



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ingeniería  
Maestría en ciencias con línea terminal en Ingeniería de Biosistemas

Sistema cuantificador de fluorescencia para el desarrollo de biosensores de nitratos a partir de bacterias genéticamente modificadas.

Opción de titulación

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Maestría en ciencias con línea terminal en Ingeniería de Biosistemas


**Presenta:**

Raúl Romero Galindo

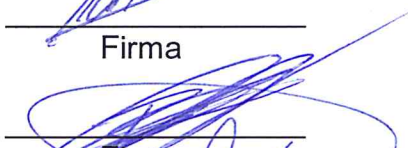
Dirigido por:

Dr. Luis Miguel Contreras Medina

Dr. Luis Miguel Contreras Medina  
Presidente

  
Firma

Dr. Ramón G. Guevara González  
Secretario

  
Firma

Dr. Irineo Torres Pacheco  
Vocal

  
Firma


Dr. Enrique Rico García  
Suplente

  
Firma

Dra. Rosario Guzmán Cruz  
Suplente

  
Firma

  
Dr. Manuel Toledano Ayala  
Director de la Facultad de Ingeniería

  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loara Piña  
Director de Investigación y Posgrado

## RESUMEN

En este trabajo de tesis se presenta un sistema cuantificador de fluorescencia que sugiere su utilización para el desarrollo de biosensores bacterianos que emiten fluorescencia. Este sistema está compuesto por un diodo emisor de luz (led) de color violeta, un filtro de excitación, un lente convergente y un fotodiodo BPW34 para la detección de la fluorescencia, un amplificador de transimpedancia que convierte la fotocorriente producida por el fotodiodo a una señal de voltaje. Se determinó la relación entre la fluorescencia y la concentración bacteriana modificada genéticamente con la proteína verde fluorescente mediante un modelo de crecimiento logístico. Los resultados del experimento demuestran que este sistema es sensible a la fluorescencia emitida por la proteína verde fluorescente (GFP) en respuesta a una dilución de 1:10 a 1:1000 de bacterias *e.coli* con GFP con tiempo de crecimiento de 16 horas y una fuente de excitación modulada a una frecuencia de 60 Hertz (hz) con una señal cuadrática, obteniendo un coeficiente de determinación (r. cuadrada) de 0.98. Mismos resultados sugieren el uso del sistema cuantificador de fluorescencia para el desarrollo de biosensores a partir de bacterias genéticamente modificadas.

**Palabras clave:** Fluorescencia, nitratos, led, fotodiodo.

## SUMMARY

In this thesis a fluorescence quantifier system is presented that suggests its use for the development of bacterial biosensors that emit fluorescence. This system consists of a violet-colored light emitting diode (LED), an excitation filter, a converging lens, a BPW34 photodiode for the detection of fluorescence, a transimpedance amplifier that converts the photocurrent produced by the photodiode to a voltage signal. The relationship between the fluorescence and the bacterial concentration genetically modified with the green fluorescent protein was determined by a logistic growth model. The results of the experiment show that this system is sensitive to the fluorescence emitted by the green fluorescent protein (GFP) in response to a dilution of 1: 1 to 1: 10000 of bacteria e.coli with GFP with a growth time of 16 hours and a source of excitation modulated at a frequency of 60 Hertz (hz) with a quadratic signal, obtaining a coefficient of determination ( $r^2$ ) of 0.98. The same results suggest the use of the fluorescence quantifier system for the development of biosensors from genetically modified bacteria.

Keywords: Fluorescence, nitrates, LED, photodiode.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la universidad Autónoma de Querétaro por haberme proporcionado la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

Agradezco fielmente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme brindado el apoyo económico durante la realización de este proyecto.

Agradezco al coordinador de la maestría en Biosistemas Dr. Juan Fernando Trejo García, por su apoyo incondicional.

Agradezco al coordinador del campus Amazcala Dr. Enrique Rico García por su apoyo incondicional y por sus valiosas contribuciones que hicieron al trabajo final, así como sus revisiones periódicas.

En particular agradezco a mi director de tesis Dr. Luis Miguel Contreras Medina por sus conocimientos invaluable que me brindó para llevar a cabo esta tesis, y sobre todo su apoyo para que este trabajo lograra concluirse.

## INDICE

1.	ANTECEDENTES .....	9
1.1	Medición de nitratos mediante biosensores.....	11
2.	OBJETIVOS .....	16
2.1	Biosensores .....	16
2.2	Proteína verde fluorescente como gen reportero en bacterias genéticamente modificadas.....	17
2.3	Principios básicos para la medición de fluorescencia .....	19
2.4	Dispositivos de lógica reconfigurable.....	23
2.5	Hipótesis .....	24
2.6	Objetivo General .....	24
2.7	Objetivos Particulares .....	24
3.	MATERIALES Y METODOS .....	25
3.1	Diseño de un Sistema de medición de fluorescencia.....	25
3.1.1	Sistema óptico y de excitación .....	26
3.1.2	Sistema de detección .....	30
3.2	Generación de datos de fluorescencia medidos en diferentes poblaciones bacterianas con GFP.....	36
3.3	Lógica programable del sistema cuantificador de fluorescencia .....	36
3.3.1	Extracción de ADN plasmidico.....	36
3.3.2	Crecimiento bacteriano en medio LB solido + ZEONINA .....	37
3.3.3	Crecimiento bacteriano en medio liquido + ZEONINA.....	37
4.	RESULTADOS.....	39
5.	CONCLUSIONES .....	50
6.	BIBLIOGRAFIA .....	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1 Resultados experimentales obtenidos con el sistema construido en comparación con la curva de fluorescencia obtenida con el fluorómetro comercial (Pavoni et al., 2014) .....	13
Figura 2-1 Gen reportero GFP es utilizado para el estudio de biosensores .....	17
Figura 2-2 Principios básicos de sensores bacterianos mediante GFP. Anatomía de un sensor bacteriano para la determinación de nitratos, en donde un gen reportero GFP y un gen promotor sensible a nitratos es integrado al genoma de una célula <i>E. coli</i> transgénica (Kristen et al., 2005).....	19
Figura 2-3 Principio de funcionamiento, representación esquemática del fenómeno de la fluorescencia mediante el modelo de Bohr.....	20
Figura 2-4 Espectro de emisión y excitación de la fluorescencia .....	21
Figura 3-2 Led ultravioleta de 395 <i>nm</i> de 5 watts de potencia utilizado para excitación de fluorescencia .....	27
Figura 3-3 Convertidor Analógico Digital- MCP4922.....	28
Figura 3-4 Configuración de DAC MCP4922 para modulación de fuente de excitación .....	28
Figura 3-5 Amplificador de voltaje de la fuente de excitación .....	29
Figura 3-6 Configuración del amplificador de corriente .....	30
Figura 3-7 Responsividad espectral del Fotodiodo BPW34 .....	31
Figura 3-8 Configuración del amplificador de transimpedancia que convierte la fotocorriente en un voltaje de salida.....	32
Figura 3-9 Configuración de amplificadores operacionales, TL081 amplifica e invierte la señal, mientras que el TL082 únicamente invierte la señal.....	33

Figura 3-10 Impresión 3D, desplazamiento lineal del fotodiodo .....	34
Figura 3-11 Base del sistema cuantificador de fluorescencia done se coloca la muestra a analizar .....	34
Figura 3-12 Soporte donde se desplaza el fotodiodo a lo largo del eje z .....	35
Figura 3-13 Ensamble final del sistema cuantificador de fluorescencia .....	35
Figura 3-14 Extracción de ADN plasmídico.....	36
Figura 3-15 Siembra de cultivo bacteriano con gfp y sin gfp, así como sus diluciones para ser analizadas. ....	38
Figura 4-1 Absorbancia en bacterias sin GFP .....	41
Figura 4-2 Absorbancia en bacterias con GFP.....	41
Figura 4-3 Fluorescencia medida en voltaje con modulación con onda cuadrada a 1 khz.....	42
Figura 4-4 Fluorescencia medida en voltaje con modulación con onda cuadrada a 60 HZ .....	42
Figura 4-5 Fluorescencia medida en voltaje con modulación con onda cuadrada a 10khz.....	42
Figura 4-6 Fluorescencia medida en voltaje con modulación con onda cuadrada a 2 khz.....	42
Figura 4-7 Voltaje medido con modulación con onda cuadrada a 1 KHZ.....	43
Figura 4-8 Voltaje medido con modulación con onda cuadrada a 60 HZ.....	43
Figura 4-9 Voltaje medido con modulación con onda cuadrada a 10 KHZ.....	43
Figura 4-10 Voltaje medido con modulación con onda cuadrada a 2 KHZ.....	43
Figura 4-11 Análisis de regresión lineal en bacterias sin GFP .....	44

Figura 4-12 Análisis de regresión lineal en bacterias con GFP .....	44
Figura 4-13 Curva de crecimiento logístico .....	45
Figura 4-14 Absorción que presentan las bacterias con gfp medida con espectrofotómetro .....	46
Figura 4-15 Ajuste del modelo logístico propuesto para bacterias excitadas a 60 hz .....	47
Figura 4-16 Ajuste del modelo logístico propuesto para bacterias excitadas a 1 khz .....	48
Figura 4-17 Ajuste del modelo logístico propuesto para bacterias excitadas a 2 khz .....	48



## INDICE DE CUADROS

Cuadro 4-1 Mediciones de emisión de fluorescencia realizadas en cultivo bacteriano e.coli con GFP con cuatro frecuencias de excitación distintas.....	39
Cuadro 4-2 Mediciones de emisión de fluorescencia realizadas en cultivo bacteriano e.coli sin GFP con cuatro frecuencias de excitación distintas.....	40
Cuadro 4-3 Absorbancia en cultivo bacteriano e. coli con GFP .....	40
Cuadro 4-4 Absorbancia en cultivo bacteriano e. coli sin GFP.....	41

## 1. ANTECEDENTES

El nitrógeno es el nutriente mineral más importante en el ciclo de la vida de las plantas y es esencial para la producción de clorofila, proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos, entre otros. (Sinfield et al., 2010), se encuentra disponible en dos formas para la planta: amonio ( $NH_4^+$ ) y nitrato ( $NO_3^-$ ) (Taiz & Zeiger, 2010). El nitrato es absorbido en mayores cantidades que la concentración de amonio (Barrios, et al., 2012); sin embargo, esta relación debería de ser ajustada de acuerdo a los requerimientos del cultivo para optimizar la producción de la planta (Vigneau, et al., 2011) de lo contrario se vuelve un factor limitante para el crecimiento y desarrollo de la planta (Kraiser, et al., 2011), por lo que una deficiencia de nitrógeno detiene el crecimiento de la planta, presenta hojas cloróticas por ende, reduce el rendimiento productivo. Así mismo una toxicidad de nitrógeno en las plantas puede acarrear problemas en el sistema radicular, tejido blando, retraso en la producción y rendimientos de baja calidad, del mismo modo, el uso irracional de este fertilizante mineral provoca un aumento en los costos de producción, contaminación de los mantos acuíferos por lixiviación y salinización los suelos agrícolas.

Diversas herramientas se han utilizado para medir nitratos en plantas (Sophie et al., 2012), sin embargo, el uso de los métodos de referencia como son Kjeldahl digestion y Dumas combustion resultan ser métodos destructivos y consumen mucho tiempo (Muñoz-Huerta et al., 2013). El uso de los sistemas de análisis rápidos para determinar la cantidad de  $NO_3^-$  en planta mediante electrodos selectivos han presentado interferencias causadas por presencia de otros iones aceptores (Thompson et al., 2014), se han utilizado otros métodos para medir nitratos mediante sensores ópticos como son espectro radiómetros, reflectómetros, imágenes de sensores satelitales y cámaras digitales, tal como la reflectancia del dosel del cultivo, la transmitancia de la hoja, clorofila y la fluorescencia de polifenoles, (Zebarth, et al., 2009) en donde se han encontrado altas correlaciones entre los parámetros ópticos y el estado del nitrógeno de las plantas, estas técnicas no son destructivas (Muñoz-Huerta et al., 2013), sin embargo, existen algunos

inconvenientes que modifican la medición (Zebarth et al., 2009) como son la saturación de la clorofila, interferencia atmosférica, el suelo y el alto costo de los instrumentos (Muñoz-Huerta et al., 2013).

Estas interferencias se pueden excluir si se utilizan biosensores (Tylor et al., 2004) basados en construcciones genéticas fusionados a una proteína verde fluorescente, para la determinación cuantitativa de nitrato (Tylor et al., 2004) ya que las características selectivas y sensitivas de los biosensores permiten mejorar la precisión de la medición de nitratos debido a la ausencia de interferencias producidas por acarreadores de iones y factores externos que alteren las mediciones de nitratos (Tylor et al., 2004). Así mismo, se conoce que las condiciones altas de salinidad y la presencia de imidazol son factores que de ningún modo alteran la estabilidad de la fluorescencia de la GFP (Chang-Hun, 2009). También se ha encontrado que a diferencia de los métodos convencionales de cuantificación de nitratos, la GFP no presenta afinidad con cationes divalentes lo que permite que la unión y la elución de otras proteínas de fusión no afecten la asimilación del  $NO_3^-$ ; así mismo, la GFP al no ser una enzima, resulta un excelente indicador porque no interfiere con el mecanismo fisiológico de la célula (Fernandez et al., 2006). Otros estudios demuestran que el intervalo de pH del proceso de purificación se mantiene generalmente entre 7 a 8 que es óptima para la fluorescencia de la GFP. (Chang-Hun, 2009).

Las respuestas a este tipo de biosensores nutricionales se están empleando con gran sensibilidad y versatilidad (Amy & Tina K., 2004), siendo la intensidad de la fluorescencia proporcional a la concentración de nitrato extracelular (Tylor et al., 2004); sin embargo, deben de someterse a una preparación más prolongada (Amy & Tina K., 2004) ya que no existen dispositivos electrónicos que hagan posible el uso de este método de medición de nitratos de forma práctica, y de fácil acceso para las mediciones en campo. Si se utilizan las propiedades fluorescentes de la proteína verde fluorescente (Llorente & Horta, 1991) mediante el uso de biosensores bacterianos basados en un constructo de ADN complementario (gen reportero (GFP) y un gen promotor sensible a nitratos en un

vector de expresión en células procariotas (*E. coli*) (Chalfie et al., 1994) es necesario desarrollar un sistema cuantificador de fluorescencia que permita determinar la cantidad de nitratos en una solución.

Bajo este modelo de biosensores, es posible visualizar a la expresión de la fluorescencia como un indicador capaz de detectar no solo Nitratos, si no cualquier otro compuesto utilizando una construcción genética de algún analito de interés, finalmente útil como instrumento que permita realizar estas cuantificaciones.

### 1.1 Medición de nitratos mediante biosensores.

A diferencia de los métodos convencionales de cuantificación de nitratos, existen trabajos previos en donde las interferencias producidas por acarreadores de iones y factores externos que alteran las mediciones de nitrato en los sistemas convencionales de medición, se pueden excluir si se utilizan biosensores basados en construcciones genéticas (Tylor et al., 2004), ya que las respuestas a los biosensores de nitratos se están empleando con gran sensibilidad y versatilidad (Amy & Tina K., 2004) siendo las características selectivas y sensibles de los biosensores particularmente ventajosos para las mediciones de nitrógeno ( Tylor et al. , 2004 ).

Los sensores de fluorescencia son un objetivo atractivo para el desarrollo de una nueva generación de sistemas de detección de nitrato (Burdette & Cardon, 2008) puesto que las metodologías basadas en fluorescencia son más sensibles y fáciles de aplicar que las tecnologías actuales (Burdette & Cardon, 2008).

Los iones de nitrato se pueden determinar cuantitativamente mediante sensores bacterianos ( *Escherechia coli* - pPNARGFP ), en donde un promotor y una región reguladora del gen operón de nitrato reductasa *narGHJ* - (Pnar) son fusionadas a un gen de la *gfp* que codifica la proteína verde fluorescente (GFP). La actividad Pnar-gfp determina la relación entre las concentraciones de nitratos mediante la fluorescencia emitida por el biosensor celular estableciendo que la inserción del plasmido pPNAR-GFP en células *E. coli* es útil para la determinación

cuantitativa de nitrato en aguas ambientales, en donde la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la concentración de nitratos con un límite de detección  $0.05 \mu\text{M}$  sin interferencia de otros aceptores de electrones como son nitrito, sulfóxido de dimetilo, trimetilamina -N -óxido y fumarato (Taylor et al., 2004).

El desarrollo de biosensores bacterianos - *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*) y *E. coli* han sido desarrollados mediante la fusión del gen promotor regulador de nitratos (**narG**) al gen reportero **GFP** y al gen reportero de nucleación de hielo (**Inaz**) dando lugar enpNgfp respectivamente. La fluorescencia de la GFP en células de *E. cloacae* que albergan al plásmido pNgfp es uniforme a una concentración dada de nitrato aumentando aproximadamente 1000 veces cuando el nitrato aumenta de 0 a 1mM (Kristen et al., 2005). La inducción medible de la nucleación de hielo en células de *E. cloacae* que albergan al plásmido pNice ocurre a las concentraciones de nitrato tan bajas como 0,1mM, mientras que la fluorescencia de GFP se detectó en las células que albergan al plásmido pNgfp alrededor de los 10 mM. Kristen (2005) demostró que los biosensores bacterianos son útiles para estimar la disponibilidad de nitratos en nichos microbianos. Estas transformaciones genéticas se han utilizado para detectar la disponibilidad de nitrato en el suelo alrededor de las raíces.

La fluorescencia es un fenómeno muy estudiado por diversos procesos y sistemas de interés biológico en donde implican moléculas que absorben y emiten radiación en un rango del espectro de luz ultravioleta (Pavoni et al., 2014). La fluorescencia se puede medir a través del uso de la radiación electromagnética en técnicas espectroscópicas de fluorescencia. Esas técnicas analizan una radiación que es absorbida, emitida o dispersada por la muestra de interés (Raymond, 1983) mediante un transductor fotoeléctrico u otro tipo de dispositivo electrónico que son pieza fundamental de los equipos electrónicos llamados espectrómetros (Douglas et al., 2008), estos equipos electrónicos están constituidos generalmente por tres elementos principales: una fuente de radiación, un monocromadaor y un detector (Pavoni et al., 2014).

Diversos estudios han permitido el desarrollo de nuevos fluorómetros de menor tamaño y menor costo mediante el uso de dos diodos emisores de luz (leds) de color azul que excitan a la muestra en donde se han obtenido resultados favorables en comparación con un espectrofotómetro comercial (Hitachi F-7000). En la Figura 1-1 se muestran dos curvas de fluorescencia de una muestra excitada con luz azul utilizando el sistema desarrollado, así como la curva de fluorescencia medida por el espectrofotómetro F-7000, en donde la comparación de las curvas obtenidas con la curva esperada, arrojan dos picos adicionales que no forman parte del espectro esperado de la muestra, uno alrededor de los 450 *nm* y el otro a 600 *nm* (Pavoni et al., 2014), el primer espectro detectado se atribuye al pico de emisión de los leds utilizados para excitación ( 450nm) y el segundo espectro detectado, es atribuido a la sensibilidad del fotodiodo OPT301 que respecto a la longitud de onda.

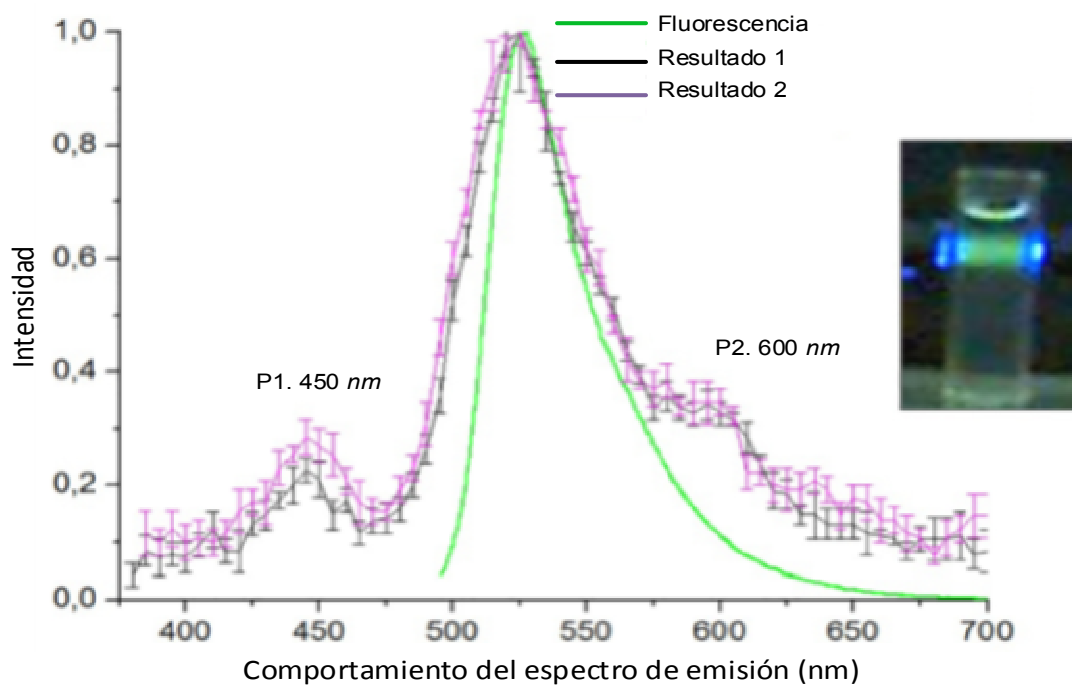


Figura 1-1 Resultados experimentales obtenidos con el sistema construido en comparación con la curva de fluorescencia obtenida con el fluorómetro comercial (Pavoni et al., 2014)

El uso de sensores cmos (del inglés: semiconductor complementario de óxido metálico) para la detección de fluorescencia se han utilizado en experimentos

biológicos en donde los resultados de los experimentos demuestran que sensores cmos con un tamaño de pixel de  $0.18\mu m$  pueden alcanzar una sensibilidad de 0.1 A/W a 515 nm con una corriente de oscuridad de 300 fA. Este sistema es sensible a la emisión de fluorescencia con una concentración tan baja de 20 ng/ml generando una fotocorriente de 7 fA.

Maruyama (2013), desarrollo un detector de fluorescencia mediante un Arreglo cmos - diodo de avalancha de un solo fotón (SPAD), este dispositivo está integrado por un arreglo de pixeles capaz de detectar fotones y convertirlos en electrones, en donde el tiempo de vida de la fluorescencia ( $10^{-10} - 10^{-7}s$ ) (Valeur, 2001), puede ser medida en tiempo real.

Estudios recientes demuestran que el uso de sensores de imagen cmos para la detección de imagen del tiempo de vida de la fluorescencia se ha vuelto una herramienta poderosa para el análisis de moléculas ya que el tiempo de vida de la fluorescencia refleja la estructura de las moléculas. Hyung (2006) realizo un prototipo de un sensor cmos con 320 x 80 pixeles con un tamaño de pixeles de  $0.18\mu m$ . Los resultados infieren que el sensor FLIM cmos tiene la habilidad de medir la fluorescencia generada por los pulsos de luz de excitación usando diodos emisores de luz ultravioleta de color azul.

Actualmente el uso de sensores CCD'S (del inglés: Dispositivo de carga acoplada) se han estado utilizando para la detección directa de fluorescencia, es una solución de bajo coste para aplicaciones con requerimientos de análisis medios, otra ventaja de los equipos basados en CCD es la posibilidad de detectar simultáneamente señales fluorescentes y bioluminiscentes, este esquema ha sido aplicado con éxito en inmuno ensayos o métodos basados en hibridación de ácidos nucleicos, sin embargo, se requieren tiempos de integración más largos (Mira, et al., s.f.).

Paralelamente hasta la fecha se utilizan dos técnicas para el análisis de fluorescencia, como lo es el barrido con láser y la detección con tubo multiplicador, sin embargo son equipos de alto coste, trabaos recientes, sugieren que basta con

un fotodiodo para la detección de fotones fluorescentes a bajos niveles de luz (Villanueva, et al., 2007).

Actualmente, los procesos biológicos se ven involucrados hasta cierto grado con dispositivos FPGA (Field Programmable Gate Array), pues existe la necesidad de desarrollar tecnología orientada a generar herramientas analíticas que permitan estudiar los procesos fisiológicos de las plantas y sus estados de estrés con el objetivo de contrarrestar la pérdida de alimentos ocasionado por factores bióticos y abióticos. Una propuesta reciente para la generación de estas herramientas analíticas se ha dado mediante el uso de la fluorescencia de clorofila; como indicador del estado fisiológico de las plantas, implementado en lógica programable FPGA y técnicas de síntesis digital de señales, y aplicando diferentes formas de onda para la excitación de la muestra fotosintética (Fernandez-Jaramillo, et al., 2015). Se han empleado dispositivos FPGA para el desarrollo de Sistemas de Procesamiento para Correlación y Espectrometría en Radioastronomía (Cuevas, 2010). el uso de este dispositivo en el área de biosistemas es cada vez más frecuente ya que los FPGA son dispositivos que han ganado popularidad, principalmente debido a su alta velocidad de procesamiento, alta reconfigurabilidad, y soluciones tipo SoC (System on a Chip) . Estas características permiten que los FPGAs sean usados en aplicaciones donde requerimientos de cómputo de alta capacidad sean necesarios y que dispositivos tales como las computadoras, DSP (Digital signal processing) y microcontroladores no son capaces de cumplir (Pearson, 2009).



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Biosensores

Los biosensores generalmente se definen como dispositivos que consisten de un bioreceptor y un mecanismo de transducción de señal capaz de producir una señal medible en la presencia de un analito de interés (Donald, 2009), este término varía de acuerdo al enfoque aplicado, pueden ser cualitativos o cuantitativos, dispositivos físicos o células transgénicas, que finalmente cuentan con un receptor biológico que interpreta una señal de reconocimiento detectando cambios bioquímicos o fisiológicos, finalmente un sistema de transformación de señal es empleado para convertir un evento suscito en una señal medible (Sadanandom & Napier, 2010).

El uso de los avances en la ingeniería genética permite que un elemento de detección sea fusionado con un gen reportero para producir un biosensor celular (Tylor, et al., 2004). Las proteínas que emiten fluorescencia se han utilizado como marcadores específicos y como genes reporteros para el estudio del comportamiento de proteínas a nivel celular y para medir internamente la actividad de un promotor en tejidos y a nivel de organismos vivos (Jin-Min, et al., 2014). Cuando el gen de una proteína es utilizado como un reportero de transcripción, un promotor celular conduce a la expresión del gen reportero resultando una señal medible que localmente refleja la expresión del promotor in vivo (Figura 2-1), típicamente una proteína bioluminiscente o fluorescente como lo es la luciferasa o la GFP (Tylor, et al., 2004). Comúnmente la bacteria *E. coli* es modificada para realizar estas expresiones genéticas en donde la intensidad luminiscente de la proteína fluorescente es directamente proporcional a la concentración del analito de interés.

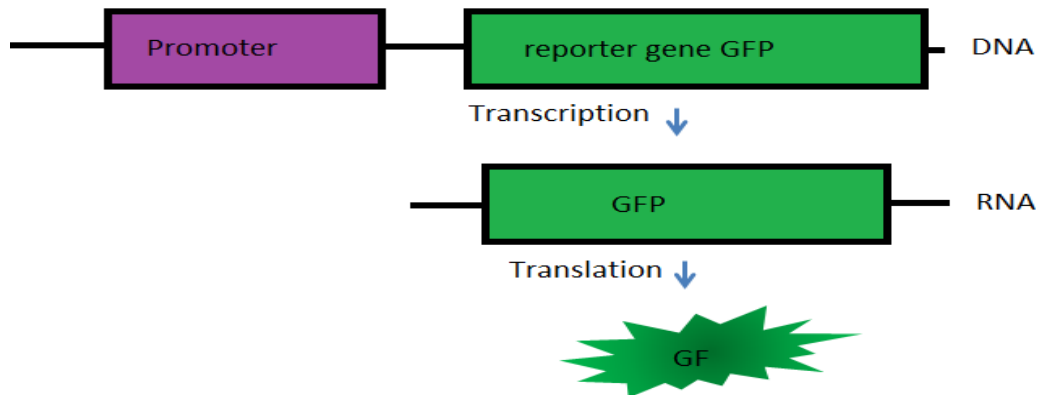


Figura 2-1 Gen reportero GFP es utilizado para el estudio de biosensores

## 2.2 Proteína verde fluorescente como gen reportero en bacterias genéticamente modificadas.

La medusa *Aequorea victoria* formada por una proteína que tiene la propiedad de emitir luz verde se ha convertido en una herramienta útil para la biología celular (Alicia, et al., 2009). La GFP, es una proteína que está formada por 238 aminoácidos (Ormö et al., 1996), es el más estudiado y utilizado, existen muchas otras variantes que se han desarrollado a partir de las modificaciones hechas en la GFP (Jin-Min, et al., 2014). La expresión de la GFP no solo sirve como un indicador reportero de algún estrés en particular si no como un indicador de la integridad de la membrana (Polizzi & Kontoravdi, 2015). El promotor de interés controla la expresión de la GFP (Bren, et al., 2013).

Muchas proteínas fluorescentes contienen cromóforos distintos de la secuencia del aminoácido de la proteína, como lo es de la GFP y es internamente generado por una reacción de tres aminoácidos (Donna, et al., 2013), dada por la ciclación espontánea y la oxidación de los residuos 65 – 66 - 67, correspondientes a los aminoácidos Ser 65 – Tyr 66 – Gly 67 de la proteína nativa, este cromóforo es el responsable de la emisión de la luz verde (Alicia, et al., 2009) y presenta dos picos de excitación y emisión, si es excitado a los 395 nm presenta un pico de emisión

de 508 *nm*, si es excitado a los 475 *nm* presenta un pico de emisión de 503 *nm* (Tsien, 1998).

Para que se dé la formación del cromóforo de la GFP, es necesario que exista un plegamiento correcto de la proteína, si este plegamiento no se logra o existe un mal plegado, los cromóforos no se forman y por lo tanto no existe emisión de fluorescencia (Donna, et al., 2013). Cuando se utiliza el gen reportero GFP, atribuye a una secuencia reguladora de otro gen (promotor), un promotor de interés esta fusionado a una región codificante de la GFP que conduce la expresión de la proteína fluorescente, resultando una señal fluorescente (Jin-Min, et al., 2014) que temporal y localmente refleja la expresión de un promotor in vivo (Donna, et al., 2013).

Las secuencias codificantes de estas proteínas fluorescentes en los plásmidos son altamente expresadas en el sistema de la bacteria *E. coli* (Chang-Hun, 2009), por lo tanto, se puede obtener una correlación entre la fluorescencia y la expresión de un promotor de interés en bacterias genéticamente modificadas. Por otra parte *E. coli* ha sido utilizada como herramienta para la detección de grandes cantidades de proteínas recombinantes (Donna, et al., 2013). Tsien (1998) clasifica a la GFP como una aplicación pasiva si es usada como un marcador fusionada a otra proteína puesto que solo refleja los niveles de expresión de la proteína o la ubicación sub celular de dicha proteína.

Biosensores basados en fluorescencia para la detección de nitratos han sido reportados. *E. coli* es transformada mediante la inserción de un plásmido en donde el promotor y las regiones reguladoras de nitrato reductasa Pnar son fusionadas a la GFP, la actividad Pnar-gfp es medida en un rango de concentraciones de nitratos mediante la emisión de la fluorescencia de la GFP siendo la intensidad de la fluorescencia proporcional a la concentración de nitrato extracelular (Figura 2-2), sin interferencia de otros aceptores de electrones como son nitrito, sulfoxido de dimetilo, N-óxido de trimetilamina y fumarato, (Taylor et al., 2004).

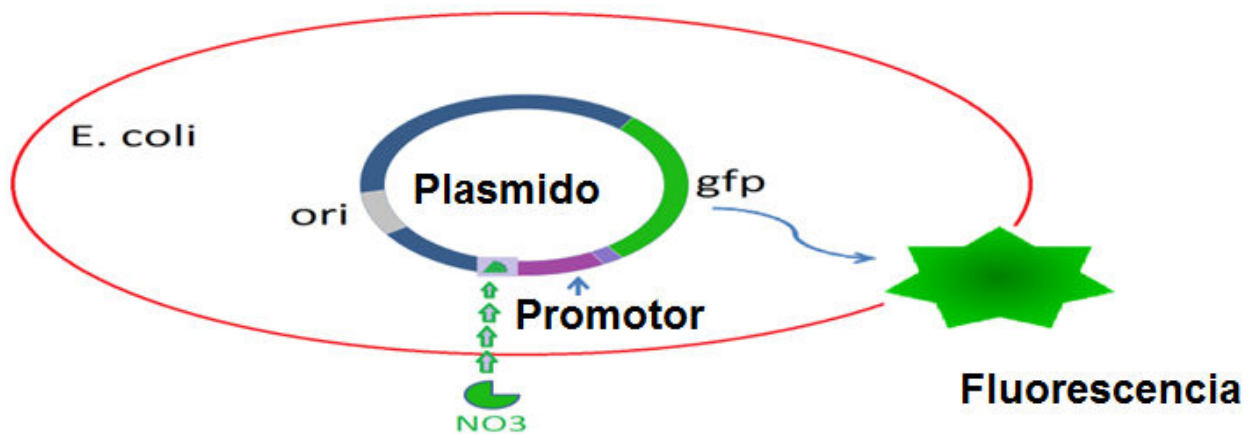


Figura 2-2 Principios básicos de sensores bacterianos mediante GFP. Anatomía de un sensor bacteriano para la determinación de nitratos, en donde un gen reportero GFP y un gen promotor sensible a nitratos es integrado al genoma de una célula *E. coli* transgénica

Para que se dé una correcta maduración de la GFP es necesario  $0.1 \mu M$  de GFP que es aproximadamente a  $10^5$  copias de células típicas en un volumen de 1.2 pL., altas concentraciones de GFP resultan de un fenómeno de agregación de subunidades de la misma proteína y de otras proteínas de la membrana, conocido como dimerización, que inhibe la fluorescencia o la reduce por debajo de la intensidad mínima requerida para ser visible (Tsien, 1998).

### 2.3 Principios básicos para la medición de fluorescencia

La fluorescencia es un fenómeno que ocurre en diversos procesos y sistemas de interés biológico en donde se ven implicadas moléculas que absorben y emiten radiación en un rango del espectro de la luz ultravioleta (Pavoni, et al., 2014). Este fenómeno se ha convertido en una herramienta útil para la investigación en donde se estudia a nivel molecular las estructuras y dinámica de los sistemas vivos (Valeur & Berberan-Santos, 2013).

Cuando ciertas moléculas llamados fluoróforos, fluorocromos, o tintes fluorescentes absorben luz, incrementan su nivel energético a un estado de excitación de tiempo finito (amersham, 2000) en donde la emisión de fotones de la fluorescencia es un proceso tan rápido como el de absorción ( $10^{-10} - 10^{-7}s$ )

(Valeur, 2001). En la Figura 2-3 se observa que si se irradia una muestra fluorescente con la energía adecuada, las moléculas absorben dicha energía, esta energía permite el desplazamiento de un electrón de valencia desde el estado fundamental (siendo un singlete electrónico en donde los electrones tienen espines opuestos y el giro neto es 0 en un nivel de energía superior) a un estado excitado *ES* (Ishikawa-Ankerhold, et al., 2012). Posterior a la emisión del fotón, la molécula regresa a su estado fundamental (Becker, 2012). La emisión de fotones acompañando el paso del nivel vibracional es un proceso espontáneo que se denomina fluorescencia (Valeur, 2001).

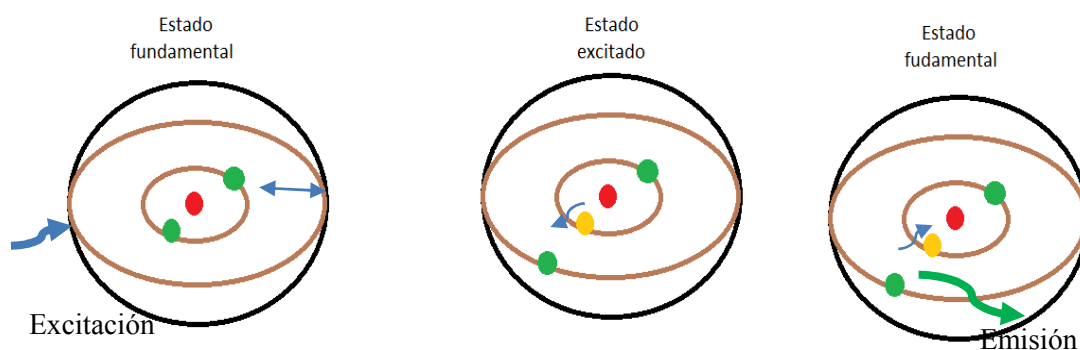


Figura 2-3 Principio de funcionamiento, representación esquemática del fenómeno de la fluorescencia mediante el modelo de Bohr

La intensidad de la fluorescencia  $A(t)$  es proporcional a la población de fluoróforos en su estado excitado y se ha utilizado como elemento de medición; sin embargo, se ve influenciada por diversos factores tales como la concentración de fluoróforo, su degradación y la intensidad del flujo de excitación (Li, et al., 2012). Cuando la fluorescencia se combina con un instrumento que censa la imagen de fluorescencia, (amersham, 2000) se eliminan los problemas de medición de la intensidad, ya que se mide el tiempo de vida de fluorescencia y se utiliza la tasa de descomposición de la fluorescencia en lugar del valor absoluto de la intensidad y, por lo tanto, la cuantificación no está influenciada por la degradación de la intensidad de fluorescencia (Li, et al., 2012) y se convierte en un método cuantitativo que es

ampliamente utilizado en biología molecular y laboratorios de bioquímica para una gran variedad de experimentos analíticos y aplicaciones de control de calidad, como son: medición de ácidos nucleicos totales, cuantificación de proteínas, secuenciación de ADN, entre otros (amersham, 2000).

Podría parecer que el espectro de fluorescencia debería encontrarse desplazado en su totalidad hacia longitudes de onda mayores, sin embargo puede comprobarse que parte de éste solapa con el espectro de absorción (Figura 2-4) (Grande, 2010). Este defecto de energía que, en principio, puede resultar contradictorio se debe a que no todas las moléculas se encuentran en el estado vibracional más bajo del estado fundamental.

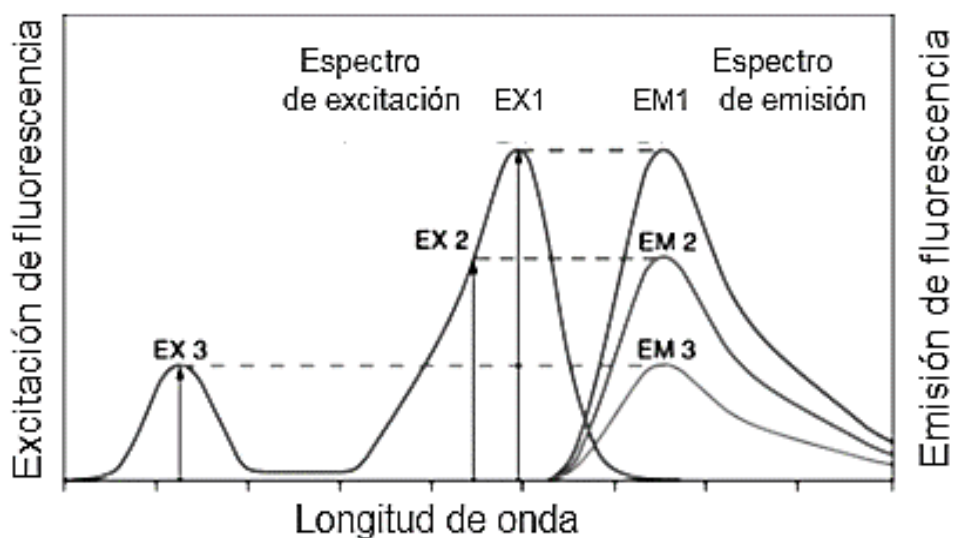


Figura 2-4 Espectro de emisión y excitación de la fluorescencia

La fluorescencia se puede medir a través del uso de la radiación electromagnética en técnicas espectroscópicas de fluorescencia. Experimentalmente se obtienen los espectros de átomos o de moléculas mediante espectrómetros que detectan la radiación dispersada, emitida o absorbida por la muestra de interés (Raymond, 1983). Estos instrumentos permiten detectar la intensidad de la radiación emitida por átomos o moléculas en función de la longitud de onda mediante un transductor fotoeléctrico u otro tipo de dispositivo electrónico y que son proporcionados por equipos electrónicos llamados espectrómetros

(Douglas, et al., 2008), estos equipos electrónicos están constituidos generalmente por tres elementos principales: una fuente de radiación, un monocromador y un detector (Pavoni, et al., 2014).

Un fluorómetro o espectrofluorómetro es un instrumento que utiliza las propiedades fluorescentes de ciertas partículas o moléculas para conocer la concentración de las mismas en una muestra concentrada (Llorente & Horta, 1991), constituye una herramienta indispensable en los estudios de sistemas biológicos gracias a su gran sensibilidad, versatilidad y favorable escala de tiempos. El fluorómetro permite excitar a una muestra a una longitud de onda determinada, posteriormente la emisión de fluorescencia generada a una cierta longitud de onda, comúnmente en el espectro de excitación de 500 *nm*, es detectada, cuantificada e interpretada. Existen diversas fuentes de excitación o radiación como lo son: el diodo láser, las lámparas de vapor de mercurio, diodos emisores de luz, lámparas de xenón (tiene un espectro de emisión continuo y de intensidad constante entre 300 y 800 *nm*) entre otros. (Grande, 2010).

Parte de la fluorescencia emitida pasa a través de un segundo filtro para alcanzar a un detector como poder ser un fotodiodo, y normalmente se encuentra a 90° respecto al haz de la fuente de excitación, esto con el fin de evitar que la luz incidente reflejada o transmitida, pueda ser medida por el detector (Pavoni, et al., 2014).

El espectro de excitación es relativamente idéntico al de absorción, pues la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la absorción. Así mismo, un fluorómetro versátil, puede registrar tanto el espectro de excitación como el espectro de emisión de la fluorescencia, manteniendo constante el espectro de excitación, es por eso que se utilizan filtros ópticos para que la emisión constante sea filtrada y filtros de excitación para dejar pasar únicamente el espectro de emisión (Grande, 2010).

## 2.4 Dispositivos de lógica reconfigurable.

Actualmente los dispositivos de lógica reconfigurable se encuentran presente en una gran variedad de familias, manteniendo su valor principal como es la reconfigurabilidad y prestaciones y a un precio justo (Martínez & Martinez, 2011). El uso de los dispositivos FPGA's ( Field programmable Gate Array) se ha venido extendiendo en el desarrollo de aplicaciones de control y adquisición de datos en sistemas digitales, ya que ofrecen la posibilidad de reconfiguración, reduciendo su tamaño y bajo coste en la ingeniería de desarrollo (Molina & Jiménez, 2010), La programación de estos dispositivos se da en paralelo ya que en una sola descripción de circuito, se pueden incluir diferentes módulos que interactúan entre sí simultáneamente sin necesidad de que un proceso finalice para el siguiente pueda realizarse (Romero, et al., 2011).

Los dispositivos FPGA's se basan en arreglos de compuertas, que conforma a la arquitectura del sistema, contenido en tres elementos configurables: bloques lógicos configurables, bloques de entrada y salida, y canales de comunicación. Estos arreglos de compuerta están comunicados mediante alambrados llamados canales de comunicación (Martinez & Alcalá Jara, 2002).

Cuando se manejan bajas concentraciones, la intensidad de fluorescencia, es comúnmente proporcional a la concentración del fluoróforo, proteína, o analito de interés, aunado a esto, es importante considerar la foto descomposición ya que puede disminuir la intensidad de la fluorescencia al paso del tiempo. La dispersión de la luz también es otro factor a tener en cuenta, de los más vistos son la dispersión de Rayleigh y Raman. La luz dispersa por dispersión de Rayleigh tiene la misma longitud de onda que la luz incidente, mientras que en la dispersión Raman la luz cambia a longitudes de onda más largas. La dispersión de Raman es el resultado de un estado electrónico virtual inducido por la luz de excitación. A partir de este estado virtual, las moléculas pueden volver a un nivel vibracional distinto del estado



basal. En los espectros de fluorescencia siempre se observa una diferencia de número de onda constante en relación con la excitación (Li, et al., 2012) .

## **2.5 Hipótesis**

La fluorescencia emitida por la GFP permite estimar la concentración de bacterias modificadas genéticamente mediante un modelo matemático.

## **2.6 Objetivo General**

Desarrollar un sistema cuantificador de fluorescencia que permita correlacionar la cantidad de bacterias *E. coli* modificadas genéticamente a partir de la medición de la fluorescencia emitida por la GFP.

## **2.7 Objetivos Particulares**

- Diseñar un Sistema de medición de fluorescencia.
- Generar datos de fluorescencia medidos en diferentes poblaciones bacterianas con GFP.
- Establecer un modelo de regresión lineal donde se establezca la relación entre la intensidad de la fluorescencia y la concentración de nitratos en diferentes soluciones.

### **3. MATERIALES Y METODOS**

Se describe el diseño del sistema cuantificador de fluorescencia en sus diferentes secciones: desde el diseño del sistema de excitación de fluorescencia, sistema óptico, sistema de detección mediante fotodiodo, sistema de conversión de fotocorriente, etapa de amplificación, sistema de procesamiento, así como la fase experimental.

#### **3.1 Diseño de un Sistema de medición de fluorescencia**

Un sistema cuantificador de fluorescencia (Figura 3-1) es implementado para excitar a la proteína verde fluorescente y detectar el espectro de emisión de la fluorescencia. Este sistema cuenta con una cámara de aislamiento con el propósito de disminuir las interferencias y errores de medición generados por la luz externa, dentro de la cámara se tiene un diodo emisor de luz de color ultra violeta como fuente de excitación así como sus respectivos amplificadores de voltaje, corriente para su correcto funcionamiento, un filtro óptico, un contenedor de muestra, un fotodiodo que recolecta los fotones fluorescentes, un amplificador de transimpedancia para convertir la fotocorriente a una señal de voltaje y un amplificador de voltaje para poder interpretar la señal recolectada que describe a la fluorescencia, misma que fue analizada mediante un osciloscopio.

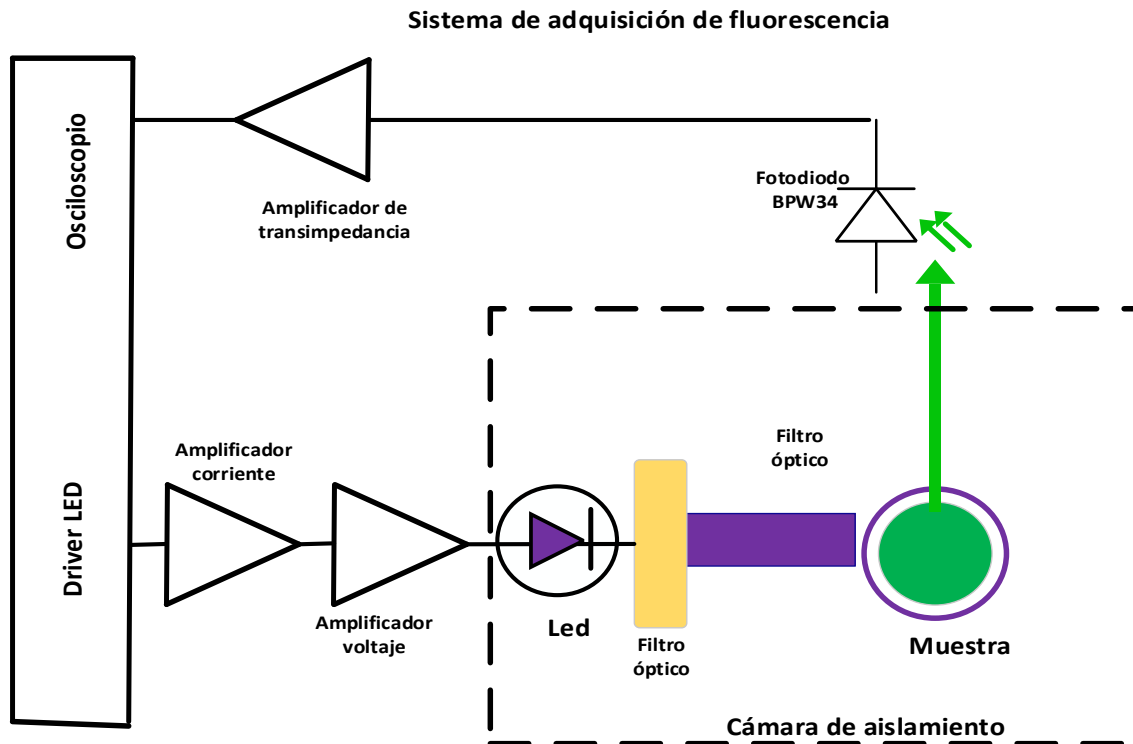


Figura 3-1 Diagrama de bloques del sistema cuantificador de fluorescencia

### 3.1.1 Sistema óptico y de excitación

Se utilizó un led de tipo estrella ( Figura 3-2) que emite luz de color ultravioleta con una composición de Nitruro de Galio con dimensiones de 20 mm de diámetro y 8.5 mm de alto, alimentado con una tensión de entrada de 7 VCD, emitiendo una intensidad luminosa de 250 a 300 milicandelas, con un consumo de corriente de 700 mA y potencia de 5 watts, con longitud de onda de 395 nm y con 140° de ángulo de iluminación con respecto a la horizontal. Con el propósito de incidir directamente sobre la muestra que contiene bacterias *E. coli* con GFP, el diodo led fue colocado de forma que incidiera a 90° hacia la muestra. Después se colocó un filtro de excitación de 395 nm el cual permite únicamente el paso de la luz que se encuentra

en un rango de  $395 \text{ nm}$  con un pico de transmisión del 90%. Formando un ángulo de  $90^\circ$  con respecto al haz de la fuente de excitación, se colocó un filtro óptico de  $525 \text{ nm} \pm 25$  para dejar pasar únicamente los fotones de la luz dispersada por las células fluorescentes.



Figura 3-2 Led ultravioleta de  $395 \text{ nm}$  de 5 watts de potencia utilizado para excitación de fluorescencia

### Modulación del sistema óptico

Mediante el programa de Matlab versión R2014a, se generó una forma de onda cuadrática, periódica y discreta en tiempo, el cual fue implementado en una Look Up Table (del Inglés “tabla de consulta” LUT) descrita en lenguaje HDL para almacenar la serie de valores digitales que describen a la señal cuadrada, esta señal fue transformada mediante un convertidor Analógico – Digital (DAC) MCP4922 (con el propósito de modular la frecuencia de la fuente de excitación mediante una señal cuadrada ), este convertidor Analógico – Digital, está constituido por dos canales con una resolución de 12 bits y con una frecuencia de operación de 20 Mega Hertz (MHZ).

## 14-Pin PDIP, SOIC, TSSOP

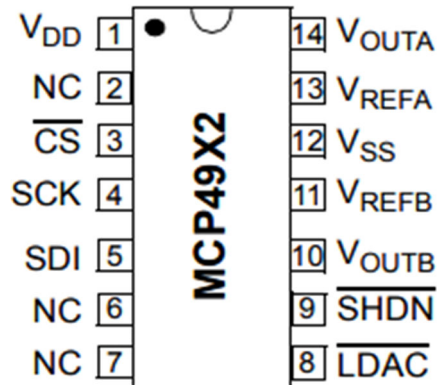


Figura 3-3 Convertidor Analógico Digital- MCP4922

Así mismo, este circuito entrega una señal variable que va desde los 0 volts hasta los 3.3 volts que son equivalentes al valor digital con resolución de 12 bits, y una salida de corriente de 25mA), la configuración propuesta para el convertidor analógico digital, se puede apreciar en la Figura 3-4

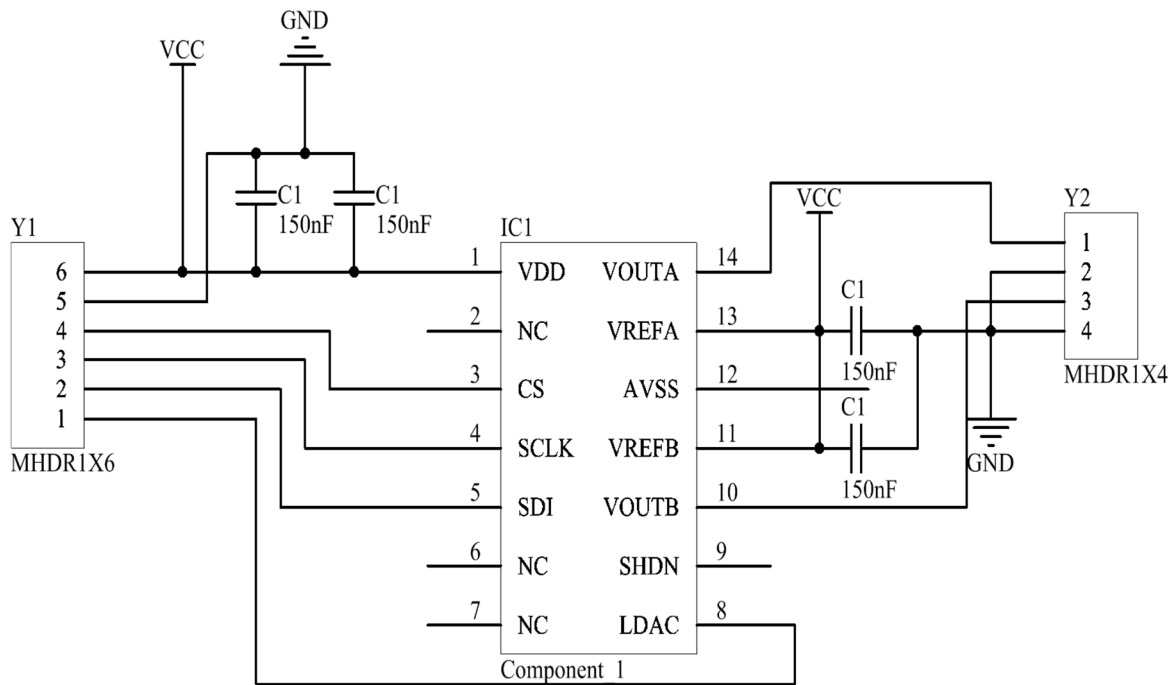


Figura 3-4 Configuración de DAC MCP4922 para modulación de fuente de excitación

Considerando las especificaciones de la señal analógica antes mencionadas, fue necesario utilizar un amplificador operacional TL082CP con una configuración no inversora, el factor de amplificación utilizado fue de 2.12, esto con el propósito de alcanzar los 7 volts de corriente directa (adecuado para el funcionamiento de la fuente de excitación) ya que el Convertidor Digital Analógico que se utilizó proporciona una señal máxima de 3.3 volts, y una salida de corriente de 25 mA, la configuración de este amplificador se puede ver en la figura 3-4,

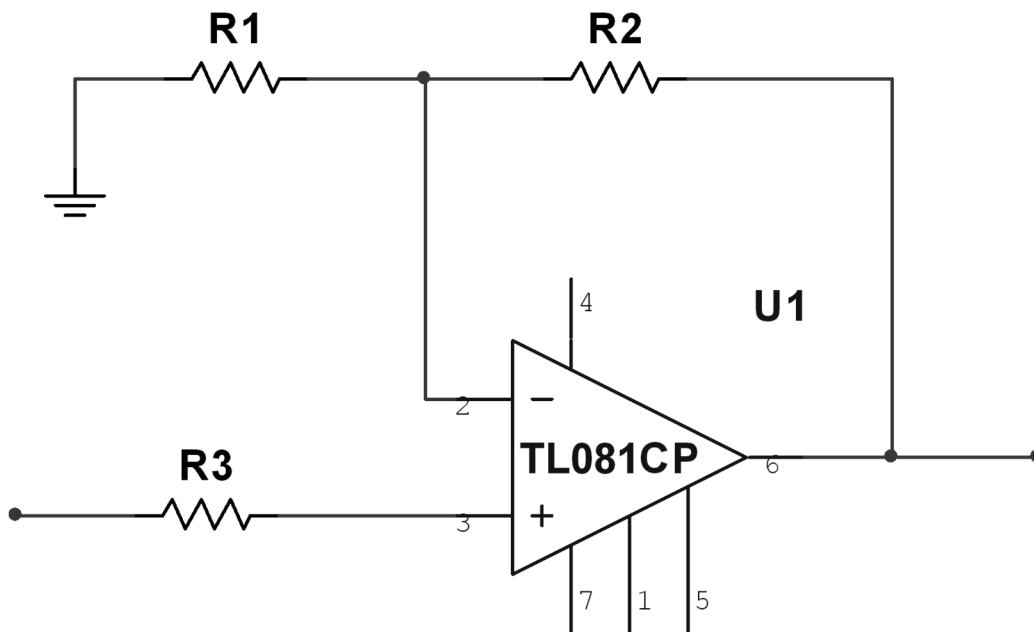


Figura 3-5 Amplificador de voltaje de la fuente de excitación

Como el led utilizado consume 700 mA, fue necesario diseñar una etapa de amplificación de corriente, para ello se utilizó un amplificador en modo colector común mediante un amplificador tipo Darlington MJ11016.

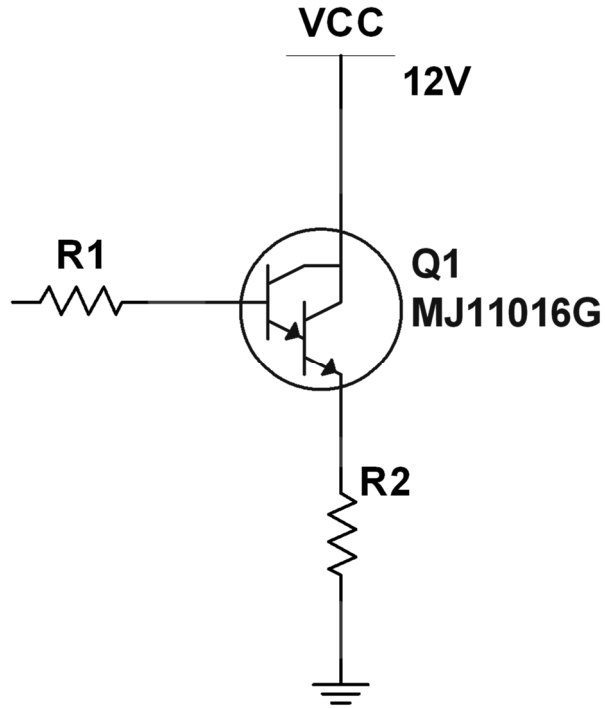


Figura 3-6 Configuración del amplificador de corriente

### 3.1.2 Sistema de detección

Para el sistema de detección se empleó un fotodiodo BPW34 de la compañía Vishay del tipo DIP-2, es un fotodiodo con unión PIN de silicón, fotosensible que se caracteriza por ser de alta velocidad y alta sensibilidad a radiación, viene en un encapsulado plástico traslúcido de visión superior plano. Este fotodiodo tiene una excelente linealidad y baja corriente de oscuridad, cuenta con un área sensible de  $7.5\text{mm}^2$  con un ángulo de sensibilidad del 65%, este fotodiodo cuenta con una responsividad espectral que va desde los 430  $\text{nm}$  a los 1100  $\text{nm}$ , con un pico de sensibilidad en la longitud de onda de 900  $\text{nm}$ .

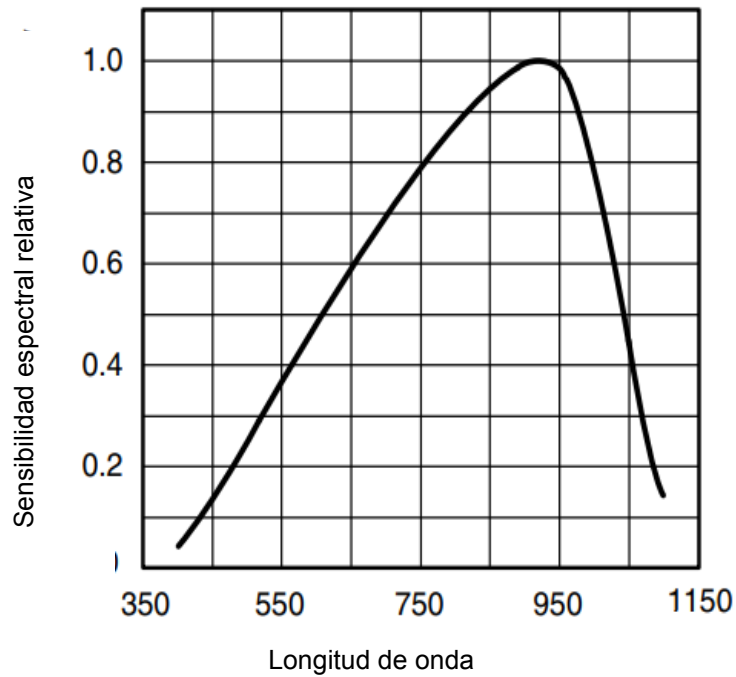


Figura 3-7 Responsividad espectral del Fotodiodo BPW34

El fotodiodo convierte la cantidad de fotones recibidos provenientes de la fluorescencia a un número correspondiente de foto electrones. Estos fotoelectrones son desplazados a una banda de conducción donde se genera una fuerza electromotriz que a su vez generando una foto-corriente. Para convertir la foto-corriente a una señal de voltaje, se configuro el fotodiodo para ser utilizado en modo fotovoltaico mediante la configuración de un amplificador de transimpedancia ya que se requiere de precisión, linealidad, bajo nivel de ruido y baja corriente de oscuridad. La corriente generada por el fotodiodo es amplificada mediante un amplificador de transimpedancia, esta corriente es convertida en una tensión de salida mediante la resistencia de ganancia de transimpedancia (Resistencia de realimentación  $R_F$ ) de  $1 M\Omega$  (Figura 3-8).



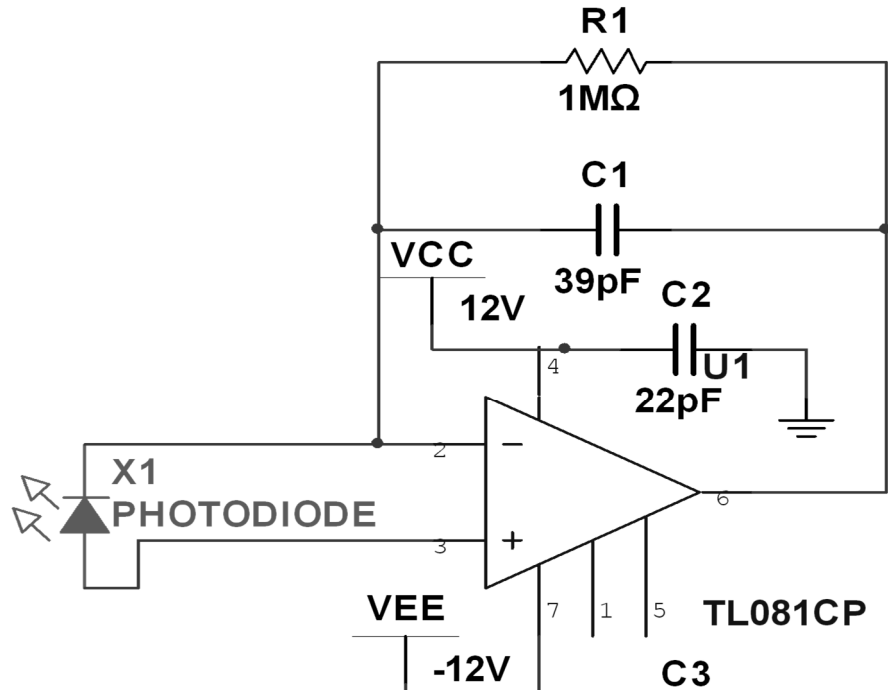


Figura 3-8 Configuración del amplificador de transimpedancia que convierte la fotocorriente en un voltaje de salida.

El circuito electrónico para la amplificación del detector se muestra en la Figura 3-9, para ello se utilizó un amplificador operacional TL081 tipo dial FET, para poder amplificar la señal, así mismo, se colocó un potenciómetro con la intención de regular el offset y reducir el diferencial de voltaje que se encuentra entre las dos entradas del amplificador resultado una señal invertida con una ganancia de 100 x, después se utilizó un Amplificador operacional TL082- dual Bifet para invertir la señal de salida con ganancia 1 con el propósito de tener una señal positiva, a medida que incrementa la incidencia de fotones fluorescentes, incrementa la señal de salida del fotodiodo de forma lineal.

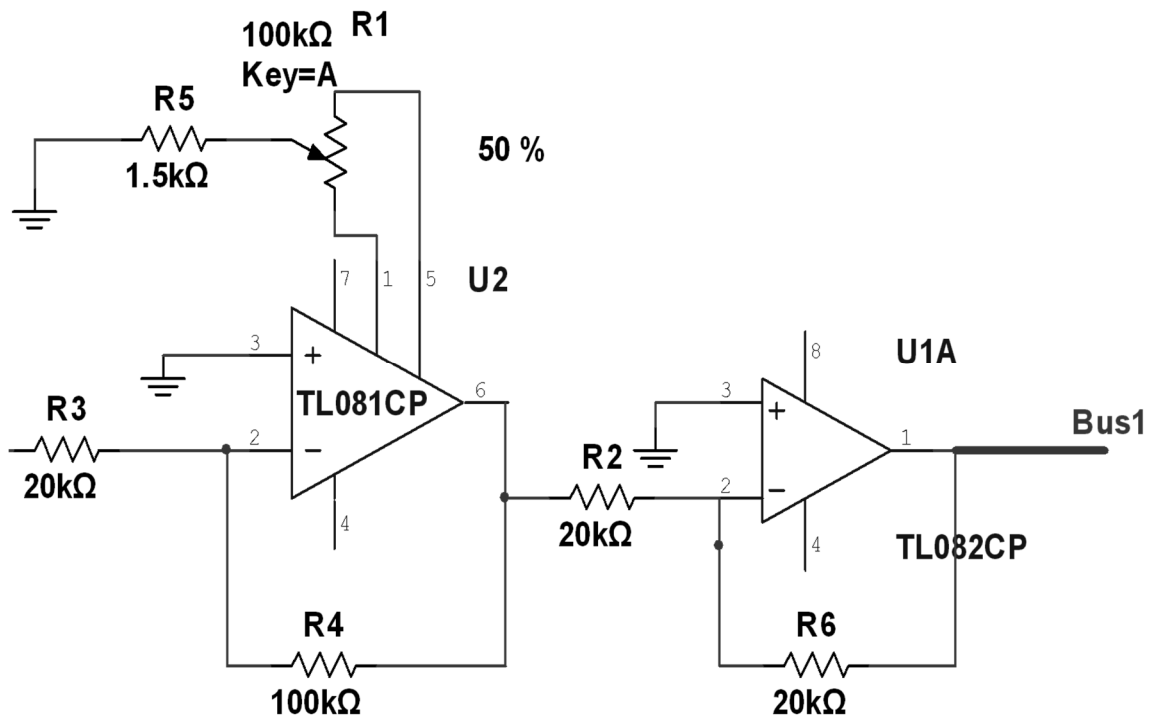


Figura 3-9 Configuración de amplificadores operacionales, TL081 amplifica e invierte la señal, mientras que el TL082 únicamente invierte la señal.

La construcción del sistema cuantificador de fluorescencia consistió de dos fases, la primera fase fue probada en una tablilla de pruebas como verificación previa antes de realizar una impresión del circuito. Los componentes fueron conectados de acuerdo a los esquemáticos mostrados anteriormente. La fase dos fue construida mediante varias placas de circuito impreso (Placa del sistema de detección de fluorescencia donde integra el amplificador de transimpedancia y amplificador de voltaje, Placa del sistema de excitación de fluorescencia donde integra el circuito amplificador de voltaje y corriente para el led de potencia) con el propósito de eliminar la mayor cantidad de cables y lograr una reducción de ruido ya que estas pueden alterar a las mediciones.

Se realizó el diseño del prototipo de la cámara de aislamiento mediante un diseño en sketchup llevándolo a impresión 3D utilizando material PLA, los diseños consistieron en tres piezas, la primera fue una carrera de desplazamiento lineal como se muestra en la Figura 3-10 El cual permite ajustar la altura del fotodiodo.

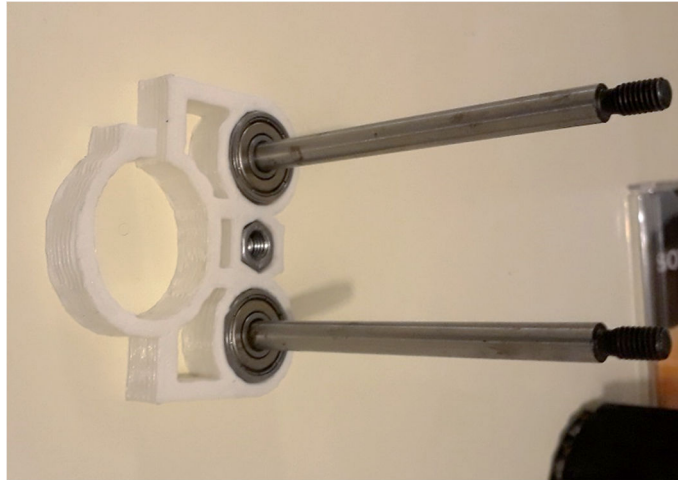


Figura 3-10 Impresión 3D, desplazamiento lineal del fotodiodo

La base del sistema fue construido de tal forma que permitiera centrar la muestra, y poder analizar la fluorescencia de forma uniforme, donde una caja Petri de 60 x15 mm puede ser colocada .

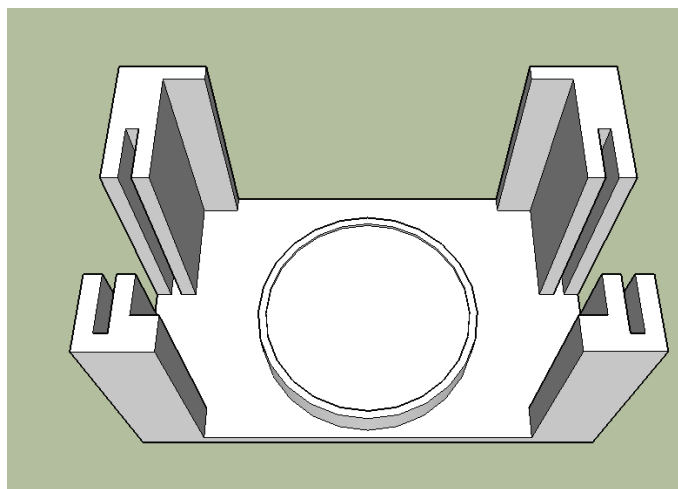


Figura 3-11 Base del sistema cuantificador de fluorescencia donde se coloca la muestra a analizar

Finalmente se construyó un soporte donde se desplazará la carrera de desplazamiento lineal donde el fotodiodo recorrerá una distancia de 10 cm, con el fin de ajustar la altura en donde se encuentre una mejor lectura de la fluorescencia Figura 3-12.

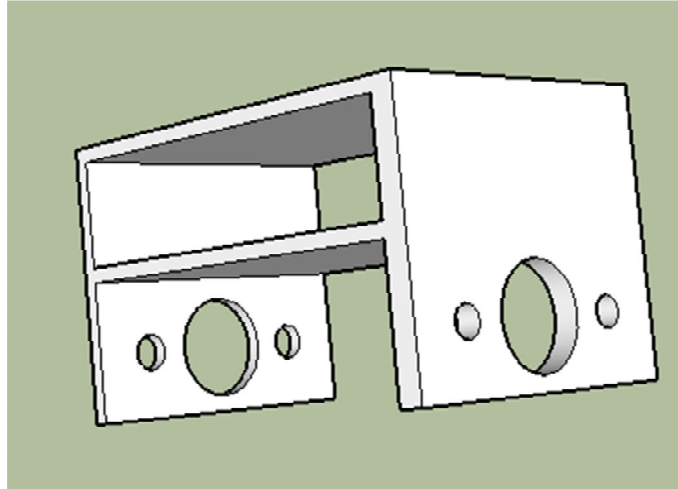


Figura 3-12 Soporte donde se desplaza el fotodiodo a lo largo del eje z

Posteriormente, las piezas se pintaron en color negro, y finalmente se realizó el ensamble Figura 3-13.

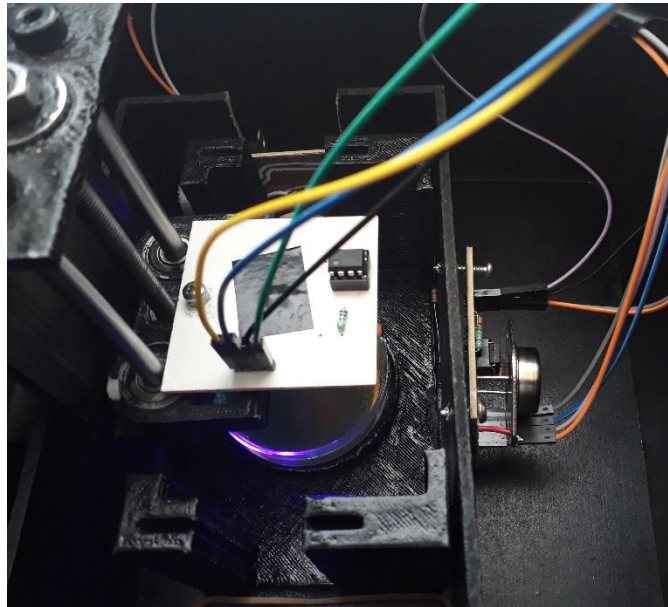


Figura 3-13 Ensamble final del sistema cuantificador de fluorescencia

3.2 Generación de datos de fluorescencia medidos en diferentes poblaciones bacterianas con GFP.

3.3 Lógica programable del sistema cuantificador de fluorescencia

El proceso de modulación de la fuente de excitación y medición de la fluorescencia, fue implementada digitalmente en vhdl mediante tecnología FPGA haciendo uso de la tarjeta de desarrollo Spartan-3E Starter Board.

3.3.1 Extracción de ADN plasmídico.

Se utilizaron bacterias *E. coli* TOP 10 ya transformadas con el plásmido ptracer sv40 (realizado de acuerdo al protocolo descrito en el manual del fabricante - Cloning into pTracer™-SV40), se extrajo ADN plasmídico para corroborar que el plásmido se encontrara dentro de la bacteria *E. coli* TOP10 (Figura 3-14).

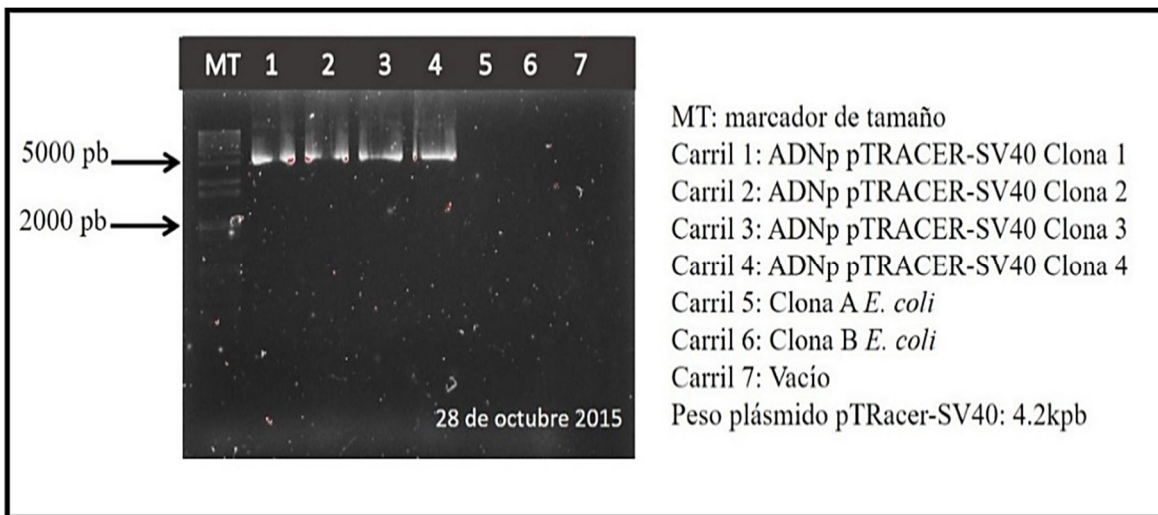


Figura 3-14 Extracción de ADN plasmídico

### 3.3.2 Crecimiento bacteriano en medio LB solido + ZEONINA

Las células transformadas con pTracer SV40 se cultivaron en medio LB con Zeonina, antibiótico. Sin embargo, esto es sensible a la sal, por lo que el medio debe ser bajo en sales, de acuerdo al protocolo bajamos la concentración de sal de 10g a 5g, y se ajustó el pH a 7.5 con NaOH1N, ya que la zeonina es sensible a pH 7.0. Después, se esterilizó en autoclave, posteriormente utilizando la campana de extracción sin luz prendida, se agregó la Zeonina a una concentración final de 25 µg/mL, las muestras se protegieron con aluminio puesto que La zeonina es fotosensible.

Teniendo el medio con el antibiótico, se vaciaron en cajas Petri 20-30 mL y se dejó solidificar, se sembraron las clonas transformadas, se taparon las cajas con aluminio, se etiquetaron y se incubaron a 37 °C.

### 3.3.3 Crecimiento bacteriano en medio liquido + ZEONINA

Se preparó el medio liquido LB de acuerdo a las indicaciones del fabricante (20 g /L), se ajustó el pH a 7.5, se esterilizo en autoclave, después se vaciaron 5 mL de medio en un tubo cónico de 15 mL y se le agrego antibiótico - zeonina a una concentración final de 25 µg/mL. Se tomó la clona a crecer, y se dejó caer este en el medio, se incubo a 37°C durante 16 horas.

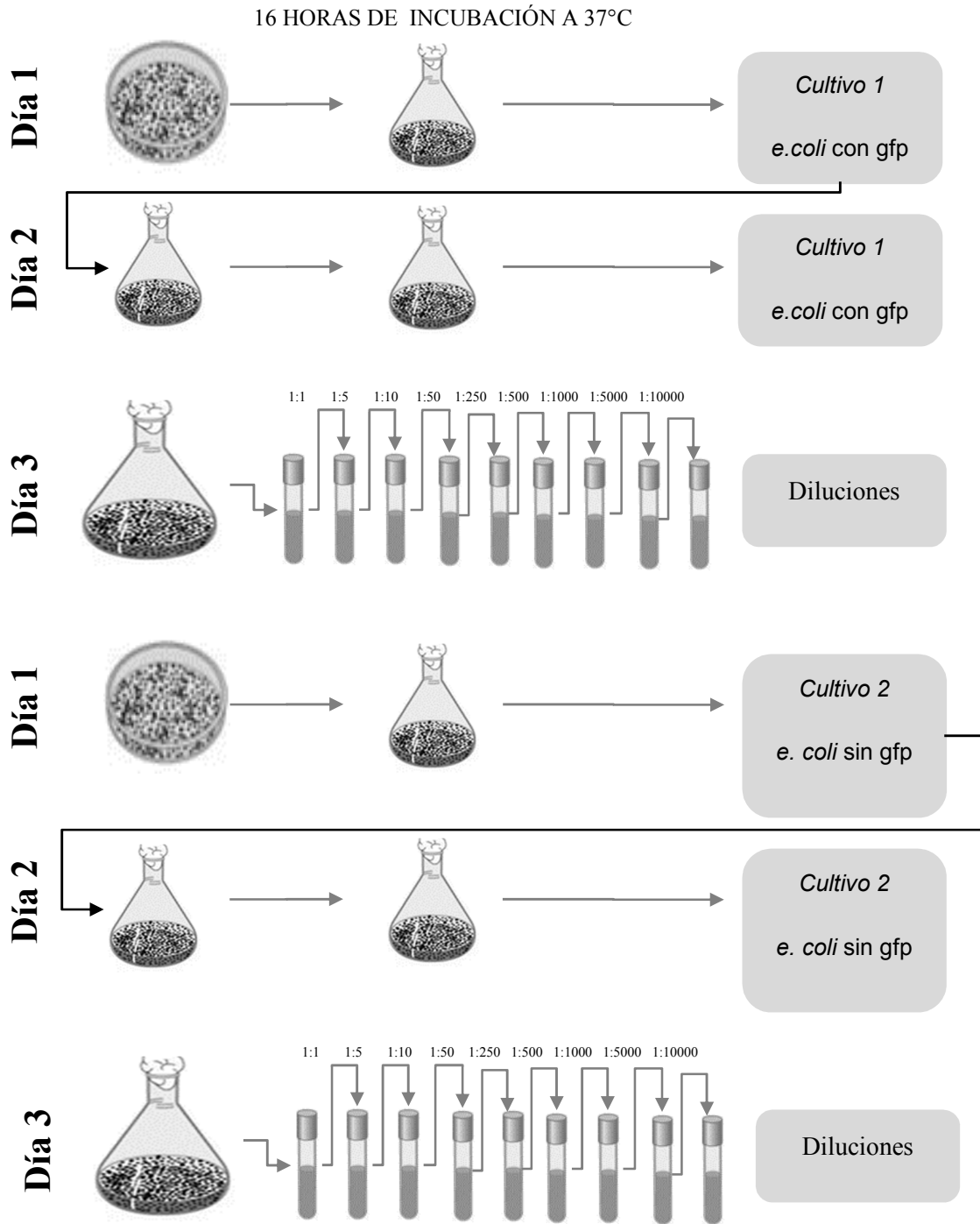


Figura 3-15 Siembra de cultivo bacteriano con gfp y sin gfp, así como sus diluciones para ser analizadas.

#### 4. RESULTADOS

Para realizar las pruebas de funcionamiento del sistema cuantificador de fluorescencia fue necesario elaborar un calendario de siembra. En el día uno se realizó la siembra madre de dos cultivos bacterianos (C1: *e. coli* con GFP y C2: *e. coli* sin GFP) en dos matraces de 200 ml con el propósito de mantener a las bacterias activas y sin problemas de crecimiento, en el día dos se realizó nuevamente la siembra de ambos cultivos en dos matraces de 200 ml, mismas que se utilizaron para realizar el experimento, en el día tres se realizaron nueve diluciones del cultivo con GFP (D-GFP) y nueve diluciones del cultivo sin GFP (D-NGFP) (Figura 3-15) con dos repeticiones ( R1, R2).

Con el sistema cuantificador de fluorescencia realizado, se procedió a realizar las mediciones correspondientes a la emisión de fluorescencia en bacterias con GFP y sin GFP obteniendo un promedio de cada dilución, para ello, cada muestra fue excita con cuatro frecuencias distintas como se puede apreciar en el cuadro 4-1 y cuadro 4-2 obteniendo una señal de voltaje como indicador de la cantidad de fluorescencia emitida.

Cuadro 4-1 Mediciones de emisión de fluorescencia realizadas en cultivo bacteriano *e.coli* con GFP con cuatro frecuencias de excitación distintas.

Concentración	Diluciones	60 HZ			1 KHZ			2 KHZ			10 KHZ		
		R 1	R 2	Promedio	R 1	R 2	Promedio	R1	R2	Promedio	R1	R2	Promedio
9	1:1	4.88	4.8	4.84	4.88	4.88	4.88	4.56	4.56	4.56	1.36	1.16	1.26
8	1:5	5.62	4.72	5.17	4.72	4.96	4.84	4.8	4.72	4.76	1.6	1.6	1.6
7	1:10	5.92	5.92	5.92	5.92	5.84	5.88	5.84	5.84	5.84	1.92	1.84	1.88
6	1:50	6	6	6	6	6	6	6	6	6	1.44	1.44	1.44
5	1:250	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.4	5.4	5.4	1.4	1.4	1.4
4	1:500	5	4.88	4.94	4.88	4.8	4.84	4.64	4.72	4.68	1.36	1.28	1.32
3	1:1000	4.88	4.88	4.88	4.88	4.96	4.92	4.88	4.88	4.88	0.8	1.84	1.32
2	1:5000	3.24	3.16	3.2	3.16	3.11	3.135	3.08	2.96	3.02	1.08	1	1.04
1	1:10000	3.08	3.16	3.12	3.16	3.08	3.12	3.08	3.08	3.08	0.76	0.72	0.74



Cuadro 4-2 Mediciones de emisión de fluorescencia realizadas en cultivo bacteriano e.coli sin GFP con cuatro frecuencias de excitación distintas.

Concentración	Diluciones	60 HZ			1 KHZ			2 KHZ			10 KHZ		
		R 1	R 2	Promedio	R 1	R 2	Promedio	R 1	R 2	Promedio	R 1	R 2	Promedio
9	1:1	3.28	3.29	3.285	3.22	3.24	3.23	3.28	3.28	3.28	0.96	0.88	0.92
8	1:5	3.4	3.56	3.48	3.8	3.6	3.7	3.8	3.56	3.68	1.28	1.36	1.32
7	1:10	3.52	3.32	3.42	3.36	3.52	3.44	3.52	3.32	3.42	1.12	1.12	1.12
6	1:50	3.2	3.28	3.24	3.28	3.16	3.22	3.16	3	3.08	1.16	1.12	2.09
5	1:250	2.92	2.92	2.92	3.08	3	3.04	3.08	2.92	3	1.16	1.04	2.03
4	1:500	2.92	2.76	2.84	2.96	2.72	2.84	2.8	2.76	2.78	1.08	0.96	1.895
3	1:1000	2.68	2.52	2.6	2.72	2.6	2.66	2.56	2.64	2.6			2.62
2	1:5000	2.44	2.36	2.4	2.44	2.32	2.38	2.4	2.32	2.36			2.34
1	1:10000	2.32	2.32	2.32	2.36	2.28	2.32	2.32	2.2	2.26			2.23

Para validar las mediciones obtenidas con el sistema cuantificador de fluorescencia, fue necesario compararlas con la absorbancia de cada muestra de cultivo bacteriano utilizando un espectrofotómetro configurando la fuente de excitación a 600 nm, en el cuadro 4-3 se pueden observar los valores de absorbancia para el cultivo bacteriano con GFP sin presentar absorbancia a partir de la dilución de 1:1000 y en cuadro 4-4 se pueden observar los valores de absorbancia para el cultivo bacteriano sin GFP sin presentar absorbancia a partir de la dilución 1:250.

Cuadro 4-3 Absorbancia en cultivo bacteriano e. coli con GFP

Concentración	Diluciones	Replica 1	Replica 2	Promedio
9	1:1	1	1	1.2145
8	1:5	0.304	0.304	0.3040
7	1:10	0.155	0.154	0.1545
6	1:50	0.066	0.066	0.0660
5	1:250	0.002	0.005	0.0035
4	1:500	0.001	0.001	0.0010
3	1:1000	0	0	0.0000
2	1:5000	0	0	0.0000
1	1:10000	0	0	0.0000

Cuadro 4-4 Absorbancia en cultivo bacteriano e. coli sin GFP.

Concentración	Diluciones	Replica 1	Replica 2	Promedio
9	1:1	0.265	0.25	0.2575
8	1:5	0.051	0.049	0.05
7	1:10	0.025	0.024	0.0245
6	1:50	0.004	0.004	0.004
5	1:250	0	0	0
4	1:500	0	0	0
3	1:1000	0	0	0
2	1:5000	0	0	0
1	1:10000	0	0	0

Los datos de absorción recolectados en las muestras de cultivo bacteriano con GFP, fueron promediados y representados gráficamente en la Figura 4-2. Los datos de absorción recolectados en las muestras de cultivo bacteriano sin GFP, fueron promediados y representados gráficamente en la Figura 4-1.

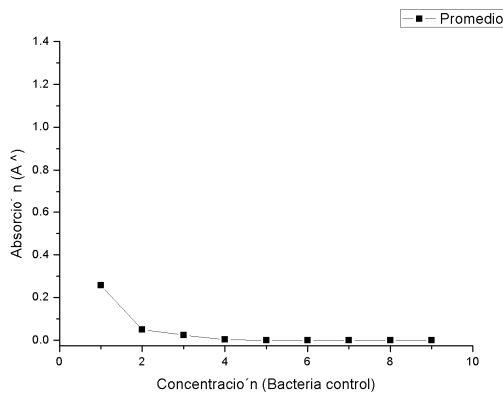


Figura 4-1 Absorbancia en bacterias sin GFP

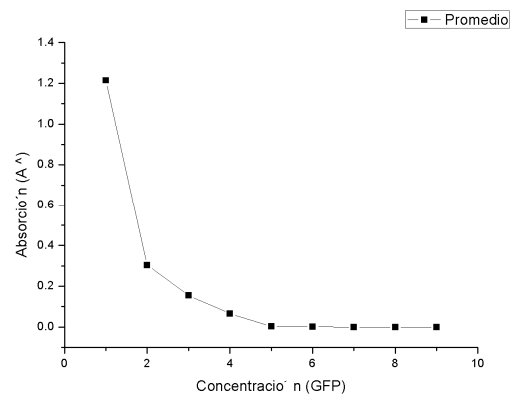


Figura 4-2 Absorbancia en bacterias con GFP

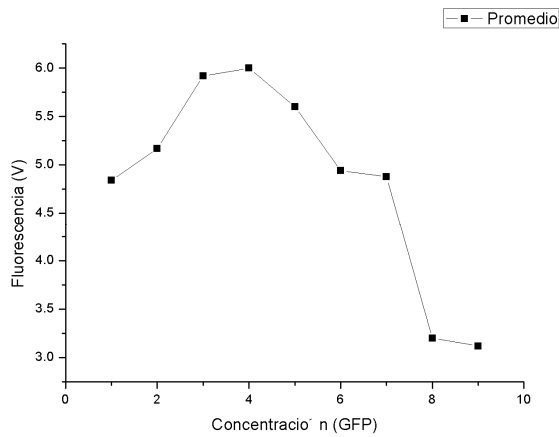


Figura 4-4 Fluorescencia medida en voltaje con modulación con onda cuadrada a 60 HZ

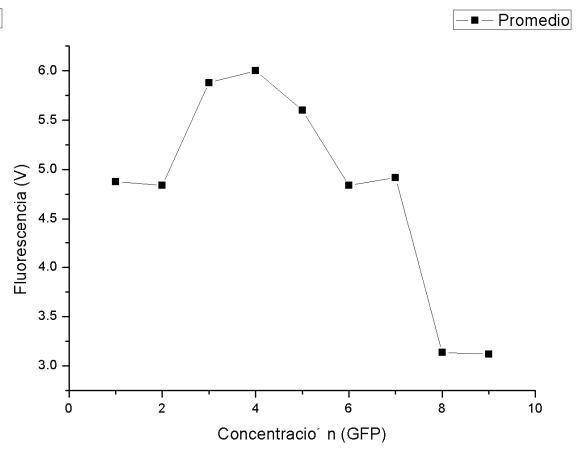


Figura 4-3 Fluorescencia medida en voltaje con modulación con onda cuadrada a 1 khz

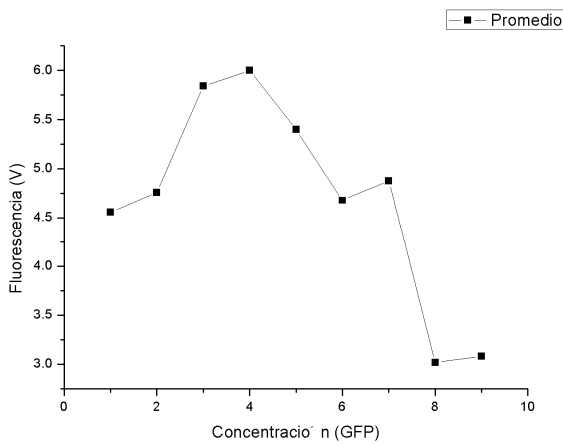


Figura 4-6 Fluorescencia medida en voltaje con modulación con onda cuadrada a 2 khz

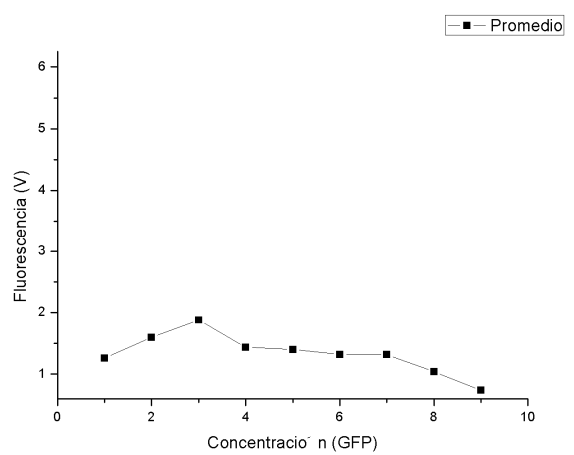


Figura 4-5 Fluorescencia medida en voltaje con modulación con onda cuadrada a 10khz

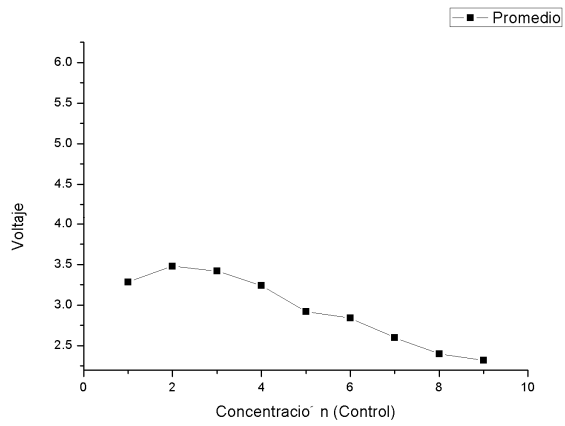


Figura 4-8 Voltaje medido con modulación con onda cuadrada a 60 HZ

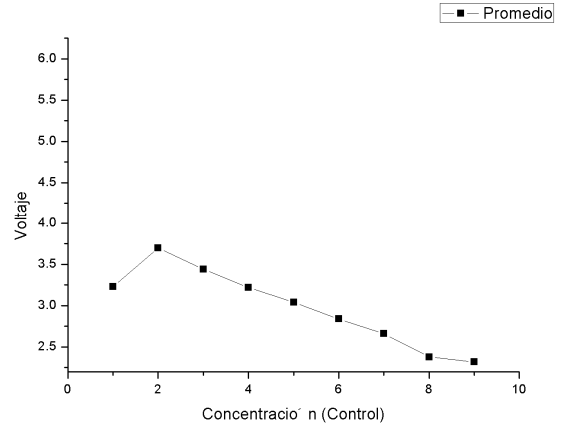


Figura 4-7 Voltaje medido con modulación con onda cuadrada a 1 KHZ

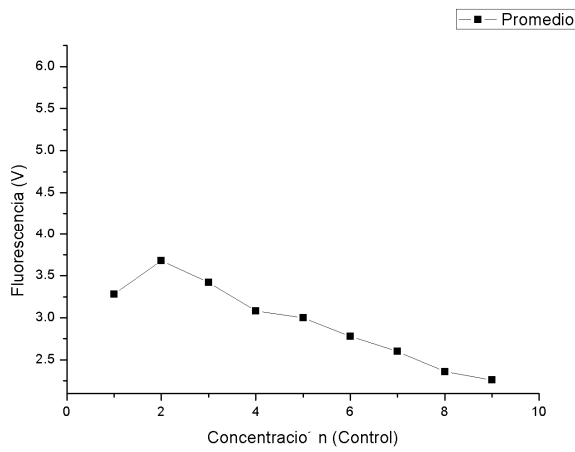


Figura 4-10 Voltaje medido con modulación con onda cuadrada a 2 KHZ

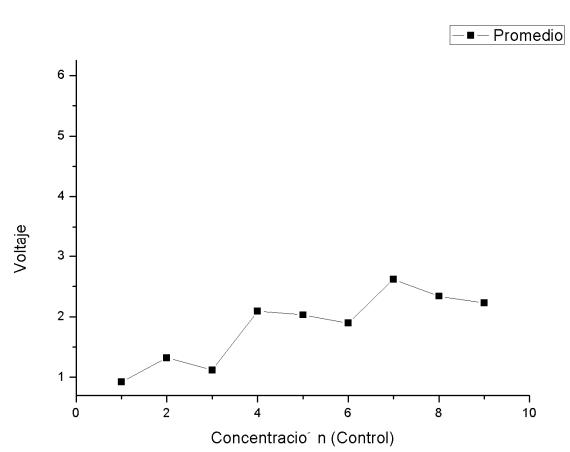


Figura 4-9 Voltaje medido con modulación con onda cuadrada a 10 KHZ

Los tres primeros datos medidos de cada corrida experimental, presentan un incremento en cuanto a la emisión de fluorescencia, llegando a un pico máximo, posteriormente este empieza a decaer hasta finalizar la toma de muestras, se realizó un análisis de regresión lineal simple descartando los primeros tres datos de cada gráfico, se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.89 para el sistema cuantificador de fluorescencia midiendo la fluorescencia en bacterias con GFP a 60 HZ (Figura 4-12), y un coeficiente de determinación de 0.96 en bacterias que no tienen la GFP a 60 HZ (Figura 4-11), estos resultados podrían reflejar que el sistema no está funcionando como se espera, sin embargo, los datos se pueden graficar de tal forma que se asemeja a una curva de crecimiento logístico.

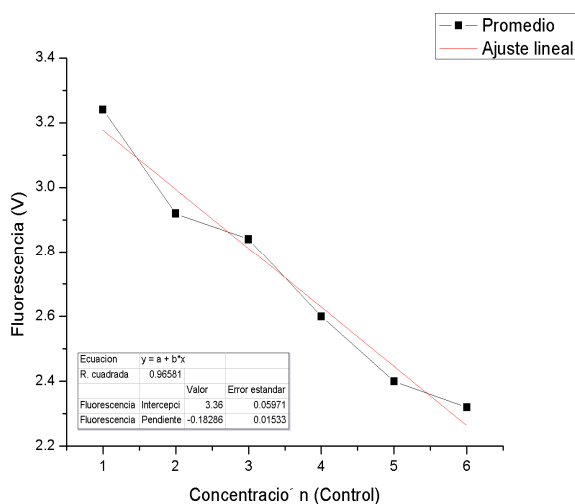


Figura 4-11 Análisis de regresión lineal en bacterias sin GFP

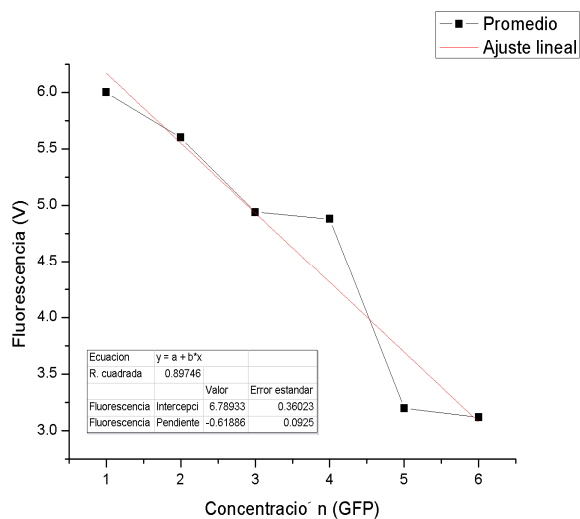


Figura 4-12 Análisis de regresión lineal en bacterias con GFP

En la Figura 4-13, se puede apreciar que el crecimiento de la fluorescencia va en incremento desde que la muestra se encuentra concentrada en una dilución de 1: 10000 presentando su fase demorada (Fase Lag.) hasta la dilución 1:5000, la fase logarítmica (Fase Log.) o crecimiento exponencial se presenta desde la

dilución 1:1000 hasta la dilución 1:250 llegando a su fase de equilibrio (Estacionaria) en la dilución 1:50, llegando a la fase de decremento en las últimas tres mediciones realizadas (1:10, 1:5, 1:1), así mismo, las bacterias control que no cuentan con la GFP y que fueron excitadas con luz ultra violeta, no presentan este aumento de fluorescencia en ninguna frecuencia modulada como las presentan las bacterias con GFP, sin embargo también presentan un pequeño decremento en los últimos tres datos medidos, llegando a su pico máximo en la dilución 1:250, aun así, es posible apreciar que la fluorescencia se puede distinguir claramente en las bacterias que contienen a la proteína verde fluorescente, reflejándose en la intensidad de la fluorescencia medida.

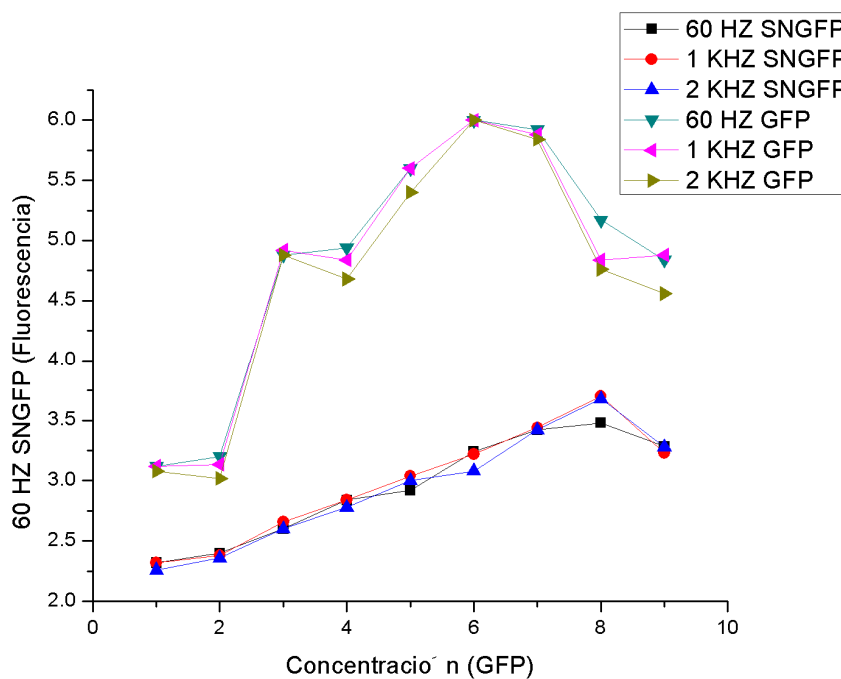


Figura 4-13 Curva de crecimiento logístico

Las diluciones realizadas desde 1:1 hasta 1:10000, también fueron analizadas con un espectrofotómetro para medir la absorbancia de acuerdo a la concentración bacteriana para verificar que el sistema cuantificador de fluorescencia diseñado también cuenta con el mismo comportamiento que el espectrofotómetro (Figura 4-14).

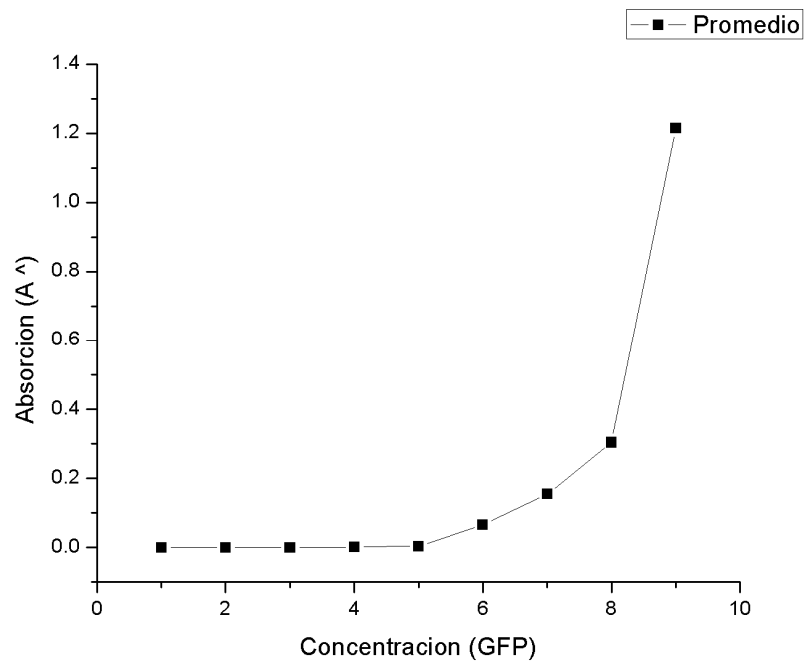


Figura 4-14 Absorción que presentan las bacterias con gfp medida con espectrofotómetro

En la figura 4-13 se puede apreciar que las concentraciones de las bacterias sin GFP, excitadas con modulación a 60 HZ, 1 KHZ, y 2 KHZ, se encuentran por debajo de los 3.5 volts como medida referencial para cuantificar la fluorescencia, esto se consideró como una concentración de saturación dada por el medio y parte de la absorción por parte de las bacterias, estableciéndolo como la desviación de cero (offset) , valor típico de la e la variable de salida (fluorescencia) en el caso de

nuestro sistema cuando la variable de entrada es nula. Finalmente se establecieron los 3.5 volts como punto de referencia para definir el offset.

Los datos fueron analizados mediante una función logística de crecimiento de tipo sigmoideal para cada frecuencia de excitación en bacterias con GFP, para poder interpretarlo con este modelo de crecimiento logístico donde la tendencia de la gráfica no alcanza su potencial de crecimiento adoptando una forma sigmoideal, fue necesario eliminar las dos primeras diluciones 1:1 y 1:5, así como las dos últimas diluciones (1:10000 y 1:5000) que se encuentran fuera del rango considerado como offset. Posteriormente se obtuvo el ajuste logístico obteniendo un coeficiente de determinación de 0.98 (Figura 4-15) para las bacterias excitadas a 60 hz .

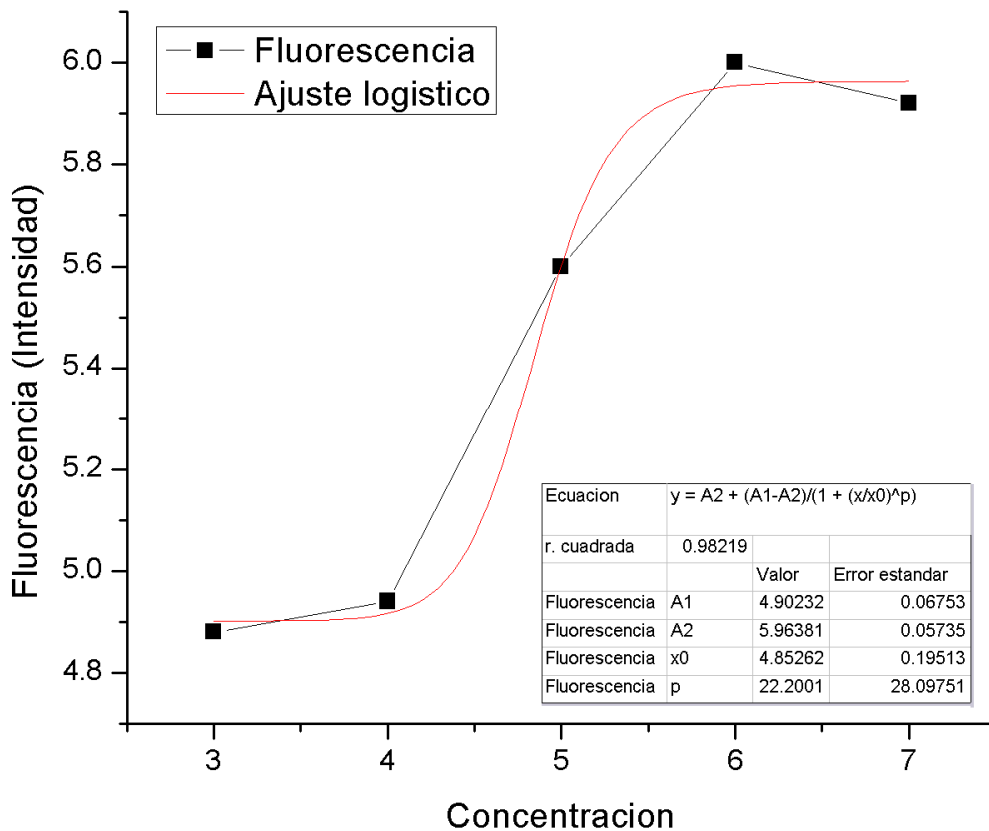


Figura 4-15 Ajuste del modelo logístico propuesto para bacterias excitadas a 60 hz



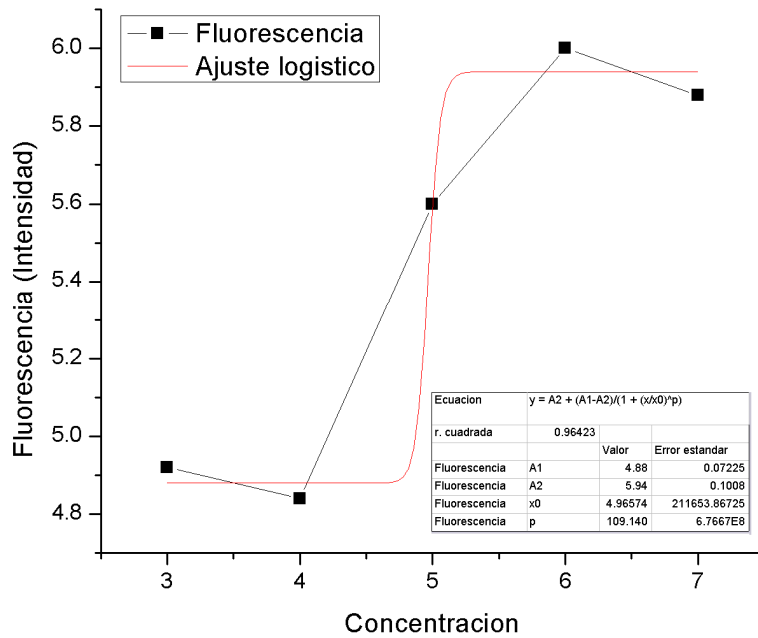


Figura 4-16 Ajuste del modelo logístico propuesto para bacterias excitadas a 1 khz

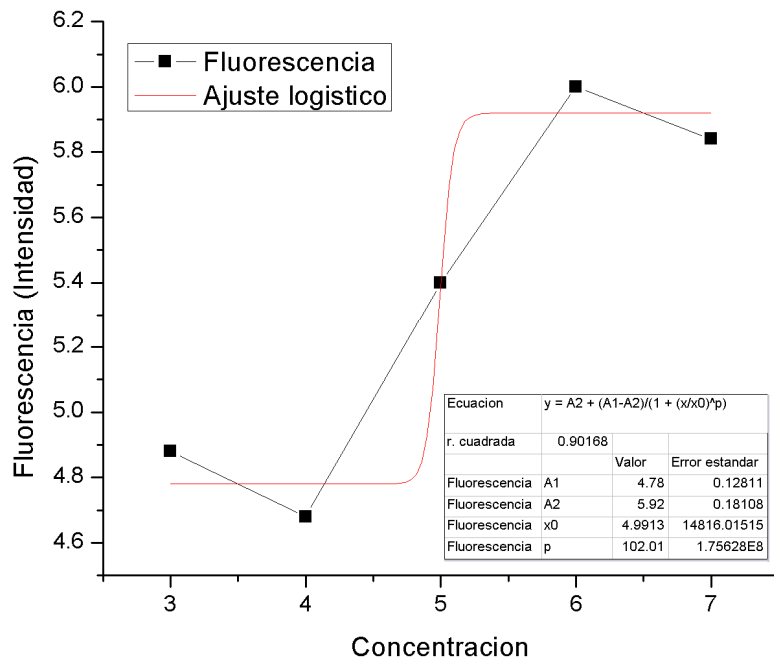


Figura 4-17 Ajuste del modelo logístico propuesto para bacterias excitadas a 2 khz

Así mismo se obtuvo el ajuste logístico obteniendo un coeficiente de determinación de 0.96 para las bacterias excitadas a 1 khz (Figura 4-15) y 0.90 para las bacterias excitadas a 2 khz.

Bajo estos resultados, se puede apreciar un mejor ajuste logístico cuando se excita a 60 hz con un coeficiente de determinación de 0.98, y es posible realizar la detección de la fluorescencia, desde concentraciones bajas (dilución de 1:10) hasta concentraciones altas (dilución de 1:1000).

## 5. CONCLUSIONES

Mediante las pruebas realizadas se presenta un sistema cuantificador de fluorescencia confiable que permite el desarrollo de biosensores bacterianos a partir de bacterias genéticamente modificadas, a través del uso de tecnología led de luz ultra violeta, logrando una fuente de excitación modulada. Como resultado se obtiene un instrumento que permite dar pauta al desarrollo de biosensores bacterianos, mediante instrumentación de bajo costo,

Como posibilidades de desarrollo se tiene infinidad de biosensores bacterianos que permitan realizar mediciones de nitratos en plantas a través de biosensores bacterianos que emitan fluorescencia en respuesta a la cantidad de nitratos asimilados por la bacteria, de ser así, es posible desarrollar biosensores bacterianos que puedan medir cualquier tipo de macronutriente que se encuentre disponible en el suelo, planta o solución nutritiva.

Para tener una mejor caracterización de este sistema cuantificador de fluorescencia, es necesario realizar más diluciones dentro del rango de 1:10 a 1:1000, con el propósito de ver la sensibilidad del mismo, también es importante realizar un análisis en las diluciones de 1:1 a 1:5 para ver el comportamiento de la detección la fluorescencia en este rango, ya que existe una detección de fluorescencia inferior al que se presenta en las diluciones de 1:10 a 1:50 decayendo en la dilución de 1 :250, así mismo sería interesante saber qué pasaría si se modula la fuente de excitación no solo con una forma de onda cuadrada, si no con una forma de onda sinusoidal, diente de sierra, triangular, entre otros.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Alicia, Franco & Marinés, L., 2009. Aplicaciones de la proteína verde fluorescente (GFP) en la biología celular y en la visualización del sistema nervioso. *Redalyc*, 1(2), pp. 84-96.

amersham, p. b., 2000. *Fluorescence Imagin - principles and methods*. [En línea] Available at: [www.apbiotech.com](http://www.apbiotech.com)

[Último acceso: 15 07 2015].

Amy, C. V. & Tina K., V. D., 2004. Stress responsive bacteria: Biosensors as environmental Monitors. *Elsevier. Advances in microbial physiology*, Volumen 49, pp. 133-163.

Barrios, M., Garcia, J. & Basso, C., 2012. Efecto de la fertilizacion nitrogenada sobre el contenido de nitrato y amonio en el suelo y la planta de Maíz. *Bioagro*, 23(3), pp. 213-220.

Becker, W., 2012. Fluorescence lifetime imaging – techniques and applications. *Journal of Microscopy*, Volumen 30, pp. 119-136.

Boudsocq, S. y otros, 2012. Plant preference for ammonium versus nitrate: A neglected determinant of ecosystem functioning?. *The american naturalist*, 180(1).

Bren, A. y otros, 2013. The last generation of bacterial growth in limiting nutrient. *BMC- systems biology*, 7(27), pp. 1-9.

Burdette & Cardon, 2008. Report as of FY2008 for 2007CT130B: "Development of a new generation of sensitive, fluorescence-based nitrate sensors for use in soil and water. *Project 2007CT130B*.

Chang-Hun, L., 2009. Experimental note: Recombinant Green Fluorescent Protein Derivatives as a Fusion Tag for in vitro Experiments. *ibc*, Volumen 10, pp. 40-51.

Cohen, J. & C. P., 1983. Applied multiple regression/correlation analysis for the behavioral sciences.. *Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates, Inc.* .

- Contreras - Medina, L. M., 2012. Procesamiento de imágenes con FPGA para el modelado cuantitativo del síndrome del virus mosaico del pepino en *Cucumis sativus*. *Universidad Autonoma de Querétaro*, pp. 1-76.
- Cuevas, S. M. A., 2010. Diseño de un Sistema de Procesamiento para Correlación y Espectrometría en Radioastronomía, Basado en ASIC y FPGA. *Universidad de Chile, facultad de ciencias físicas y matemáticas*, pp. 1-115.
- Dagnino, S. J., 2014. Correlación. *Chil Anest*, 14(43), pp. 150-153.
- Donald, G. B., 2009. *Biosensors: theory and applications*. s.l.:s.n.
- Donna, E. C., Yao-Ming, H. & Derek, J. P., 2013. GFP-Based Biosensors. *Intech*.
- Douglas, A. S., Holler, F. J. & Clouch, S. R., 2008. *Principios de analisis instrumental*. Sexta edición ed. México: Cengage Learning.
- Grande, R. R., 2010. Diseño y construcción de un sensor de permeabilidad de Oxígeno en membranas mediante fluorescencia. *Universidad Carlos III de Madrid*.
- Ishikawa-Ankerhold, H. C., Ankerhold, R. & Drummen, G. P. C., 2012. Advanced Fluorescence Microscopy Techniques—FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *molecules*, 17(4), pp. 4047-4132.
- Jin-Min, T. y otros, 2014. The blue fluorescent protein from *Vibrio vulnificus* CKM-1 is a useful reporter for plant research. *Springer Botanical studies*, pp. 55-79.
- Kraiser, T. y otros, 2011. A holistic view of nitrogen acquisition in plants. *Journal of Experimental Botany*, Volumen 62, pp. 1455-1466.
- Lakowicz, J. R., 2006. Principles of Fluorescence Spectroscopy. En: *Introduction to Fluorescence*. 3 ed edición ed. s.l.:Springer US, pp. 1-26.
- Li, Z. S. M. I. y otros, 2012. A Time-Resolved CMOS Image Sensor With Draining-Only Modulation Pixels for Fluorescence Lifetime Imaging. *IEEE- Transactions on electron devices*, 59(10), pp. 2715-2722.

Llorente, M. & Horta, A., 1991. *Técnicas de caracterización de polímeros*. Madrid: UNED.

Martinez, D. G. & Alcalá Jara, J., 2002. *El arte de programar sistemas digitales*. Primera edición ed. Mexico: Compañía editorial continental.

Martínez, T. J. & Martínez, G., 2011. *Lógica Reconfigurable en Redes de Sensores Inalámbricos*. España: Editorial Academica Española.

Mira, D., Llorente, R., Maquieira, Á. & Martí, J., s.f. Análisis óptico de micro matrices de fluorescencia sobre soporte de grabación digital convencionales. 1(1), pp. 1-4.

Molina, M. J. M. & Jiménez, B. M., 2010. *Programación gráfica para ingenieros*. Barcelona: Barcombo.

Pavoni, J. F., Neves-Junior, W. F. P., Spiropulos, M. A. & Araújo, D., 2014. Uma montagem experimental para a medida de fluorescência. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, 36(4), p. 4501.

Polizzi, M. K. & Kontoravdi, C., 2015. Genetically-encoded biosensors for monitoring cellular stress in bioprocessing. *ScienceDirect*, Volumen 31, pp. 50-56.

Proakis, J. G. & Manolakis, D. K., 2007. *Digital Signal Processing*. 4th edition ed. s.l.:Pearson Prentice hall.

Raymond, C., 1983. *Principios Básicos de Espectroscopia*. 1ª ed. ed. Madrid: AC, Libros Científicos y Técnicos.

Romero, T. y otros, 2011. Wavelet based methodology for broken bar detection in induction motor with variable speed drive. *Electronic Power Components and Systems*, pp. 271-287.

Sadanandom, A. & Napier, R. M., 2010. Biosensors in plants.. *elsevier*, 13(6), p. 736–743.

- Solans, X., 2001. Introducción practica a la sintesis digital directa. *Montajes*, pp. 15-19.
- Soria, O. E., Martínez Sober, M., Villora, F. J. V. & Camps, V. G., 2003. *Tratamiento Digital de Señales*. Madrid: Pearson, prentice Hall.
- Taiz, L. & Zeiger, E., 2010. *Plant Physiology*. 5th ed ed. Sunderland, MA, USA,: Sinauer Associates Inc..
- Tremblay, N., Fallon, E. & Ziadi, N., 2011. Sensing of crop nitrogen status: Opportunities, tools, limitations, and supporting information requirements.. *Hort Technol.*, Volumen 21, p. 274–281.
- Tsien, R. Y., 1998. The Green Fluorescent Protein.. *Annual Reviews Biochemistry*, Volumen 67, pp. 509-544.
- Tylor, C. J. y otros, 2004. Construction of a whole-cell gene reporter for the fluorescent bioassay of nitrate. *Elsevier*, Volumen 328, pp. 60-66.
- Valeur, B., 2001. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*". Wiley-VCH. Weinheim..
- Valeur, B. & Berberan-Santos, M. N., 2013. *Molecular fluorescence, Principles and Applications*. second edition ed. Germany: Wiley -VCH.
- Vigneau, N., Ecartot, M., Rabatel, G. & Roumet, P., 2011. Potential of field hyperspectral imaging as a non destructive method to assess leaf nitrogen content in Wheat.. *Field Crop. Res.* , Volumen 122, pp. 25-31.
- Villanueva, F., Viguera, C. & López, G., 2007. Chemical Engineering International Symposium. *Global challenge*, 1(1), pp. 200-207.