos en distintos países de América, siendo Panamá el país que presenta la concentración más restrictiva. fuente (Truque, 2003).

Según el *Reglamento Técnico DGNTI-COPANIT 23-395-99. AGUA. AGUA POTABLE.*

Definiciones y Requisitos Generales, en Panamá el valor máximo permitido de cianuro en agua potable es de 0,001 mg/L (Ministerio de Comercio e Industria, 1999). Para actividades

industriales, los valores máximos permisibles de cianuro total en descarga de efluentes líquidos a cuerpos receptores es de 0,2 mg/L (Ministerio de Comercio e Industrias, 2000).

La detección de cianuro en muestras de agua es importante para el control de la contaminación por este compuesto. Tradicionalmente, la detección de cianuro en agua se ha basado en métodos analíticos; como espectrometría de masas, cromatografía líquida y de gases y espectroscopia (Jackson & Logue, 2017; Jaszczak et al., 2017). Sin embargo, estos métodos analíticos son costosos, consumen energía, requieren muestras pretratadas y pueden no ser accesibles para las zonas rurales de los países en desarrollo (Khan et al., 2020).

En la busca de alternativas rentables, en términos costo-beneficio, rápidas y portátiles en el campo, han surgido técnicas que involucran el uso de sistemas biológicos, llamados biosensores.

Un biosensor es un dispositivo analítico que integra un elemento de reconocimiento biológico con un transductor físico para generar una señal medible proporcional a la concentración de los analitos (D'Souza, 2001). Los elementos biológicos activos pueden ser enzimas, anticuerpos, orgánulos, tejidos y microorganismos (Lei et al., 2006). El transductor, por su parte, convierte la respuesta biológica en una señal detectable, que puede medirse de manera electroquímica, electrónica, acústica, mecánica, óptica o colorimétrica, y luego correlacionarse con la concentración del analito (Su et al., 2011) (Figura 2).

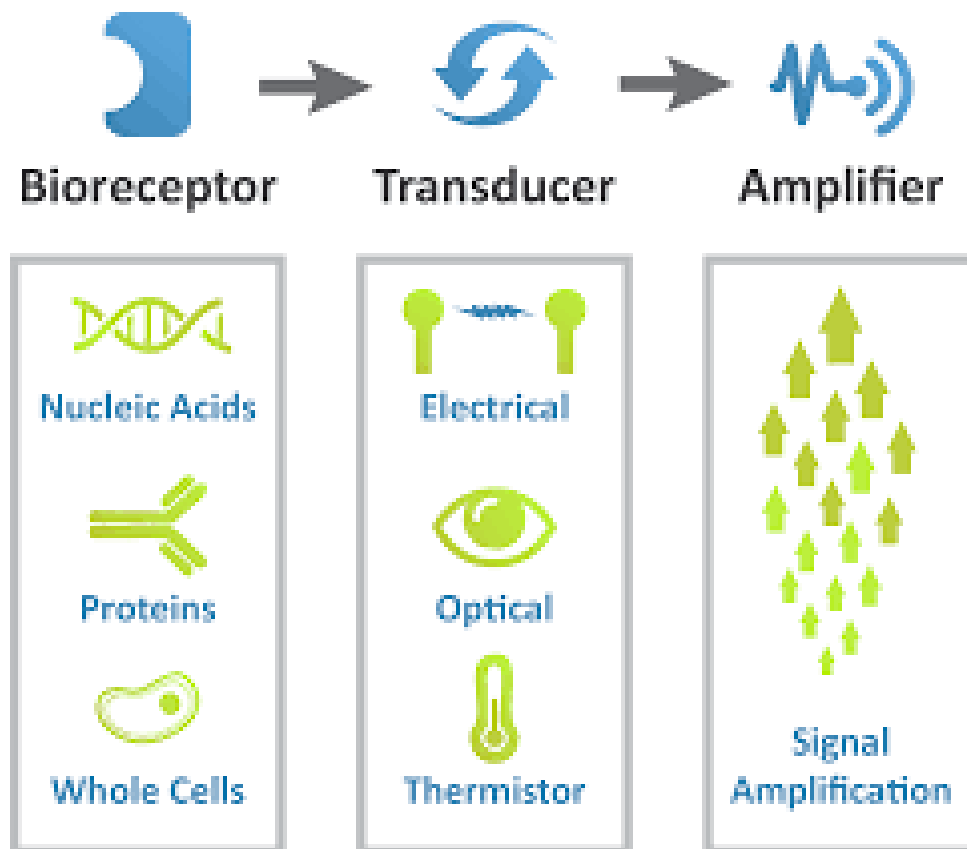


Figura 2. Esquema Típico de un Biosensor. Fuente: (Bonetto et al., 2018).

Los biosensores ópticos generalmente se basan en la medición de señales luminiscentes, fluorescentes, colorimétricas u otras señales ópticas producidas por la interacción de microorganismos con los analitos y correlaciona la señal óptica observada con la concentración del compuesto objetivo (Park et al., 2013).

Los biosensores microbianos fluorescentes utilizan microorganismos modificados genéticamente -mediante la construcción de un vector plasmídico- con fusión transcripcional entre un promotor inducible por el compuesto a detectar y un gen reportero que codifica a una proteína fluorescente, que es responsable de la producción de una señal óptica medible

(Figura 3). La señal óptica suele ser más intensa en biosensores fluorescente que en biosensores colorimétricos, además este último depende de la conversión de un sustrato cromógeno a un compuesto colorido(Su et al., 2011).

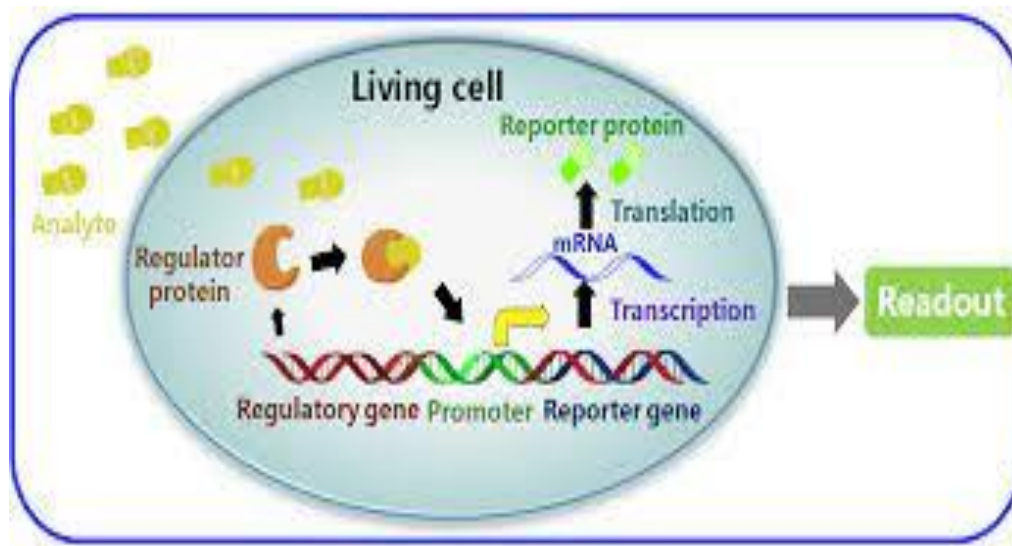


Figura 3. Esquema de Biosensor Microbiano Fluorescente. Expresión de un gen reportero bajo control de genes reguladores específicos. Las proteínas fluorescentes verde y roja son de uso común como genes reporteros (Park et al., 2013).

Las proteínas fluorescentes se utilizan ampliamente como reporteras de biosensores debido a que emiten fluorescencia y estas pueden ser activadas bajo la dirección de un gen o genes promotores (Kr emers et al., 2011). La proteína verde fluorescente (GFP, siglas en inglés) y la proteína roja fluorescente (RFP, siglas en inglés) son los reporteros más utilizados debido a su estabilidad y sensibilidad, y la fluorescencia emitida por estos puede ser detectada por equipos electrónicos (K. H. Guo et al., 2018; M. Guo et al., 2020; Jia et al., 2018). Además, se ha realizado amplias modificaciones a GFP y RFP con el fin de mejorar el brillo, estabilidad,

oligomerización y sensibilidad. E2-Crimson es otra proteína fluorescente de color rojo brillante, posee alta fotoestabilidad, alta solubilidad y baja citotoxicidad, por lo cual fue diseñada para aplicaciones *in vivo* que involucran células sensibles, células madre y bacterias (Al-Sady et al., 2016; Strack et al., 2009). Barbier y Damron diseñaron un conjunto de plásmidos que codifican 12 proteínas fluorescentes. Entre estas proteínas fluorescentes, E2-Crimson fue la proteína de maduración más rápida probada en *Escherichia coli* con el mejor rendimiento general en los parámetros del estudio (Barbier & Damron, 2016).

Un promotor es una región de ácido desoxirribonucleico (ADN) donde se inicia la transcripción de un gen o grupos de genes (operón). Los promotores son un componente vital de los vectores de expresión porque controlan la unión de la ARN polimerasa al ADN. La ARN polimerasa transcribe el ADN a ARN mensajero (ARNm), que finalmente se traduce en una proteína funcional. Por lo tanto, la región promotora controla cuándo y dónde en el organismo se expresa un gen de interés (M. Guo et al., 2020)(Figura 4). Los promotores, junto con genes reporteros fluorescentes han sido ampliamente utilizados para detectar diversos compuestos. Por ejemplo, Martínez et al. utilizaron el promotor *silE*, aislado de una *Salmonella* patógena resistente a Ag^+ para construir biosensores de Ag^+ y Cu^{2+} (Martinez et al., 2019). El promotor *merR* junto con el gen *rfp* fueron utilizados para la detección de mercurio dicatiónico (Hg^{2+}) (M. Guo et al., 2020). El descubrimiento de nuevos operones y promotores inducibles aumenta la posibilidad de desarrollar nuevos biosensores.

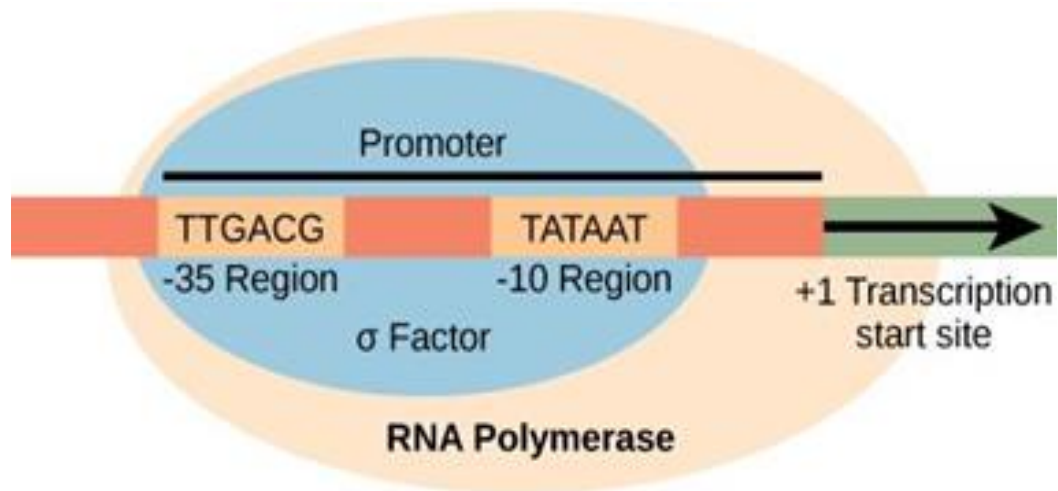


Figura 4. Promotor Bacteriano. Los promotores se encuentran corriente arriba cerca de los sitios de inicio de la transcripción de los genes (+ 1). Los promotores pueden tener una longitud de entre 100 y 1,000 pares de bases. En bacterias, el promotor contiene dos secuencias cortas esenciales para que se produzca la transcripción (-35 y -10 bp). Fuente: (Arrieta-Rangel et al., 2018).

Luque-Almagro y colaboradores aislaron y caracterizaron la bacteria *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. Esta bacteria es capaz de metabolizar el cianato, cianuro y complejos ciano-metálicos y utilizarlos como única fuente de nitrógeno en condiciones alcalinas (Víctor M. Luque-Almagro et al., 2008). Con la secuenciación completa del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, identificaron un grupo de genes involucrados en la ruta de asimilación del cianato (OCN)(figura 5). El grupo de genes *cyn*, incluye la estructura de genes *cynABD* que codifican los tres componentes de un transportador de cianato de tipo ABC y el gen *cynS* que codifica para la enzima cianasa. La cianasa metaboliza el cianato en amonio (NH_4) y dióxido de carbono (CO_2). La actividad de la cianasa es inducida tanto por cianato como por cianuro (Luque, 2005). Además, dentro de este operón se encuentra el gen *cynF*, que codifica un regulador transcripcional putativo, dependiente de σ^{54} . El regulador está ubicado 268 bp corriente arriba de *cynA*, en la dirección opuesta a *cynABDS*.

El gen *cynF* es esencial para la expresión de los genes *cynABDS* estructurales, que constituyen una única unidad transcripcional (*cynFABDS*), que es inducida por cianato y reprimida por amonio (Sáez et al., 2019). El genoma completo de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 ha sido secuenciado y los genes *cynFABDS* fueron anotados en Genbank con los números de acceso HG916826.1 y EF451798.3, respectivamente (Víctor M. Luque-Almagro et al., 2013; Wibberg et al., 2016).

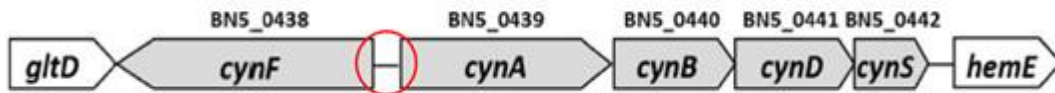


Figura 5. El Grupo de Genes *cynFABDS* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. El gen *cynF* que codifica un regulador transcripcional putativo y los genes estructurales *cynABDS*, que se transcriben en la dirección opuesta a *cynF*. Dentro del círculo rojo se indica una región promotora de los genes *cynF* y *cynA*. Los genes *cynF* y *cynA* se transcriben de forma divergente (Sáez et al., 2019).

Objetivos

Conociendo que los genes estructurales *cynFABDS* son inducidos por el cianato y cianuro, surge la posibilidad de utilizar el gen *cynF* y su promotor para el diseño y desarrollo de un biosensor de cianuro. Por tal razón, se planteó como objetivo general el desarrollo de un biosensor bacteriano para detectar compuestos cianurados basado en la expresión de la proteína fluorescente E2-crimson.

De entre todas las posibles técnicas empleadas en el diseño y desarrollo de biosensores, se propuso el uso de la técnica Clonación de Plásmidos por Digestión con Enzimas de Restricción. Para alcanzar el objetivo general propuesto, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

1. Diseñar un inserto con el gen de interés (*cynF*) y su promotor.
2. Clonar el inserto en un vector que contiene un gen que codifica para la proteína fluorescente E2-crimson.
3. Transformar las cepas bacterianas *E. coli* NEB 10-Beta y DH5 α con el vector que contiene el inserto.
4. Medir la sensibilidad de la bacteria transformada con el vector contra cianuro de potasio (KCN).
5. Verificar que la expresión de E2-crimson se encuentra controlada por el gen *cynF* y su promotor en respuesta a la presencia de KCN.

MARCO TEÓRICO

Capítulo I

Marco teórico

Biología Sintética como Herramienta en el Desarrollo de Biosensores

La biología sintética se puede definir como una disciplina útil para diseñar y construir nuevos sistemas biológicos o rediseñar sistemas biológicos existentes, y otorgarles nuevas y mejores cualidades con un objetivo definido. El diseño de nuevos sistemas biológicos a través de la biología sintética involucra la interacción de una gran variedad de disciplinas científicas tales como la química, la biología, la física, la ingeniería, las matemáticas, la estadística y las ciencias computacionales. Por consecuencia, la biología sintética se considera un campo necesariamente multidisciplinario el cual presenta un gran potencial tecnológico para el desarrollo de nuevos productos como pueden ser los biosensores (Munoz Miranda et al., 2019).

Extracción de ADN Plasmídico

Es un método por el cual se aísla el ADN de un plásmido mediante una lisis bacteriana, precipitando proteínas y ADN genómico, y finalmente, aislando el ADN plasmídico. El objetivo es obtener suficiente ADN para su posterior análisis o uso en otras técnicas moleculares (Engbrecht et al., 1991).

Cebadores o Primers

Son secuencias cortas de ADN, que van entre seis y 40 nucleótidos (normalmente, de 18 a 22), y permiten que la polimerasa inicie la reacción. Deben estar enfrentados y a no mucha distancia. Delimitan la zona de ADN a amplificar, es decir, corresponden a los nucleótidos que definen los extremos de la secuencia que se desea replicar (Takei & Nakatani, 2013).

Amplificación Mediante PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es una técnica que permite obtener millones de copias de una secuencia específica de ADN. Se basa en el mecanismo de replicación *in vivo* del ADN. Consta de varios ciclos repetitivos de desnaturalización del ADN por fusión a temperatura elevada, a fin de convertir el ADN bicatenario en ADN monocatenario; la unión de dos cebadores, utilizados como cebadores, al ADN diana (hibridación); y la extensión de la cadena de ADN por adición de nucleótidos a partir de los cebadores utilizando la ADN polimerasa como catalizador, en presencia de iones de Mg^{2+} (Angarita et al., 2017).

Electroforesis

La electroforesis en gel de agarosa es de las más utilizadas para analizar y caracterizar ácidos nucleicos de distintas procedencias. Los geles se comportan como una matriz y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de ADN de diferente tamaño van a migrar de forma distinta en una electroforesis en gel de agarosa. Además, si en dicha electroforesis se aplican marcadores de peso molecular (fragmentos de ADN de tamaño conocido) se puede calcular el tamaño aproximado del ADN en estudio (Padilla et al., 2011).

Digestión con Enzimas de Restricción

La digestión con enzimas de restricción o, simplemente, digestión enzimática es el proceso por el cual se corta el ADN mediante enzimas endonucleasas que reconocen secuencias específicas. La secuencia que reconocen es una secuencia palindrómica (que se lee igual en ambas direcciones) y se conoce como secuencia de restricción. Estas enzimas son

extraídas de bacterias, donde actúan como mecanismo de defensa para degradar material genético extraño que entre en la célula (Speer & Richard, 2011).

Ligación

La ligación es una reacción química provocada por una enzima llamada ligasa. En los sistemas biológicos, esta enzima repara y une cadenas de ADN promoviendo un enlace fosfodiéster entre dos nucleótidos. En el laboratorio esta técnica es usada para introducir partes de un ADN externo en otra cadena (Speer & Richard, 2011).

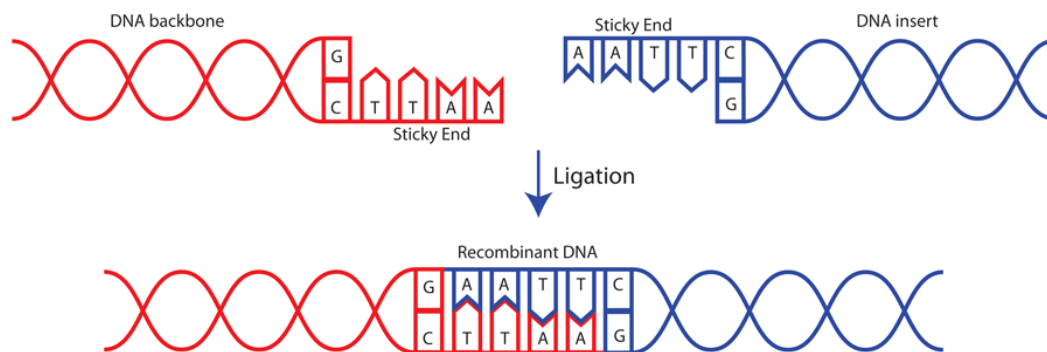


Figura 6. Proceso de ligación enzimática. (Addgene, s/f).

Clonación de Plásmido por Digestión con Enzimas de Restricción

Esta técnica se utiliza para mover cualquier fragmento de ADN a un vector siempre que ya esté delimitado por sitios de restricción que también estén presentes en la misma orientación en su vector objetivo (Addgene, s/f).

Transformación

La transformación genética es un proceso mediante el cual la célula capta moléculas de ADN libre y las mantiene en su interior en forma de un replicón extracromosómico o las incorpora a su genoma por recombinación homóloga. Muchas bacterias pueden activamente

incorporar ADN exógeno mediante una capacidad genéticamente programada denominada competencia natural (Serrano-rivero & Fando-calzada, 2013).

Escherichia coli (*E. coli*) como Chasis de Biosensores

E. coli ha jugado un papel fundamental en el desarrollo de la genética y la biología molecular como campos científicos. Por tanto, no es sorprendente que la biología sintética se basó en *E. coli* y continúa dominando el campo. En biología sintética, un chasis se refiere a un organismo que alberga y sostiene componentes genéticos al proporcionar los recursos que les permiten funcionar (Adams, 2016; Calero & Nikel, 2019).

Se han construido diversos biosensores con la utilización de *E. coli* como chasis. Martinez et al. construyeron un biosensor basado en *E. coli* J53 para detectar y cuantificar iones de plata y cobre (Martinez *et al.*, 2019). Se desarrolló un biosensor de Zn^{2+} diseñado genéticamente con *E. coli* BL21 (Khan et al., 2020). Liu et al. desarrollaron un biosensor para la detección de zinc de alta sensibilidad basado en *Escherichia coli* BL21-C230 (Liu et al., 2019).

Secuenciación del ADN

La secuenciación del ADN significa determinar el orden de los cuatro componentes básicos químicos, llamados "bases", que forman la molécula de ADN. La secuencia les informa a los científicos la clase de información genética que se transporta en un segmento específico de ADN. Por ejemplo, los científicos pueden usar la información de las secuencias para determinar qué tramos de ADN contienen genes y qué tramos transportan instrucciones regulatorias, que activan o desactivan genes. Además, y de manera muy importante, los datos de las secuencias pueden resaltar los cambios en un gen que pueden causar enfermedades

MATERIALES Y MÉTODOS

Capítulo II

Materiales y Métodos

Preparación de Medios de Cultivo y Soluciones Madre

Medio Líquido Luria-Bertrani (LB)

El medio LB es un medio rico para el mantenimiento y crecimiento de *E. coli* en procedimientos de microbiología molecular. Su composición es la siguiente: triptona 10 g, extracto de levadura 5 g, cloruro de sodio 5 g.

Para preparar 500 ml de medio líquido de LB, se pesó 10 g del polvo LB y se agregó a 500 ml de agua desionizada en una botella de 1 L. Finalmente, el medio fue autoclavado durante 15 minutos a 121°C y presión de 15 libras por pulgada cuadrada (psi).

Medio Sólido

Para la preparación de los medios sólidos, se añadió 1.5 g de Agar Agar por cada 100 ml de medio líquido. Dependiendo del propósito del medio sólido, se agregó ampicilina a una concentración de 100 µg/mL. La ampicilina fue agregada después de su esterilización y antes de que el medio solidificara, a una temperatura aproximada de 50 °C. Finalmente, se vertió aproximadamente 25 mL del medio en platos de Petri (diámetro 90 x 14 mm).

Preparación de Soluciones Madre de Antibióticos

Preparación de Ampicilina

Para preparar una solución madre de ampicilina a una concentración de 100 mg/mL, se añadió 1 g de ampicilina a 10 mL de agua estéril en un tubo de 15 mL. Se utilizó un vórtex para disolver toda la ampicilina en la solución. Seguidamente, se filtró la solución con una jeringa

estéril de 10 mL unida a un filtro de 0.22 μm . Por último, se preparó varias alícuotas de 1 mL en tubos de 1.5 mL, y se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior uso a una concentración de trabajo de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Clouthier, 2012).

Preparación de gentamicina

La solución madre de gentamicina (50 mg/ml) se adquirió de Gibco™ con número de referencia 15750-060. La concentración de trabajo utilizada fue de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Cepas Bacterianas y Plásmidos

La cepa bacteriana utilizada como chasis fue la *E. coli* NEB 10-beta Competent *E. coli* (High Efficiency) de New England Biolabs, con número de catálogo C3019I y la cepa de *E. coli* DH5 α One Shot™ MAX Efficiency™ DH5 α -T1R Competent Cells obtenida de Invitrogen™. Ambas cepas son derivados de la *E. coli* K12 (Anton & Raleigh, 2016; Durfee et al., 2008).

El plásmido empleado en este trabajo fue pUCP20T-E2Crimson. Este plásmido fue obtenido de Addgene con número de catálogo 78473. pUCP20T-E2Crimson fue una donación de Mariette Barbier (Addgene plasmid # 78473; <http://n2t.net/addgene:78473>; RRID:Addgene_78473). pUCP20T-E2Crimson es un plásmido de alto número de copias. Contiene un casete de resistencia a ampicilina y un reportero fluorescente E2-Crimson, controlado por un promotor Lac.

Ácidos nucleicos

Cebadores

Los cebadores empleados en este trabajo fueron diseñados utilizando la herramienta en línea *OligoAnalyzer™* (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) y fueron sintetizados por la empresa Integrated DNA Technologies (IDT). Todos los cebadores se resuspendieron en agua libre de nucleasas a una concentración final de 100 µM y almacenados a -20 °C.

Tabla 1. Cebadores empleados en este trabajo

Nombre	Bases	Secuencia (5' a 3') *	Aplicación
JC1F	23	CTAGCGTGGAGTTTGATTCGTCT	Secuenciación
JC1R	20	GCCGATATCCAGCGTCTTCA	Secuenciación
JC2F	23	CCCTGAGTAAAGATGCGCATTTC	Secuenciación
JC2R	18	GTCGACGTGCGCGTAATC	Secuenciación
JC3F	19	GATTCAGTTGACGGCAGGC	Secuenciación
JC3R	20	CGGCAGTTCCTCGTGAATTG	Secuenciación
JC4F	22	CTCAAGTTGTTGTTCTGCAGG	Secuenciación
JC4R	19	CGGCGAATATGCACAGCAC	Secuenciación
JC5F	18	GTTGTCGTGGATCGCACG	Secuenciación
JC5R	22	GACGGGGAAGTCCATCAAGTAG	Secuenciación
JC6F	21	GCTTCAGCTGCTGAACTTAC	Secuenciación
JC6R	23	GATCTTAGGTGCAGCTGGAGAAG	Secuenciación
JC7F	21	GTGTGGCCGTCGTATGTACTC	Secuenciación
JC7R	23	GCGCCTGGAAGTAGAAATTGATG	Secuenciación
JC8F	19	CACCCCTGCCACTCTAAC	Secuenciación
JC8R	22	CAGCCTCCCTGTTATTGACCC	Secuenciación
JC9F	20	CGAAGGGCCAACAATTCGTC	Secuenciación

JC9R	19	TGCTATCCATGGTGGCGAC	Secuenciación
gBlockJCF	32	GAAGCG GAAGAGCCTAGCGTGGAGTTTGATTC	Clonación
gBlockJCR	29	GGCG ACTAGT CGTGATCACTCCTGCGATG	Clonación
BefF	19	CCCCATGTTCTTTCCTGCG	Verificación de clonación
EndR	20	CCTCGATCTCGAACTCGTGG	Verificación de clonación

*Los sitios de restricción para las enzimas SapI y SpeI se marcan en negrita.

Inserto

Para el diseño del inserto a clonar, se utilizó la secuencia de ADN del regulador transcripcional (*cynF*), perteneciente al operón *cynFABDS* de la *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, y su promotor. Ambas secuencias se obtuvieron de la base de datos de GenBank con número de acceso EF451798. Estas secuencias fueron ensambladas en una sola secuencia génica, utilizando el programa *BioEdit* 7.2 (<https://bioedit.software.informer.com/7.2/>). Además, se les agregó a los extremos del inserto sitios de restricción para las enzimas SapI y SpeI, junto con sitios de hibridación para cebadores que flanquean el inserto (*gBlockJCF*, *gBlockJCR*) (figura 7). Previo a la síntesis del Inserto se realizó una optimización de codones utilizando la herramienta en línea *Codon Optimization Tool* de IDT (<https://www.idtdna.com/CodonOpt>). La secuencia completa del inserto fue sintetizada en formato *gBlocks™* por la empresa IDT. El inserto se resuspendió siguiendo las instrucciones de IDT (<https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/tips-for-working-with-gblocks-gene-fragments>).

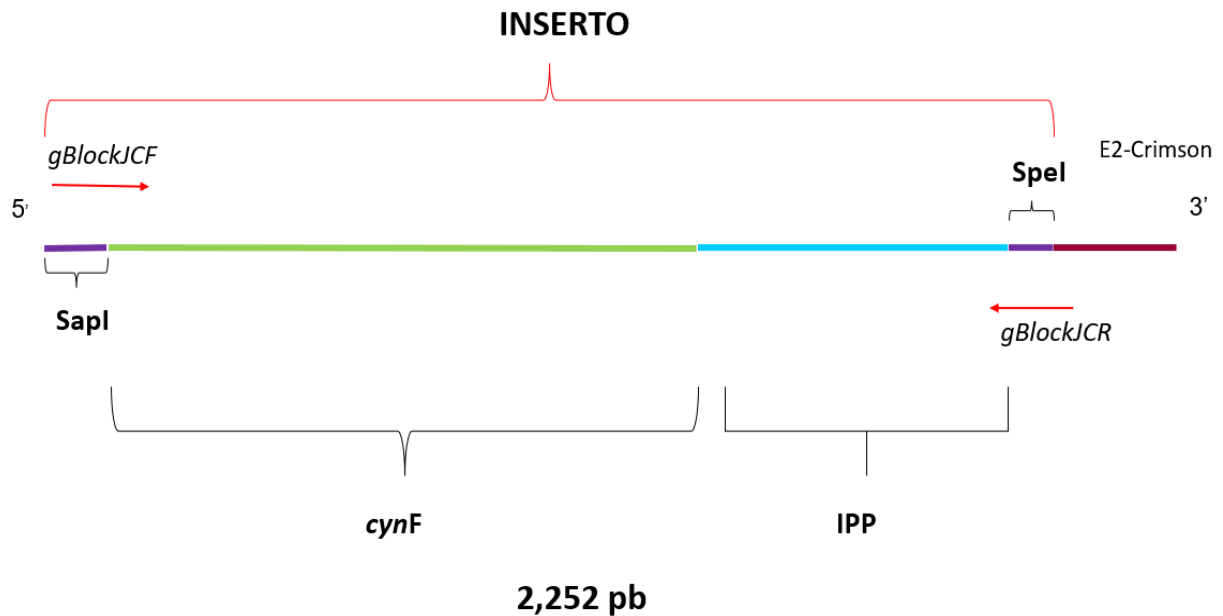


Figura 7. Esquema del Inserto. La longitud total del inserto es de 2,252 pb. Los cebadores gBlockJC y gBlockJCF amplifican 2,223 pb. El gen *cynF* representado por el color verde junto a su promotor (IPP) representado por el color cian. De morado se muestran los sitios de restricción para las enzimas.

Crecimiento y Conservación de Cepas

Los cultivos de *E. coli* en medio líquido se crecieron en tubos cónicos con una capacidad de, al menos, cinco veces mayor que el volumen del cultivo y en condiciones de aireación con agitación a una velocidad de 200-250 revoluciones por minuto (rpm). En medios sólidos los cultivos fueron inoculados en la superficie. La temperatura de crecimiento para todas las cepas fue de 37 °C.

Para la conservación de las cepas, estas se cultivaron toda la noche (aprox. 16 horas). Luego, se agregó 500 µL del cultivo a 500 µL de glicerol al 50 % en un criovial de 2mL. Finalmente, los crioviales se mezclaron suavemente y se congelaron a -80°C (Addgene, s/f).

Transformación Bacteriana

Preparación de Células Competentes

Para preparar células competentes, se realizó un precultivo de *E. coli* NEB-10Beta o DH5 α por aproximadamente 16 horas. Al día siguiente, se realizó una dilución 1:100 del cultivo. Para esto, se tomó 1 ml del precultivo y 99 ml de LB fresco y se incubó a 37 °C con agitación de 250 RPM, hasta alcanzar una densidad óptica (DO_{600 nm}) de 0.3 - 0.5. Después, se distribuyó el cultivo en dos tubos cónicos de 50 mL, previamente enfriados (50 ml de cultivo para cada tubo). Se centrifugaron ambos tubos a 4,000 rpm, a una temperatura de 4 °C durante 10 min. Seguidamente, se descartó el sobrenadante. A partir de este momento fue importante mantener las células en hielo para asegurar la competencia de las bacterias. Después, las células se resuspendieron suavemente utilizando 20 mL de solución 0.1 M de dicloruro de calcio (CaCl₂) frío para cada tubo. Los tubos fueron incubados en hielo durante 30 min. Se centrifugaron nuevamente a 4,000 rpm a 4 °C durante 10 min y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se resuspendieron las células de cada tubo usando 5 mL de una solución fría de 0.1 M de CaCl₂ con glicerol al 15%. Finalmente, se prepararon alícuotas de 1 mL en crioviales de 2 ml y se congelaron a -80°C (Chang et al., 2017).

Transformación por Choque Térmico

Para la transformación, primero se descongeló en hielo uno de los crioviales que contenía las células competentes. Se agregó 50 μ L de células y 5 μ L de producto de ligación en un tubo estéril de 1.5 ml. Este tubo fue incubado en hielo por 30 minutos. Luego, se pasó el tubo a baño maría a una temperatura exacta de 42 °C durante exactamente 30 segundos.

Inmediatamente, se regresó el tubo a hielo durante 2 minutos. Seguidamente, se agregó 1 ml de medio LB previamente atemperado a 37°C. El tubo con las células transformantes fue incubado a 37 °C con agitación de 200 RPM durante 1 hora. De estas células transformantes se plaqueó 100 µL en LB suplementado con 100 µg/mL de ampicilina. Finalmente, los platos fueron incubados a 37 °C durante 16 horas (Chang et al., 2017).

Preparación de ADN

Extracción de ADN Plasmídico

Se preparó un cultivo de la cepa DH5α que contenía plásmido pUCP20T-E2Crimson. Se tomó 1.5 ml del cultivo en fase exponencial para realizar las extracciones plasmídicas, utilizando el kit de NucleoSpin Plasmid, Mini kit for plasmid DNA de MACHEREY-NAGEL (n.º ref. 740588.50). Se siguió el protocolo sugerido por la marca. El volumen de elución fue de 50 µL.

Amplificación del Inserto

El Inserto fue amplificado mediante PCR. La enzima Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase fue utilizada para las amplificaciones. Cada reacción de 20 µl contenía: 4 µl de Tampón 5x HF, 0.4 µl dNTPs 10 mM, 1 µl de cada cebador 10 µM, 1 µl ADN Inserto 1 ng, y 0.2 µl de la enzima polimerasa. Las condiciones de temperatura fueron las siguientes: paso inicial a 98 °C por 30 s, seguido por 25 ciclos de 10 s a 98 °C, 15 s a 67 °C, 20 s a 72 °C. Por último, se añadió una extensión de 10 min a 72 °C. En todas las amplificaciones se usó el termociclador T100 (Bio-Rad).

Purificación de Producto de PCR del inserto

Los productos de PCR se purificaron utilizando el kit de Promega *Wizard® SV Gel and Clean Up System (#A9282)*, siguiendo el protocolo sugerido por la casa comercial para productos de extracción de ADN en gel. Básicamente, tras la corrida del gel de agarosa, con una navaja, se procedió a cortar la banda del inserto. Luego, la banda se introdujo en un tubo de 1.5 ml y se procedió a la purificación. El producto obtenido de este paso fue el usado para las digestiones enzimáticas.

Análisis de ADN

Cuantificación de ADN

La concentración y pureza de los productos de ADN se analizó con el espectrofotómetro *Thermo Scientific Nanodrop® 2000* y el fluorómetro *Qubit fluorometer 2.0*. Para nanodrop se tomó 1 µL de producto de ADN y se midió su absorbancia a 260 y a 280 nm, frente a un blanco que fue el mismo diluyente utilizado para eludir el ADN. Para el cálculo de la concentración de ADN se consideró un valor estándar de Absorbancia 260 = 1 para soluciones con 50 µg/ml de ADN de doble cadena. La pureza del ADN se estimó por la relación entre absorbancia 260 y 280 nm, considerando de buena calidad cuando la relación era de 1.8 a 2.0.

Electroforesis en Gel de Agarosa

Para visualizar los productos de ADN, se procedió a preparar un gel de agarosa al 1%. Para esto, se añadió 0.7 g de agarosa a 70 mL de tampón TBE 1 X. En un horno de microondas se fundió la solución de agarosa durante 1 min (Addgene, s/f). Cuando la solución de agarosa se enfrió (aproximadamente a 50 °C), se agregó 3 µL de la solución de bromuro de etidio (10

mg/mL) o 7 μ L de SYBR Safe y se mezcló bien. Luego, se vertió la solución directamente en la bandeja, asegurando que no quedara burbujas en el gel. Se dejó enfriar y solidificar el gel durante 20 a 30 min. Se retiró el peine, y se colocó la cámara de electroforesis en la posición correcta. El gel fue sumergido en tampón TBE 1X aproximadamente 1 cm sobre la superficie del gel.

Para las lecturas, se utilizó los siguientes marcadores de peso moleculares: K180[®] DNA MW marker (Amresco), K181[®] DNA MW marker (Amresco) y Lambda DNA/HindIII marker (Promega, #SM0101) (figura 8). Se añadió de 0.5 a 4 μ L de estos marcadores dependiendo de la concentración (100 ng aproximadamente). Para cargar los productos de ADN, se añadió de 2 a 5 μ L de tampón de carga (Gel Loading Solution 6 X, Sigma #G7654), dependiendo del volumen de producto a cargar.

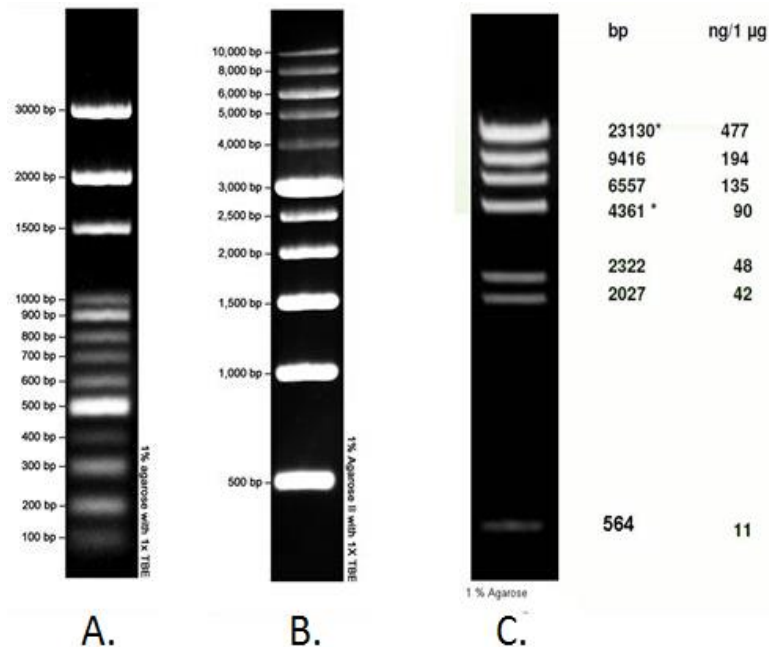


Figura 8. Marcadores de peso molecular. A. 100 pb K 180[®] **B.** 1 kb K 181[®] **C.** Lambda DNA/HindIII.

Construcción de Plásmido Recombinante

La estrategia de clonación planteada se encuentra resumida en la figura 9.

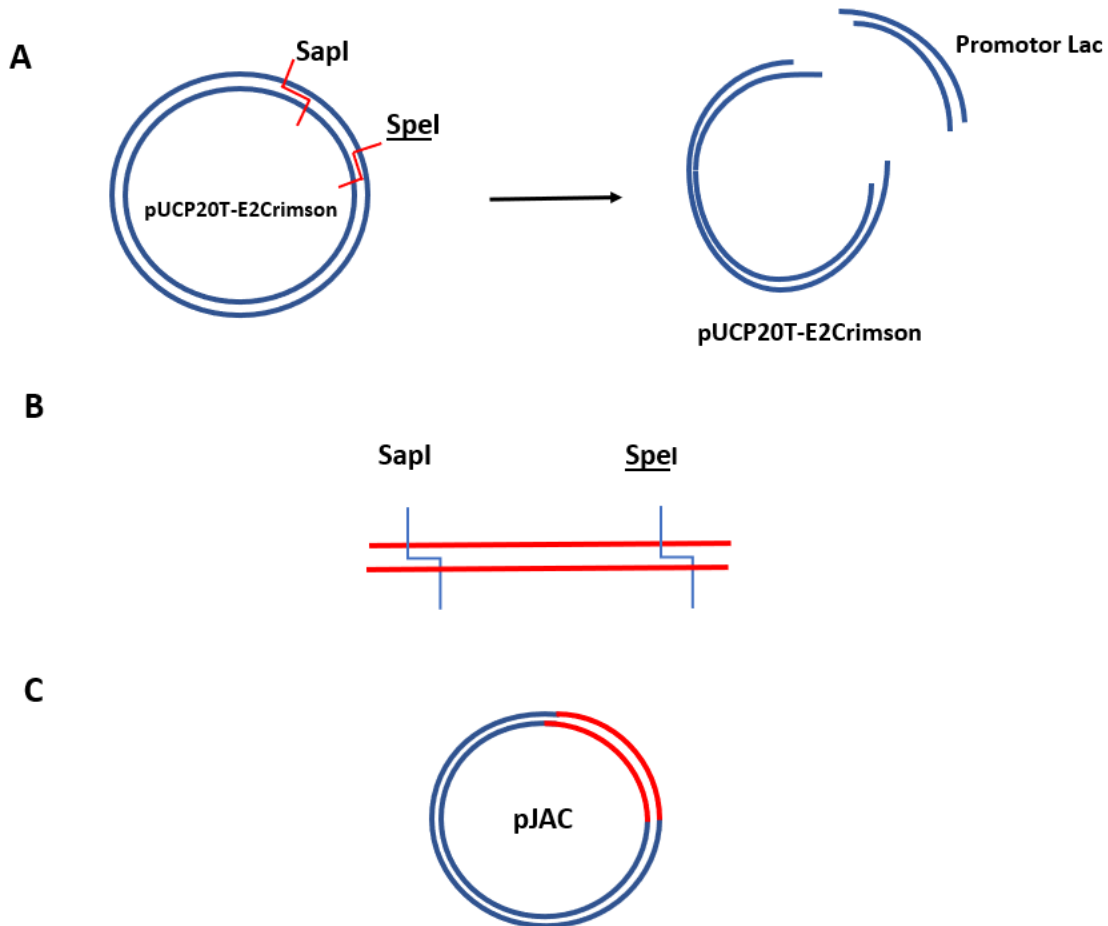


Figura 9. Estrategia para la construcción de plásmido pJAC. A. Plásmido pUCP20T-E2Crimson digerido con Sapl y SpeI para liberar el promotor Lac y abrir el plásmido B. Inserto digerido con Sapl y SpeI formando los extremos cohesivos. C. Ligación del inserto al plásmido pUCP20T-E2Crimson, obteniendo así el plásmido recombinante nombrado **pJAC**. El tamaño del plásmido pJAC es de 6, 856 pb.

Digestiones Enzimáticas

Digestión del Plásmido pUCP20T-E2Crimson

El plásmido pUCP20T-E2Crimson contiene un promotor Lac que está flanqueado por sitios de restricción para las enzimas Sapl y SpeI. Estos dos sitios de restricción se utilizaron

para liberar el promotor Lac y abrir el plásmido para que quedase susceptible a la introducción del Inserto. Para esto, se realizó una reacción de doble digestión utilizando 1 μL de SpeI y SapI, 2 μL de rCutSmart Buffer 10X, de 1 μg a 3 μg de ADN plasmídico, y se aforó con agua libre de nucleasas para alcanzar un volumen de reacción de 20 μL . La temperatura de incubación para ambas enzimas fue de 37 ° C por 2 horas y 80 °C por 20 minutos para inactivar ambas enzimas. Estos resultados fueron analizados en una electroforesis en gel de agarosa y cuantificados.

Digestión del Inserto

El inserto fue sometido a una doble digestión enzimática utilizando SpeI y SapI. Esto con la finalidad de formar extremos cohesivos, que emparejen con los extremos cohesivos formados en la doble digestión del plásmido. Las condiciones de las reacciones fueron las siguientes: 1 μL de SpeI y SapI, 2 μL de rCutSmart Buffer 10X, 250 ng del Inserto, y aforado con agua libre de nucleasas para un volumen final de 20 μL . La temperatura de incubación para ambas enzimas fue de 37 ° C por 2 horas y 80 °C por 20 minutos para inactivar ambas enzimas. Estos resultados fueron analizados en una electroforesis en gel de agarosa y cuantificados.

Ligación de ADN

Para las ligaciones, se siguió el protocolo de New England Biolabs® con cambios que incluyeron una extensión del tiempo de incubación y la eliminación del paso de incubación a 65 °C durante 10 minutos. Todas las reacciones de ligación se realizaron en un volumen de 20 μL . Para esto se utilizó 1 μL de ADN ligasa T4 (3u/ μL), 2 μL de tampón de ligación 10 X y un radio molar que variaba de 1:1 a 4:1 (inserto: plásmido). La temperatura de incubación fue de 16 °C durante 16 horas. El producto de todas las ligaciones realizadas en este trabajo fue el utilizado para la transformación de las cepas NEB 10-Beta y DH5 α .

Verificación del plásmido recombinante

La integridad del ADN de la construcción plasmídica se verificó mediante digestión enzimática, PCR y finalmente por secuenciación, a través del servicio de secuenciación de la empresa GeneWiz® (<https://www.genewiz.com/>). Las secuencias obtenidas fueron verificadas con la secuencia del inserto con la utilización del programa *BioEdit* 7.2 (<https://bioedit.software.informer.com/7.2/>).

Ensayo de Sensibilidad a Cianuro

Para evaluar la capacidad de resistencia al cianuro de las cepas transformadas con el plásmido pJAC, se realizó un Ensayo de Sensibilidad. Para esto, se utilizó una placa de microtitulación de 96 pocillos. Las cepas fueron probadas a las siguientes concentraciones de KCN: 0.5 mM, 5 mM, 10 mM, 25 mM y 50 mM. Además, se agregó un control que consistió en cultivo de las cepas a probar en LB sin KCN. Los datos obtenidos se utilizaron para preparar una curva de crecimiento bacteriano.

Para la preparación del Ensayo de Sensibilidad, las cepas salvajes y las transformadas con pJAC fueron precultivadas en 10 ml de LB con 100 µg/ml de ampicilina, toda la noche a 37 °C y agitación a 200 rpm. Al día siguiente, se diluyó 5 ml del precultivo en 25 ml de LB fresco, y se incubó hasta obtener una DO de 0.3. Seguidamente, se cargó por triplicado 100 µL de la cepa junto con 100 µL de la solución de KCN diluida en LB, con las distintas concentraciones a testear. Finalmente, se trabajó con un volumen total de 200 µL por pozo. Además, se incluyeron pozos con 200 µL de LB solo como blanco.

Para la lectura de la densidad óptica a 600 nm, se utilizó el multilector de platos (*Multilector Synergic® HT Biotek*, USA). Se realizó una lectura inicial a un tiempo cero (0). Seguidamente, la placa fue incubada a 37 °C con agitación a 180 rpm. Cada 30 minutos, la placa era retirada de la incubadora para medir la DO. Se realizaron lecturas durante 12 horas.

Ensayo de Fluorescencia de E2-Crimson

Para la preparación del Ensayo de fluorescencia, las cepas fueron precultivadas en 10 ml de LB con 100 µg/ml de ampicilina, 16 h a 37 °C y agitación a 200 rpm. Al día siguiente, se diluyó 5 ml del precultivo en 25 ml de LB fresco, y se incubó hasta obtener una DO de 0.6. Seguidamente, se cargó por triplicado 100 µL de las cepas junto con 100 µL de la solución de KCN diluida en LB. Se cargó pozos con 200 µL de LB solo como blanco. Como control positivo de la expresión de la proteína E2Crimson, se cargó 200 µL de cultivo DH5α con el plásmido pUCP20T-E2Crimson inducido con 0.1 M de IPTG. Finalmente, se trabajó con un volumen total de 200 µL por pozo. Para las lecturas de la fluorescencia se utilizó el multilector de platos junto con los filtros de 590_{nm} de excitación y 645_{nm} de emisión.

Análisis Estadístico

Todas las curvas de crecimiento y análisis de datos presente en los Resultados y Discusión se realizaron con GraphPad Prism 6. Se realizó un análisis de varianza de Medidas Repetidas

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo III

Resultados y Discusión

Diseños *in silico* de Inserto y plásmido pJAC.

Diseño in silico del inserto

El inserto es el nombre genérico que le dimos al ensamblaje de los genes *cynF* y su promotor (descrito en Materiales y Métodos). El diseño *in silico* de inserto se presenta en la figura 10.

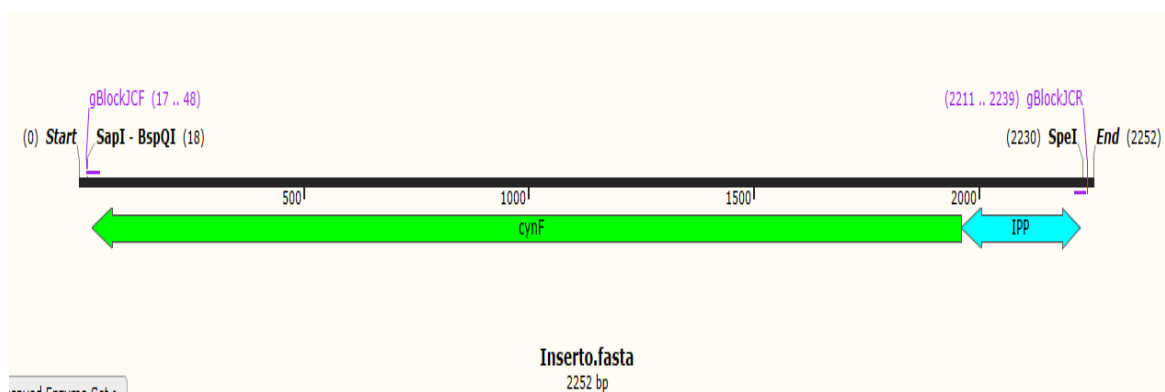


Figura 10. Diseño *in silico* del Inserto. Diseñado con el programa informático *SnapGene Viewer* (<https://www.snapgene.com/snapgene-viewer/>). De verde se muestra el gen *cynF* y de cian se muestra la región promotora (IPP).

Diseño in silico del plásmido recombinante pJAC

Como se describió en la sección de Materiales y Métodos (Construcción de Plásmido Recombinante), la estrategia seguida consistió en utilizar el plásmido pUCP20T-E2Crimson y reemplazar su promotor Lac por la secuencia del Inserto, con la finalidad de diseñar el plásmido recombinante pJAC. Para tal fin, se utilizó la herramienta informática *SnapGene Viewer*. El resultado de esto se muestra en la figura 11.

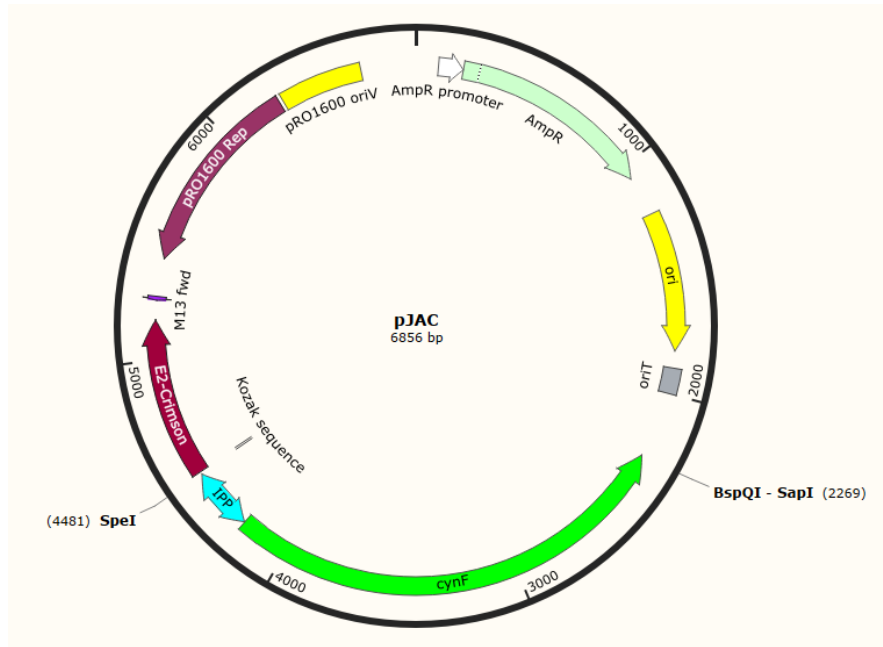


Figura 11. Diseño *in silico* de pJAC.

Clonaje Mediante Digestión con Enzimas de Restricción

Amplificación del Inserto

Para amplificar el Inserto, se realizó una amplificación por PCR utilizando los cebadores gBlockCF y gBlockJCR, cuya secuencia se presenta en la tabla 1 de Materiales y Métodos. El resultado de esta PCR se analizó en una electroforesis en gel de agarosa, dando como producto la amplificación de un fragmento de ADN de aproximadamente 2, 223 pb, que coincide con el tamaño del Inserto. Adicionalmente, aparecen dos bandas inespecíficas (figura 12). Por esta razón, la banda del Inserto fue purificada con un kit de purificación de producto de PCR en gel, según se describe en Materiales y Métodos. El producto de esta purificación fue el utilizado para la doble digestión enzimática.

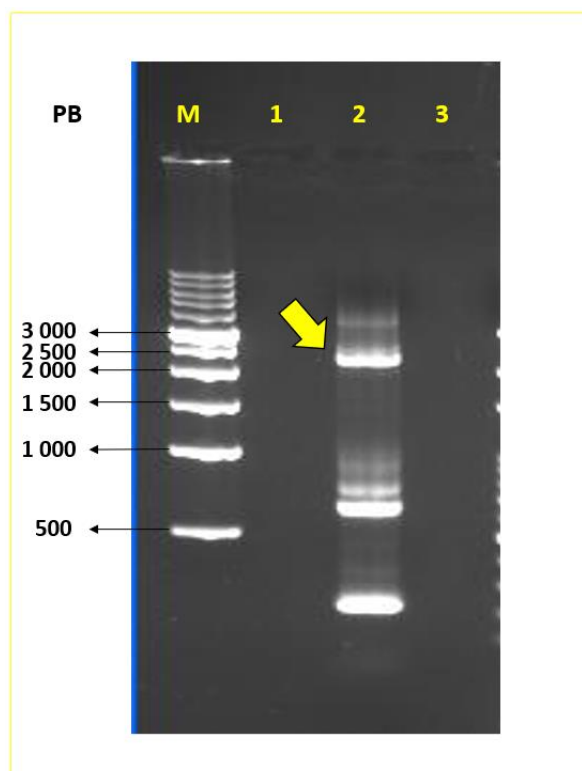


Figura 12. Electroforesis de PCR del inserto. La flecha amarilla indica el fragmento amplificado de 2,223 pb correspondiente al peso del inserto. En el mismo carril (2) se observa dos productos inespecíficos de aprox. 700 pb y 250 pb. Carril M corresponde al marcador de peso molecular K181.

Digestión del Plásmido pUCP20T-E2Crimson y Digestión del Inserto

Como se mencionó en el apartado de Materiales y Métodos, la estrategia de clonaje seguida consistió en hacer una doble digestión al plásmido pUCP20T-E2Crimson con Sapl y Spel para liberar el promotor Lac. Los resultados de esta digestión fueron analizados en un gel de agarosa y estos se presentan en la figura 13. También, se muestra el producto de la doble digestión del Inserto.

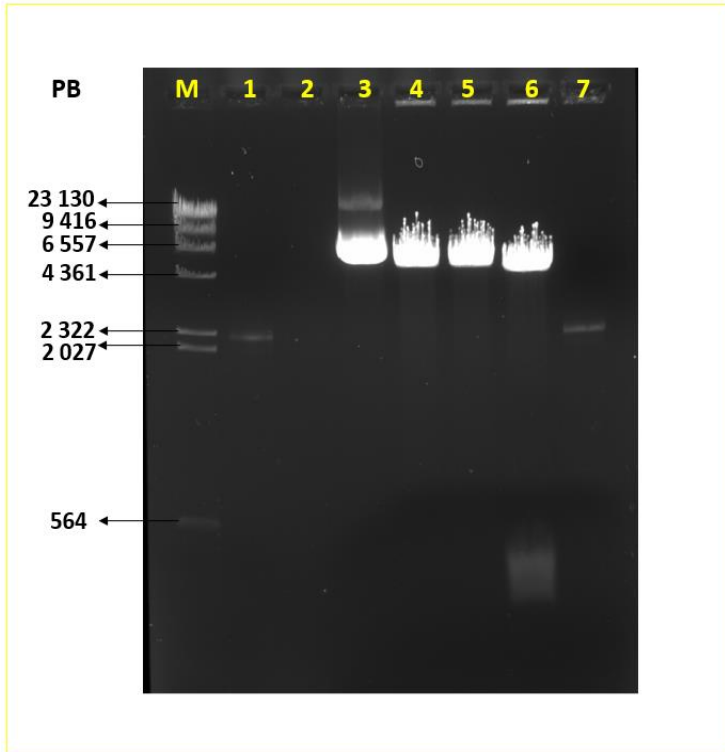


Figura 13. Digestión del Inserto y pUCP20T-E2Crimson. Carril 1: Inserto digerido con Sapl y Spel. Carril 3: plásmido no digerido. Carril 4: plásmido digerido con Spel. Carril 5: plásmido digerido con Sapl. Carril 6: plásmido digerido con Sapl y Spel. En el carril 6 se observa dos bandas; una banda superior de aproximadamente 4, 600 pb, que corresponde al plásmido linealizado y una banda inferior de aproximadamente 300 pb correspondiente al promotor Lac liberado. Carril 7: inserto sin digerir. Carril M: marcador de peso molecular Lambda DNA Hind III.

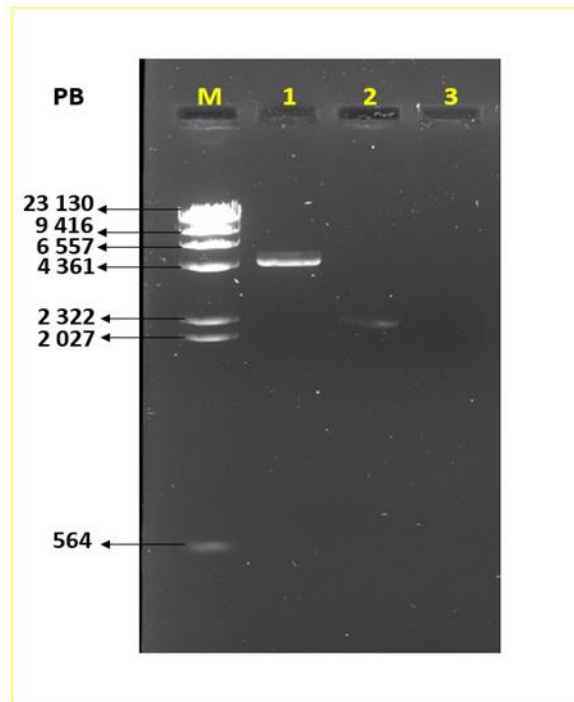


Figura 14. Inserto y pUCP20T-E2Crimson. Carril 1: plásmido pUCP20T-E2Crimson linealizado y purificado. Carril 2: Inserto digerido y purificado. Estos productos fueron los utilizados para la Ligación. Carril M: Lambda DNA Hind III.

Verificación de plásmido recombinante pJAC

La cepa DH5 α fue transformada con el producto de la ligación tal cual como se describe en Materiales y Métodos. La selección de los transformantes se llevó a cabo en placas con medio LB suplementado con ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se seleccionaron 19 colonias al azar, estas fueron inoculadas en medio líquido LB suplementado con ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con el fin de realizar las extracciones plasmídicas (descrito en Materiales y Métodos). Para verificar la presencia del plásmido pJAC, a partir del ADN plasmídico, se realizaron digestiones enzimáticas utilizando la enzima XbaI, esto debido a que sabíamos que el plásmido posee un sitio de restricción para esta enzima. Tomando en cuenta que la longitud de plásmido pJAC es de 6,856 pb, se consideró clones positivos a todas las bandas cuyo producto se ubicaba cercano a este peso. De este experimento cuatro clones mostraron ser positivos (figura 15). La nueva cepa transformada con el plásmido pJAC se le nombró **DH5 α -pJAC**.

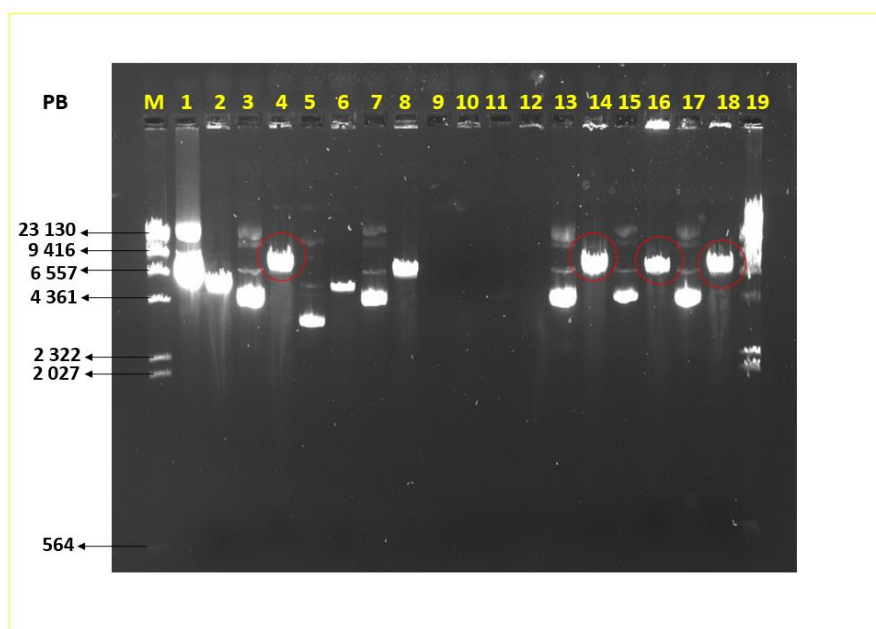


Figura 15. Comprobación de clonación mediante digestión enzimática. los carriles **4, 14,16,18** (en círculo rojo) se observa los clones positivos. Carriles M corresponden a marcadores Lambda DNA Hind III.

En adición, la integridad de los clones fue comprobada mediante Secuenciación Sanger. Para la secuenciación se utilizaron los cebadores mencionados en la tabla 1 (Materiales y Métodos). Para la secuenciación se utilizaron dos cebadores que flanqueaban al menos 100 pb antes de inserto (BefF, EndF). Además, se utilizaron nueve pares de cebadores que hibridaban en el interior del inserto. Cada par abarcaba una longitud no mayor a 400 pb y ubicados de tal manera que solaparan entre sí.

Los cuatro clones que mostraron ser positivos por digestión enzimática fueron enviados a secuenciar a la empresa GeneWiz. Una vez obtenidas las secuencias, estas fueron alineadas con la secuencia del Inserto. Las secuencias de los clones presentaron 100 % de homología a la secuencia del Inserto.

Después de verificado el plásmido pJAC, este se introdujo por transformación en la cepa NEB-10Beta. Esta última transformación fue verificada mediante una PCR, utilizando los cebadores gBlockJCF y gBlock JCR. Los resultados se muestran en la figura 16. A esta nueva cepa se le nombró **10Beta-pJAC**.

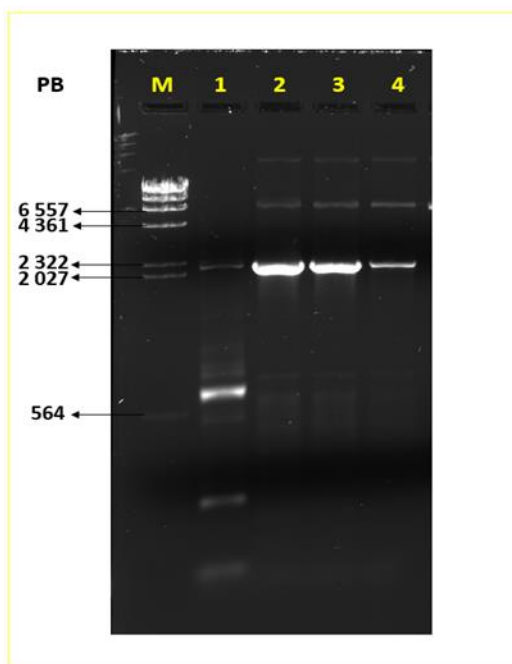


Figura 16. PCR de pJAC-10Beta. ADN del Inserto (control positivo). Carril 2, 3, 4: Producto de pJAC amplificado. Las tres bandas coinciden con el tamaño del amplicón esperado; 2,220 pb. Carril M: Lambda DNA Hind III.

Ensayo de Sensibilidad del Biosensor al Cianuro

El éxito de una bacteria biosensora precisa de la resistencia o tolerancia de la cepa al analito a detectar. En ese sentido, fue necesario conocer el rango de tolerancia al cianuro de las cepas construidas. Para este fin, se usaron las dos cepas DH5 α -pJAC y 10Beta-pJAC. Adicionalmente, se usó las cepas salvajes (sin pJAC) DH5 α y NEB-10Beta con el propósito de saber si la presencia del plásmido en las cepas salvajes confiere mayor tolerancia al KCN.

Se graficaron curvas de crecimiento a partir de los datos de DO obtenidos de cada una de las cuatro cepas. Estas curvas fueron representadas en un gráfico para cada cepa.

Nuestros resultados indican que el crecimiento de la cepa DH5 α fue progresivamente menor a concentraciones de KCN más altas (gráfico 1). El análisis de ANOVA de Medidas

Repetidas revela que existe diferencia significativa ($p < 0.02$ ajustada por corrección de Bonferroni) en el crecimiento de la bacteria a diferentes concentraciones de KCN en función del tiempo. Esta tendencia de crecimiento, también, se observa para la cepa NEB-10Beta (gráfico 2). Estos resultados indican que el crecimiento de ambas cepas; DH5 α y NEB-10Beta, se encuentra limitado por el aumento en la concentración de KCN. Se observa una limitación en el crecimiento a partir de los 5 mM y 10 mM de KCN en DH5 α y NEB-10Beta, respectivamente. Por el contrario, las cepas que contienen el plásmido pJAC, presentaron un comportamiento de crecimiento distinto a lo observado en las cepas salvaje. La cepa DH5 α -pJAC y 10Beta-pJAC a concentraciones hasta 25 mM de KCN no presentan diferencia estadísticamente significativa (gráfico 3 y 4). Lo cual nos indica que el plásmido le confiere capacidad para sobrevivir hasta esta concentración de KCN. Esto no se observa a la concentración de 50 mM habiendo diferencias significativas ($p < 0.001$) a partir de las 1.5 h de crecimiento. Estos resultados se resumen en la tabla 2.

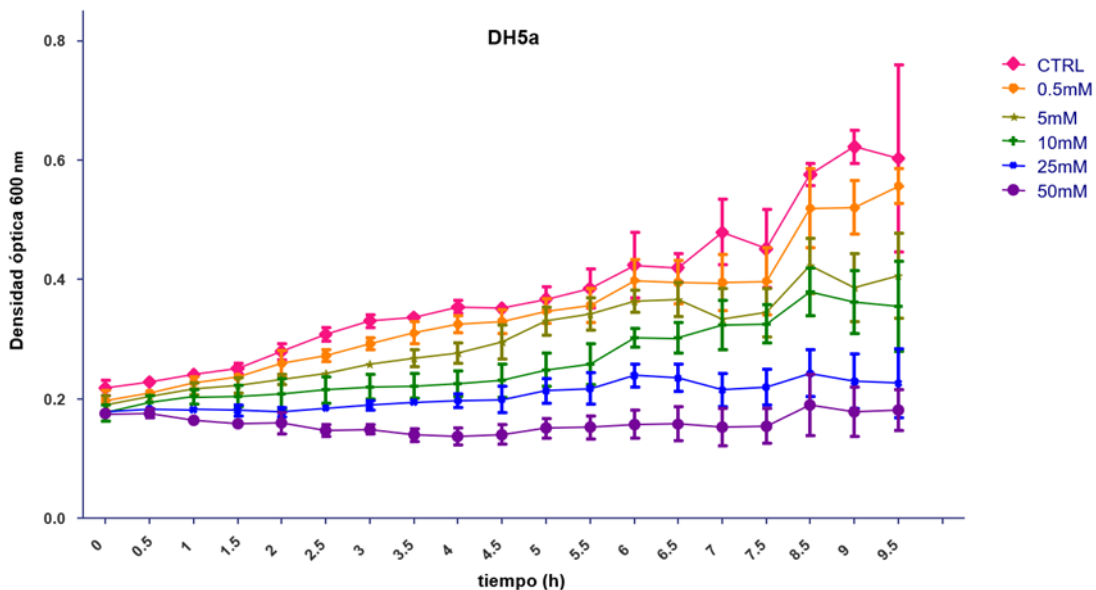


Gráfico 1. Crecimiento de Dh5 α en distintas concentraciones de KCN (mM). Dh5 α sin KCN como control (CTRL).

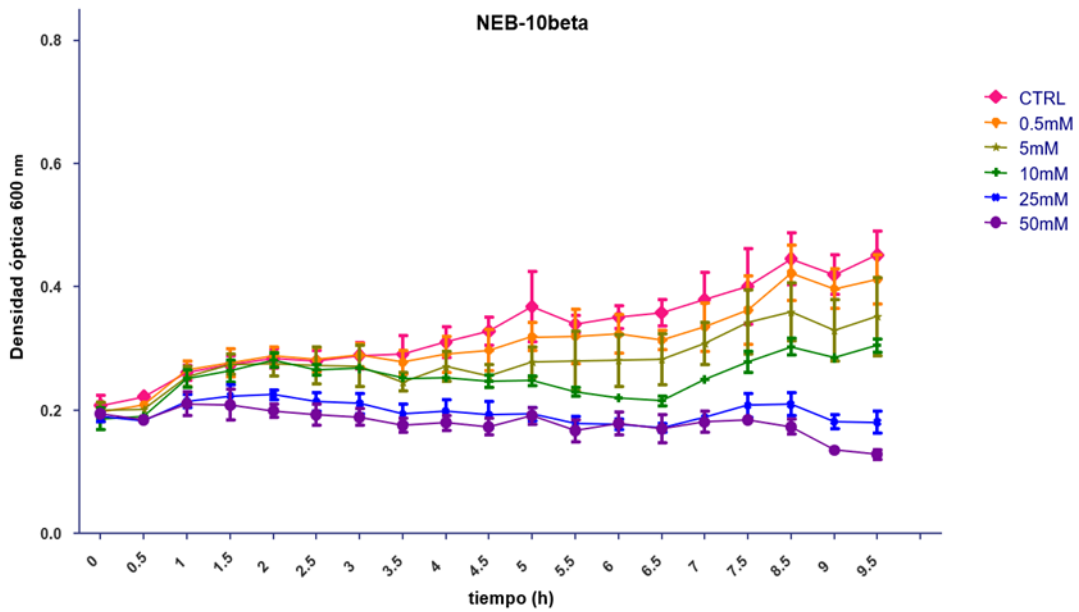


Gráfico 2. Crecimiento de NEB-10Beta en distintas concentraciones de KCN (mM). NEB-10Beta sin KCN como control (CTRL).

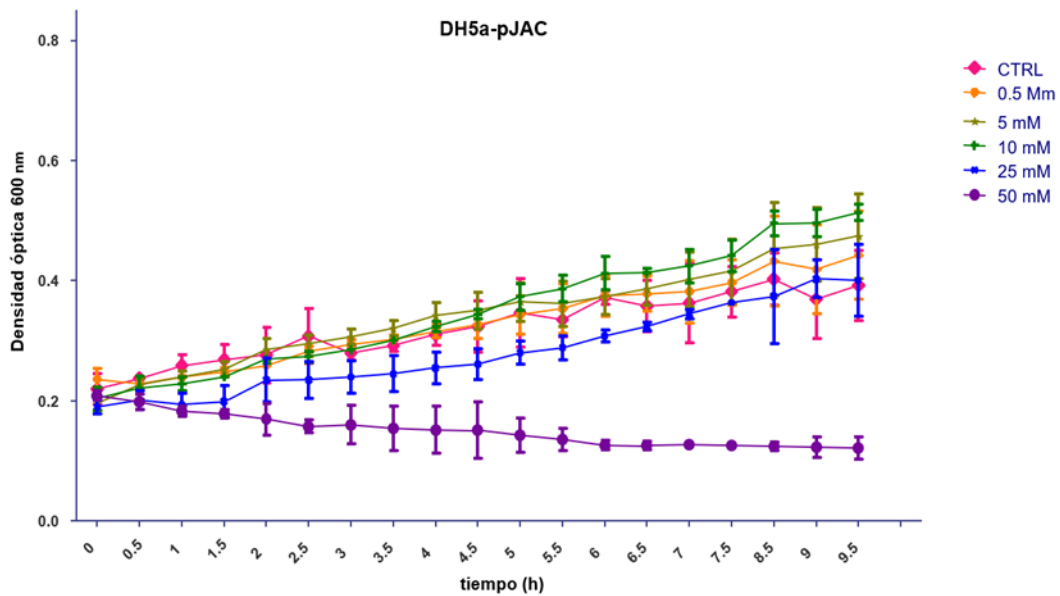


Gráfico 3. Crecimiento de DH5 α -pJAC en distintas concentraciones de KCN (mM). DH5 α -pJAC sin KCN como control (CTRL).

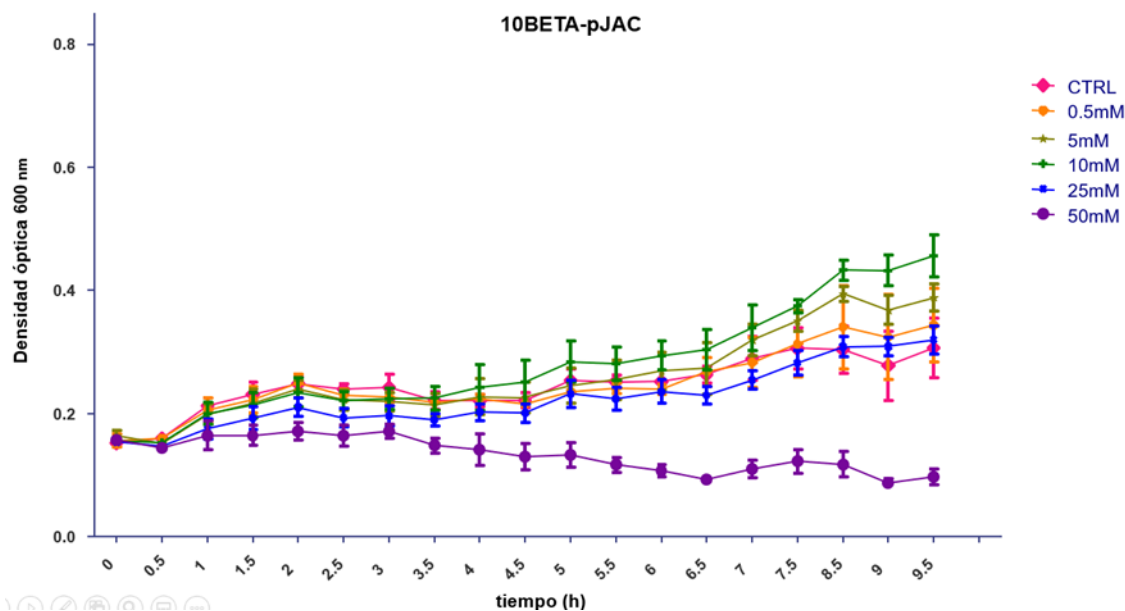


Gráfico 4. Crecimiento de 10Beta-pJAC en distintas concentraciones de KCN (mM). 10Beta-pJAC sin KCN como control (CTRL).

Tabla 2.

Cepa	KCN (mM)				
	0.5	5	10	25	50
Dh5α	n.s	***	***	***	***
Dh5α-pJAC	n.s	n.s	n.s	n.s	***
NEB-10Beta	n.s	n.s	***	***	***
10Beta-pJAC	n.s	n.s	n.s	n.s	**

n.s = $p > 0.05$

** = $p < 0.001$

*** = $p < 0.001$

En adición, se calculó la tasa de crecimiento de cada cepa y se compararon las cepas que contenían el plásmido pJAC contra las cepas sin el plásmido. En DH5α y DH5α-pJAC se observa una clara diferencia en sus crecimientos, siendo DH5α-pJAC la que presenta mayor crecimiento que DH5α en las concentraciones de 5 mM, 10mM, 25mM (gráfico 5). Resultados

similares se observan para las cepas NEB-10Beta y 10Beta-pJAC, pero con una diferencia en crecimiento más notoria que las observadas en el gráfico 5 (gráfico 6).

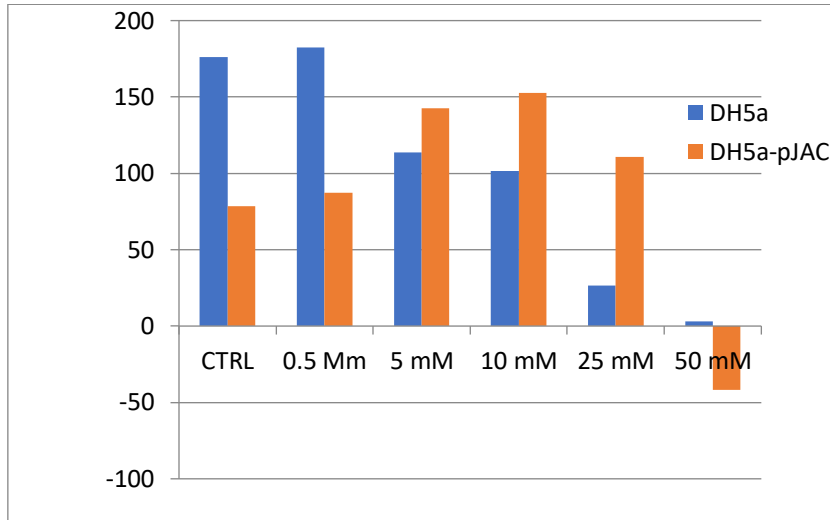


Gráfico 5. tasa de crecimiento de DH5α vs DH5α-pJAC.

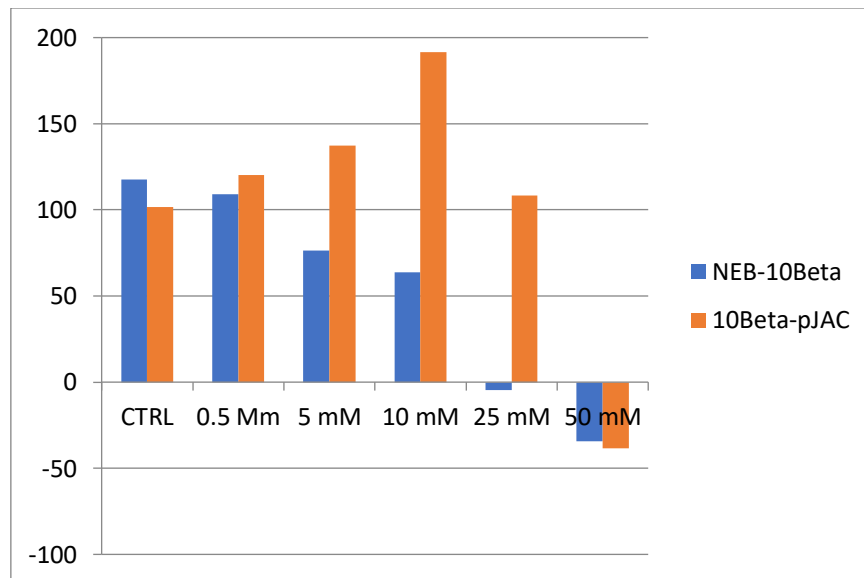


Gráfico 6. tasa de crecimiento de NEB-10Beta vs 10Beta-pJAC.

El papel del cianuro como inhibidor del crecimiento de muchos microorganismos es muy conocido. Como se mencionó en la introducción de este trabajo, el cianuro inhibe la citocromo c oxidasa, una enzima esencial en la cadena de transporte de electrones. A pesar de esto, muchos microorganismos han desarrollado mecanismos implicados en la resistencia y

degradación del cianuro (Knowles, 1976). Por el contrario, se ha mencionado, incluso, que microorganismos capaces de degradar cianuro no son capaces de crecer en altas concentraciones de cianuro (Jegatheesan & Shu, 2017). Sin embargo, diversos investigadores han aislado cepas capaces de crecer a altas concentraciones de cianuro (Mahendran et al., 2020). Luque y colaboradores aislaron la *Pseudomonas pseudoalcaligenes* capaz de crecer hasta 20 mM de NaCN (V.M. Luque-Almagro et al., 2005). *Bacillus* sp. M01 mostró una tolerancia máxima de 15 mM de cianuro (Javaheri Safa et al., 2017). Skowronski y Strobel aislaron una cepa de *Bacillus pumilus* que tenía una capacidad inusual para sobrevivir en soluciones saturadas de KCN (100 mM) (Skowronski & Strobel, 1969).

La resistencia y el metabolismo del cianuro en *Escherichia coli* no ha sido completamente definido. Se creía que las especies de Enterobacteriaceae; como *Escherichia coli* eran bacterias sensible al cianuro (Knowles, 1976). A pesar de esto, se han descrito pocas cepas de *Escherichia coli* capaces de crecer en concentraciones relativamente altas como la cepa BCN6 de *E. coli* que fue capaz de crecer en 50 mg/L de cianuro (Figueira et al., 1996). Nuestros resultados muestran que ambas cepas salvajes, tanto DH5 α como NEB 10Beta, pudieron tolerar hasta una concentración de 0.5 mM de KCN. Sin embargo, esta capacidad de tolerancia se vio incrementada hasta 25 mM en las cepas que presentan plásmido pJAC. Estos resultados demuestran la capacidad de las cepas con el plásmido de crecer en presencia de cianuro utilizando mecanismo que aún desconocemos; posiblemente por degradación del compuesto o por mecanismos de captación-expulsión. Estos resultados se pueden comparar con los datos obtenidos por otros autores en donde reportan cepas de *E. coli* capaces de biodegradar el cianuro (Figueira et al., 1996; Panay et al., 2020). Panay y

colaboradores sobreexpresaron el gen *cynD* en una *Escherichia coli* recombinante. La cianuro dehidratasa (*cynD*) es una enzima capaz de convertir el cianuro en amonio y formiato. Esta *E. coli* recombinante fue capaz de biodegradar NaCN a concentraciones de 4 mM hasta 12 mM (Panay et al., 2020).

Ensayo de Fluorescencia de E2-Crimson

Como se mencionó en la introducción de este trabajo, los genes estructurales *cynFBDS* de la *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 están involucrados en la ruta de degradación del cianato; concretamente por la expresión del gen *cynS* que codifica para la cianasa. En adición, Luque y colaboradores, señalan que la actividad de la cianasa, además de cianato, también fue inducida NaCN y el complejo cianuro cobre $[\text{Cu}(\text{CN}_4)^{-2}]$ (Luque-Almagro et al., 2008). En base a esta información, se planteó utilizar los genes *cynF* y su promotor, para que en presencia de cianuro se induzca la expresión de este activador y por consiguiente la expresión de la proteína fluorescente E2Crimson, y esta última sirva de testigo. Sin embargo, no se detectó fluorescencia en los cultivos de DH5 α -pJAC y 10Beta-pJAC suplementado con KCN, al menos hasta las 10 horas de incubación (datos no mostrados). Estos resultados pudiesen explicar de la siguiente manera: la expresión del regulador transcripcional (*cynF*) se puede encontrar reprimido por el nitrógeno presente en el medio rico LB. Un ensayo de inducción de la actividad cianasa (*cynS*) mostró que no se detectó actividad de cianasa en células cultivadas con amonio, nitrato, arginina y ornitina como fuentes de nitrógeno ni tampoco en células cultivadas en medio rico (LB) (figura 17). Por el contrario, las células cultivadas en medio mínimo con cianuro y el complejo cianuro-cobre fueron inductores de la cianasa (Luque, 2005).

Por otro lado, todavía no se comprende el mecanismo de expresión del *cynF*, si este es activado directamente o no por el cianuro o existe un mecanismo intermedio del cual *E. coli* podría carecer.

CUADRO 15

Inducción de la actividad cianasa en distintas condiciones

Compuesto	Actividad cianasa (mU·mg⁻¹)
Cianato	562
Amonio	0
Amonio + azida	0
Nitrato	0
NaCN	960
[Cu(CN) ₄] ²⁻	10.000
Urea	1.813
L-arginina	0
Ornitina	0
- N	41
LB	0
LB + NaCN	0

Figura 17. Inducción de la actividad cianasa en distintas condiciones. Adaptada de Luque, 2005.

CONCLUSIONES

Conclusiones

Se clonó con éxito el *cynF* y la región promotora del operón *cynFABDS* dando como producto el plásmido pJAC. Las cepas de *Escherichia coli*, DH5 α y NEB 10-Beta fueron transformada con el plásmido pJAC, con el fin construir un biosensor bacteriano para la detección de cianuro basado en la expresión de la proteína fluorescente E2-Crimson. Sin embargo, no se detectó fluorescencia en los cultivos de DH5 α -pJAC y 10Beta-pJAC en presencia de KCN. Lo que indica que por el momento estas cepas no pueden ser consideradas biosensoras de cianuro. No obstante, estas cepas mostraron mayor tolerancia al KCN que las cepas salvajes. Estos resultados indican que la presencia del plásmido pJAC podría conferirle mayor tolerancia al KCN.

Se conoce la capacidad de *E. coli* para degradar cianato, por lo que no es de extrañarse que exista un posible mecanismo implicado en la degradación de cianuro. Finalmente, nuestros resultados sugieren la posibilidad de utilizar las cepas DH5 α -pJAC y 10Beta-pJAC como cepas biorremediadores de cianuro.

RECOMENDACIONES

Recomendaciones

1. Realizar experimentos con otros compuestos cianurados, por ejemplo, NaCN, Zn(CN)₂.
2. Comprobar a través de otros ensayos (qPCR) si la expresión del regulador *cynF* se encuentra inducido en presencia de cianuro, en los cultivos con las cepas transformadas con pJAC.
3. Analizar la tasa de crecimiento de las cepas DH5 α -pJAC y 10Beta-pJAC en presencia de cianuro como única fuente de nitrógeno.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referencias Bibliográficas

- Addgene: Plasmid cloning by restriction enzyme digest (with protocols). (s/f). Addgene.org. Recuperado el 5 de septiembre de 2021, de <https://www.addgene.org/protocols/subcloning/>
- Addgene: Protocol - how to create a bacterial glycerol stock. (s/f). Addgene.org. Recuperado el 5 de septiembre de 2021, de <https://www.addgene.org/protocols/create-glycerol-stock/>
- Addgene: Protocol - how to run an agarose gel. (s/f). Addgene.org. Recuperado el 5 de septiembre de 2021, de <https://www.addgene.org/protocols/gel-electrophoresis/>
- Addgene: Protocol - How to Ligate Plasmid DNA. (s/f). Addgene.Org. Recuperado el 17 de mayo de 2022, de <https://www.addgene.org/protocols/dna-ligation/>
- Adams, B. L. (2016). The Next Generation of Synthetic Biology Chassis: Moving Synthetic Biology from the Laboratory to the Field. *ACS Synthetic Biology*, 5(12), 1328–1330. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00256>
- Adekunle, A., Raghavan, V., & Tartakovsky, B. (2019). On-line monitoring of heavy metals-related toxicity with a microbial fuel cell biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 132(October 2018), 382–390. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.03.011>
- Al-Sady, B., Greenstein, R. A., El-Samad, H. J., Braun, S., & Madhani, H. D. (2016). Sensitive and quantitative three-color protein imaging in fission yeast using spectrally diverse, recoded fluorescent proteins with experimentally-characterized in vivo maturation kinetics. *PLoS ONE*, 11(8), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159292>
- Angarita, M., Torres, M. I., & Díaz, A. (2017). Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura. *Revista Habanera de Ciencias Medicas*, 16(5), 796–807.
- Anton, B. P., & Raleigh, E. A. (2016). Complete Genome Sequence of NEB 5-alpha , a Derivative of. *Genome Announcements*, 4(6), 6–7. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01245-16>. Copyright
- ATSDR. (2006). Public Health Statement for Cyanide. *Agency for Toxic Substances and Disease*

- Registry, 1–8. <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp8-c1-b.pdf>
- Barbier, M., & Damron, F. H. (2016). Rainbow vectors for broad-range bacterial fluorescence labeling. *PLoS ONE*, *11*(3), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146827>
- Bonetto, M. C., Corton, E., Pérgola, M. S., & Sacco, N. J. (2018). *Biosensores y celdas de combustible microbianas: Ciencia con texto*. April.
- Brisbin, J. A. (2020). *Cyanide Clarification of Free and Total Cyanide Analysis for Safe Drinking Water Act (SDWA) Compliance, Revision 1.0*. June.
- Calero, P., & Nikel, P. I. (2019). Chasing bacterial chassis for metabolic engineering: a perspective review from classical to non-traditional microorganisms. *Microbial Biotechnology*, *12*(1), 98–124. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13292>
- Chang, A. Y., Chau, V. W., Landas, J. A., & Yvonne. (2017). Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)*, *1*(June), 22–25.
- Clouthier, S. (2012). *Preparation of Ampicillin Stocks*. 100.
- D'Souza, S. F. (2001). Microbial biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, *16*(6), 337–353. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00125-7](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00125-7)
- Durfee, T., Nelson, R., Baldwin, S., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., Petrosino, J. F., Qin, X., Muzny, D. M., Ayele, M., Gibbs, R. A., Csörgo, B., Pósfai, G., Weinstock, G. M., & Blattner, F. R. (2008). The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: Insights into the biology of a laboratory workhorse. *Journal of Bacteriology*, *190*(7), 2597–2606. <https://doi.org/10.1128/JB.01695-07>
- Engbrecht, J., Brent, R., & Kaderbhai, M. A. (1991). Minipreps of Plasmid DNA. *Current Protocols in Molecular Biology*, *15*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0106s15>
- Figueira, M. M., Ciminelli, V. S. T., Andrade, M. C. de, & Linardi, V. R. (1996). Cyanide

- degradation by an *Escherichia coli* strain. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(5), 519–523. <https://doi.org/10.1139/m96-070>
- Guo, K. H., Chen, P. H., Lin, C., Chen, C. F., Lee, I. R., & Yeh, Y. C. (2018). Determination of Gold Ions in Human Urine Using Genetically Engineered Microorganisms on a Paper Device. *ACS Sensors*, 3(4), 744–748. <https://doi.org/10.1021/acssensors.7b00931>
- Guo, M., Wang, J., Du, R., Liu, Y., Chi, J., He, X., Huang, K., Luo, Y., & Xu, W. (2020). A test strip platform based on a whole-cell microbial biosensor for simultaneous on-site detection of total inorganic mercury pollutants in cosmetics without the need for predigestion. *Biosensors and Bioelectronics*, 150(September), 111899. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111899>
- Henretig, F. M., Kirk, M. A., & McKay, C. A. (2019). Hazardous chemical emergencies and poisonings. *New England Journal of Medicine*, 380(17), 1638–1655. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1504690>
- Jackson, R., & Logue, B. A. (2017). A review of rapid and field-portable analytical techniques for the diagnosis of cyanide exposure. *Analytica Chimica Acta*, 960, 18–39. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.12.039>
- Jaszczak, E., Polkowska, Ż., Narkowicz, S., & Namieśnik, J. (2017). Cyanides in the environment—analysis—problems and challenges. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(19), 15929–15948. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9081-7>
- Javaheri Safa, Z., Aminzadeh, S., Zamani, M., & Motallebi, M. (2017). Significant increase in cyanide degradation by *Bacillus* sp. M01 PTCC 1908 with response surface methodology optimization. *AMB Express*, 7(1), 200. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0502-2>
- Jegatheesan, J. V., & Shu, L. (2017). *Principles and Applications of Environmental Biotechnology for a Sustainable Future* (R. L. Singh (ed.)). Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-1866-4>
- Jia, X., Zhao, T., Liu, Y., Bu, R., & Wu, K. (2018). Gene circuit engineering to improve the

- performance of a whole-cell lead biosensor. *FEMS Microbiology Letters*, 365(16), 1–8.
<https://doi.org/10.1093/femsle/fny157>
- Khan, A., Salama, E. S., Chen, Z., Ni, H., Zhao, S., Zhou, T., Pei, Y., Sani, R. K., Ling, Z., Liu, P., & Li, X. (2020). A novel biosensor for zinc detection based on microbial fuel cell system. *Biosensors and Bioelectronics*, 147, 111763. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111763>
- Knowles, C. J. (1976). Microorganisms and cyanide. *Bacteriological Reviews*, 40(3), 652–680.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.40.3.652-680.1976>
- Kremers, G. J., Gilbert, S. G., Cranfill, P. J., Davidson, M. W., & Piston, D. W. (2011). Fluorescent proteins at a glance. *Journal of Cell Science*, 124(15), 2676.
<https://doi.org/10.1242/jcs.095059>
- Lei, Y., Chen, W., & Mulchandani, A. (2006). Microbial biosensors. *Analytica Chimica Acta*, 568(1–2), 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.065>
- Liu, Z., Zhang, Y., Bian, C., Xia, T., Gao, Y., Zhang, X., Wang, H., Ma, H., Hu, Y., & Wang, X. (2019). Highly sensitive microbial biosensor based on recombinant Escherichia coli overexpressing catechol 2,3-dioxygenase for reliable detection of catechol. *Biosensors and Bioelectronics*, 126(July 2018), 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.10.050>
- Luque-Almagro, V.M., Blasco, R., Huertas, M. J., Martínez-Luque, M., Moreno-Vivián, C., Castillo, F., & Roldán, M. D. (2005). Alkaline cyanide biodegradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344: Figure 1. *Biochemical Society Transactions*, 33(1), 168–169. <https://doi.org/10.1042/bst0330168>
- Luque-Almagro, Víctor M., Acera, F., Igeño, M. I., Wibberg, D., Roldán, M. D., Sáez, L. P., Hennig, M., Quesada, A., Huertas, M. J., Blom, J., Merchán, F., Escibano, M. P., Jaenicke, S., Estepa, J., Guijo, M. I., Martínez-Luque, M., Macías, D., Szczepanowski, R., Becerra, G., ... Blasco, R. (2013). Draft whole genome sequence of the cyanide-degrading bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Environmental Microbiology*, 15(1), 253–270. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02875.x>

- Luque-Almagro, Víctor M., Huertas, M. J., Sáez, L. P., Luque-Romero, M. M., Moreno-Vivián, C., Castillo, F., Roldán, M. D., & Blasco, R. (2008). Characterization of the *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 cyanase, an enzyme that is not essential for cyanide assimilation. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(20), 6280–6288.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00916-08>
- Luque, M. (2005). *Metabolismo del cianuro y del cianato en Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT5344 . Aplicaciones biotecnológicas.*
- Mahendran, R., BS, S., Thandeeswaran, M., KG, K., Vijayasathy, M., Angayarkanni, J., & Muthusamy, G. (2020). Microbial (Enzymatic) Degradation of Cyanide to Produce Pterins as Cofactors. *Current Microbiology*, *77*(4), 578–587. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01694-9>
- Martinez, A. R., Heil, J. R., & Charles, T. C. (2019). An engineered GFP fluorescent bacterial biosensor for detecting and quantifying silver and copper ions. *BioMetals*, *3*.
<https://doi.org/10.1007/s10534-019-00179-3>
- Reglamento Técnico DGNTI-COPANIT 23-395-99, 634 (1999).
https://www.mici.gob.pa/uploads/media_ficheros/2019/07/2/normas-y-tecnologia-industrial/rt/rt-dgnti-copanit-23-395-1999.pdf
- Ministerio de Comercio e Industrias. (2000). Reglamento técnico DGNTI-COPANIT 35-2000.Descarga de efluentes líquidos directamente a cuerpos y masas de aguas superficiales y subterráneas. In *Gaceta Oficial de la República de Panamá* (Issue 24115,10 de agosto). https://www.asep.gob.pa/wp-content/uploads/agua/legislacion/dgnti_35-2000.pdf
- Munoz Miranda, L., Higuera Ciapara, A., Gschaedler Mathis, L., Rodriguez Zapata, A., Pereira Santana, L., & Figueroa Yanez, J. (2019). Breve descripción de la Biología y la Importancia de su Relación con otras Disciplinas. *IB, Revista Mexicana de Ingeniería Biomedica*, *40*(1), 1–7.

- Muralikrishna, I. V., & Manickam, V. (2017). Introduction. In *Environmental Management* (pp. 1–4). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811989-1.00001-4>
- Padilla, C., Diez, J., Martínez, E., Bárcena, J., & García, C. (2011). Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico. *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular*, 1–8.
- Panay, A. J., Vargas-Serna, C. L., & Carmona-Orozco, M. L. (2020). Biodegradation of cyanide using recombinant *Escherichia coli* expressing *Bacillus pumilus* cyanide dihydratase. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 22(1), 27–35. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v22n1.79559>
- Park, M., Tsai, S. L., & Chen, W. (2013). Microbial biosensors: Engineered microorganisms as the sensing machinery. *Sensors (Switzerland)*, 13(5), 5777–5795. <https://doi.org/10.3390/s130505777>
- Sáez, L. P., Cabello, P., Ibáñez, M. I., Luque-Almagro, V. M., Roldán, M. D., & Moreno-Vivián, C. (2019). Cyanate assimilation by the alkaliphilic cyanide-degrading bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344: Mutational analysis of the *cyn* gene cluster. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12). <https://doi.org/10.3390/ijms20123008>
- Schwarzenbach, R. P., Egli, T., Hofstetter, T. B., von Gunten, U., & Wehrli, B. (2010). Global Water Pollution and Human Health. *Annual Review of Environment and Resources*, 35(1), 109–136. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-100809-125342>
- Serrano-rivero, Y., & Fando-calzada, A. H. R. (2013). Comparación de dos métodos para la preparación de células competentes en *Escherichia coli*. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 44(2).
- Skowronski, B., & Strobel, G. A. (1969). Cyanide resistance and cyanide utilization by a strain of *Bacillus pumilus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 15(1), 93–98. <https://doi.org/10.1139/m69-014>

- Speer, M. A., & Richard, T. L. (2011). *Amplified insert assembly : an optimized approach to standard assembly of BioBrick™ genetic circuits* *Amplified insert assembly : an optimized approach to standard assembly of BioBrick™ genetic circuits*. 17(December).
- Strack, R. L., Hein, B., Bhattacharyya, D., Hell, S. W., Keenan, R. J., & Glick, B. S. (2009). A Rapidly Maturing Far-Red Derivative of DsRed-Express2 for Whole-Cell Labeling. *Biochemistry*, 48(35), 8279–8281. <https://doi.org/10.1021/bi900870u>
- Su, L., Jia, W., Hou, C., & Lei, Y. (2011). Microbial biosensors: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(5), 1788–1799. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.09.005>
- Takei, F., & Nakatani, K. (2013). The chemistry of PCR primers: Concept and application. *Israel Journal of Chemistry*, 53(6–7), 401–416. <https://doi.org/10.1002/ijch.201300027>
- Truque, P. A. (2003). Armonización de los estándares de agua potable en las Americas. *Organization of American States. Department of Sustainable Development*, 17. <https://www.oas.org/dsd/publications/classifications/Armoniz.EstandaresAguaPotable.pdf>
- Wibberg, D., Bremges, A., Dammann-Kalinowski, T., Maus, I., Igeño, M. I., Vogelsang, R., König, C., Luque-Almagro, V. M., Roldán, M. D., Sczyrba, A., Moreno-Vivián, C., Blasco, R., Pühler, A., & Schlüter, A. (2016). Finished genome sequence and methylome of the cyanide-degrading *Pseudomonas pseudoalcaligenes* strain CECT5344 as resolved by single-molecule real-time sequencing. *Journal of Biotechnology*, 232, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.04.008>

