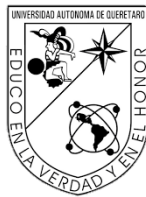


2025

Cuantificación de fosfatos mediante un biosensor
óptico

**IBT. Daphne Ojeda
Rodríguez**



**Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería**

Cuantificación de fosfatos mediante un biosensor óptico

Tesis

**Que como parte de los requisitos para
obtener el Grado de**

Maestra en Ingeniería de Biosistemas

Presenta

Daphne Ojeda Rodríguez

Dirige:

Dr. Luis Miguel Contreras Medina

Querétaro, Qro. A 30 de mayo de 2025

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Maestría en Ingeniería de Biosistemas

Cuantificación de fosfatos mediante un
biosensor óptico

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el
Grado de Maestra en Ingeniería de
Biosistemas

Presenta

Daphne Ojeda Rodríguez

Dirige:

Dr. Luis Miguel Contreras Medina

Dr. Luis Miguel Medina Contreras

Presidente

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

Secretario

Dr. Arturo Alonso Fernández Jaramillo

Vocal

M. en C. Diana Victoria Melo Sabogal

Suplente 1

Dr. Irineo Torres Pacheco

Suplente 2

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Mayo 2025

México

I. Dedicatoria

A mis padres, quienes sin los cuales no estaría el día de hoy, gracias por la calidad de educación y el apoyo incondicional que me brindaron durante todo este tiempo, gracias a ustedes, soy.

A mi segunda mamá, Carmen. Aunque no me acompañes más, siempre te llevo conmigo y este logro también es tuyo.

A mis hermanos, Fernando, Ariei y Crystal de quienes aprendo todos los días y quienes me acompañarán en esta vida.

Al amor de mi vida Rafael, quien llena mis días de alegrías, cosas positivas y me ha devuelto la fe en que se puede ser feliz.

II. Agradecimientos

Agradezco profundamente a mi familia, quienes me han apoyado desde siempre y me han impulsado a lograr mis sueños y metas.

Agradezco a mis profesores de la Licenciatura, a la Doctora Diana Alonso Segura y al Dr. Víctor Manuel Hernández Pimentel por haber visto algo en mí y haberme impulsado y ayudado a seguir este camino científico. Gracias por formarme, sé que siempre puedo contar con ustedes.

Agradezco al Dr. Luis Miguel Contreras Medina, director de este proyecto por haberme entregado las herramientas y recursos necesarios de inicio a fin de durante este proyecto. Al Dr. Ramón Gerardo Guevara González por haber hecho posible este proyecto gracias a su orientación y amplio conocimiento del tema. Al Dr. Arturo Alonso Fernández Jaramillo por haberme recibido en Mazatlán, y haberme acompañado y apoyado durante el proceso de experimentación, así como su apoyo con el diseño y armado del fluorómetro. A la M. en C Diana Victoria Melo Sabogal, por sus recomendaciones, acompañamiento y por ser un ejemplo a seguir. Al Dr. Irineo Torres Pacheco por transmitir su conocimiento y anécdotas, dentro y fuera del aula. Sin dudas sus clases fueron para mí, de lo mejor del programa, aunque difícil al principio, aprendí mucho de usted y su trayectoria me inspira.

Agradezco a la Dra. Magda, a la Dra. Carolina a Iris, Sara y Luis por haberme recibido con los brazos abiertos en su laboratorio en la Universidad Politécnica de Sinaloa en Mazatlán. También a Jorge y Brian por su colaboración con la programación y diseño del fluorómetro.

Agradezco profundamente el apoyo de mi amiga y colega Esmeralda Contreras Morales, sin quien no hubiera logrado terminar este proceso. Muchas gracias por las palabras de ánimo, las risas, el acompañamiento y todos los buenos momentos.

Agradezco también a mis compañeros Carlos, Raúl y Natalia por permitirme aprender de ellos en cada clase, por todas las porras y observaciones durante estos dos años, sin duda logramos cosas increíbles juntos en este tiempo.

Agradezco a mis compañeras de doctorado Noelia e Ireri por su guía y apoyo durante el desarrollo experimental de este proyecto.

Agradezco el apoyo brindado por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), a través de número de beca 1277682.

Índice

I. Dedicatoria	3
II. Agradecimientos	4
Abreviaturas y Siglas	12
III. Resumen	13
IV. Abstract	13
V. Justificación	14
VI. Planteamiento del problema	16
VII. Antecedentes científicos	17
VIII. Antecedentes Tecnológicos	19
IX. Monitoreo Tecnológico	20
X. Fundamentación Teórica	21
10.1 Fósforo	21
10.2 Biosensor	21
10.3 Transductor	22
10.4 <i>Escherichia coli</i>	24
10.5 Promotores inducibles por estrés en <i>E. coli</i>	24
10.5 Fluorescencia	25
10.6 Proteína Verde Fluorescente	26
XI. Hipótesis	27
XII. Objetivos	27
11.1 Objetivo general:	27

11.2 Objetivos específicos:	28
-----------------------------------	----

XIII. Metodología	28
13.1 Transformación bacteriana	28
13.2 Preparación alcalina para lisis de plásmidos.....	29
13.3 Electroforesis.....	30
13.4 Validación de la transformación de las cepas <i>E. coli</i> transformadas mediante fluorescencia en ausencia de fósforo	30
13.5 Construcción del dispositivo de medición.....	31
13.6 Ensayo de actividad de promotor basado en fluorescencia	33
13.6.1 Mediciones utilizando medio mínimo MOPS	33
13.6.2 Mediciones utilizando medio LB.....	34
13.7 Análisis Estadístico	34

XIV. Resultados y Discusión	35
14.1 Transformación bacteriana	35
14.1.1 Primera Transformación.....	35
14.1.2 Segunda Transformación	36
14.1.3 Tercera transformación bacteriana	37
14.2 Electroforesis.....	38
14.3 Determinación de cepa transformada más eficiente con sensibilidad a fosfatos	40
14.4 Cuantificación de fluorescencia	43
14.5 Medición de fosfato con biosensor	44

XV. Conclusión.....	52
----------------------------	-----------

XVI. Literatura Citada	53
-------------------------------------	-----------

XVII. Anexos	59
17.1 Códigos para la cuantificación de fluorescencia	59
17.1.2 Anexo 1 Código usado para contrastar la imagen en Python.	59
17.1.3 Anexo 2 Código MATLAB para la obtención de las coordenadas de la zona a cuantificar.....	59
17.1.4 Anexo 3 Código para la cuantificación de la muestra en Python.....	60
17.1.5 Anexo 4 Receta Medio Mínimo MOPS	63

Índice de cuadros

Cuadro 1. Clasificación de biosensores por su mecanismo de acción.	22
Cuadro 2. Combinaciones de cepas y plásmidos resultantes de las transformaciones...29	
Cuadro 3. Combinaciones de plásmidos y cepas.	31
Cuadro 4. Comparación de genotipo de diferentes cepas de E. coli para sistemas reguladores de fosfato.	51
Cuadro 5. Receta final MOPS	63
Cuadro 6. Soluciones para medio MOPS	64
Cuadro 7. Mezcla de micronutrientes	64

Índice de Figuras

Figura 1. Vector pSEVA2317	25
Figura 2. Cámara de aislamiento y arreglo óptico.....	32
Figura 3. Diseño mecánico de la cámara de aislamiento	33
Figura 4. Primeras cepas de transformación E. coli. a) la combinación cepa-plásmido fue de BL21-PphoA, b) 296-PphoA, c) BL21-PL23 y d) 296-PL53.....	35
Figura 5. Cepas transformadas de E. coli octubre 2024.	36
Figura 6. Segunda transformación, cepa top 10, a) con plásmido PL53 y b) con plásmido PphoA.	36
Figura 7. Tercera transformación, cepa Top 10.	37
Figura 8. Colonias seleccionadas	37
Figura 9. Colonias D, E, y F, a) y e) colonia F, c) colonia D, b) y d) colonia E.	38
Figura 10. a) Electroforesis colonias B y C y b) Electroforesis cepas transformadas en Instituto Tecnológico de Celaya.....	39
Figura 11. a) Primera y b) Segunda electroforesis de colonias E y F.....	39
Figura 12. Microscopía confocal de E. coli colonia B con longitud de onda de λ excitación a) 405nm y b) 488 nm con una λ emisión en 509 nm. 1) bacterias que emiten fluorescencia, 2) todas las bacterias enfocadas, 3) sobreposición de todas las bacterias y las que presentan fluorescencia, 4) blanco.....	40
Figura 13. Microscopía confocal de E. coli colonia C con longitud de onda de λ excitación a) 405nm y b) 488 nm con una λ emisión en 509 nm. 1) bacterias que emiten	

fluorescencia, 2) todas las bacterias enfocadas, 3) sobreposición de todas las bacterias y las que presentan fluorescencia, 4) blanco.....41

Figura 14. Microscopía confocal de E. coli a una longitud de onda de 405 λ excitación y 509 λ emisión en 509 nm con una intensidad del láser de 100% a) “colonia 3” y b) “colonia 4”, ambas con la misma combinación Top 10- PphoA. 1) Bacterias que emiten fluorescencia, 2) todas las bacterias enfocadas, 3) sobreposición de todas las bacterias y las que presentan fluorescencia, 4) blanco.....42

Figura 15. Diagrama de caja de las intensidades de fluorescencia colonias B y C. Grupo A: colonia C 4 B B 405nm; Grupo B: colonia C 405 nm; Grupo C: colonia B 488 nm; Grupo D: colonia C 488 nm. Los rLos resultados se expresan como la media \pm el error estándar. Nivel de significancia (α) *** =0.001 , ** = **=0.01, *=0.1, NS= No Significativo.42

Figura 16. Procedimiento de procesamiento de imágenes para medir la fluorescencia ...44

Figura 17. Fluorescencia colonia E evaluada frente a 3 concentraciones de fosfato (0, 1 y 50 mM) así como en medio LB y MOPS. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos y los resultados se expresan como la media \pm el error estándar, basado en una prueba t de student, $\alpha=0.05$46

Figura 18. Fluorescencia colonia F evaluada frente a 2 concentraciones de fosfato (1 y 50 mM) cultivadas en medio LB y MOPS. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos y los resultados se expresan como la media \pm el error estándar, basado en una prueba t de student $\alpha=0.05$47

Figura 19. Se muestran los valores promedio de fluorescencia de las colonias E y F frente a 2 concentraciones de fosfato 1 mM y 50 mM, cultivadas en medio MOPS. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos y

los resultados se expresan como la media \pm el error estándar, basado en una prueba t de student $\alpha= 0.05$49

Figura 20. Se muestran los valores promedio de fluorescencia de las colonias E y F frente a 2 concentraciones de fosfato 1 mM y 50 mM, cultivadas en medio LB. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos y los resultados se expresan como la media \pm el error estándar, basado en una prueba t de student $\alpha= 0.05$49

Abreviaturas y Siglas

- Fosfato Inorgánico (Pi)
- Ácido desoxirribonucleico (ADN)
- Fosfato monoamónico (MAP)
- Fosfato diamónico (DAP)
- Absorción atómica de llama (FAAS)
- Espectroscopia de absorción atómica electrotérmica (ETAAS)
- Espectroscopia de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES)
- Espectroscopia de emisión atómica de plasma acoplado por inducción (ICP-AES)
- Proteína de fijación a fosfato (PBP)
- Proteína verde fluorescente (GFP)
- Fósforo (P)
- Adenosín difosfato (ADP)
- Adenosín trifosfato (ATP)
- Factores de transcripción (TF)
- Sistema de inanición de fósforo (PHO)
- Fosfatasa alcalina (phoA)
- Luria Bertani (LB)
- Fosfato de potasio dibásico (KH_2PO_4)
- Densidad óptica (OD)

III. Resumen

El fósforo es uno de los elementos más importantes para el desarrollo de la vida en la Tierra, siendo vital para plantas, animales y seres humanos. Sin él, los procesos básicos para el desarrollo de la vida como la fotosíntesis y el aprovechamiento de energía, serían imposibles. Es por esto que su monitoreo en diversas áreas, por ejemplo, en la agricultura, es de suma importancia para conocer sus niveles y poder actuar asertivamente. En el siguiente trabajo de tesis se presenta un biosensor óptico como una alternativa interesante para la cuantificación de fosfato teniendo en cuenta su bajo costo y alta selectividad al analito de interés debido a su composición, a base de una cepa de *E. coli* modificada genéticamente para emitir fluorescencia, la cual es inversamente proporcional a la concentración de fosfato presente en el medio.

Palabras clave: Biosensor, fósforo, agricultura, fluorescencia, *E. coli*.

IV. Abstract

Phosphorus is one of the most important elements for the development of life on Earth, being vital for plants, animals, and human beings. Without it, basic processes for life development, such as photosynthesis and energy use, would be impossible. This is why its monitoring on several fields such as agriculture, is of utmost importance, due to the need to know its levels to act accordingly. In the next thesis work, an optic biosensor is presented as an interesting alternative for phosphate quantification, considering the low cost and high selectivity to the analyte of interest, due to its composition, based on an *E. coli* strain genetically modified to emit fluorescence. This fluorescence is inversely proportional to the phosphate present in the medium.

Keywords: Biosensor, phosphorus, agriculture, fluorescence, *E. coli*.

V. Justificación

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) realizó un estimado que dice que para el año 2030, la población mundial estará llegando a los 9000 millones de habitantes, lo que necesitará nuevas estrategias para mantener el ritmo de la producción de alimentos y poder satisfacer la demanda alimenticia, esto incluyendo a la industria agrícola (NU, 2022).

El fósforo es uno de los nutrientes más importantes para el desarrollo de los cultivos. Sus funciones principales abarcan desde ser un componente estructural de enzimas, ácidos nucleicos, ADN y proteínas, hasta procesos como la fotosíntesis y respiración. Cuando la cantidad de fósforo se administra de manera adecuada, se promueve la temprana formación y crecimiento de las raíces, hay mayor floración y producción de semillas, vegetales, frutas y la calidad del grano mejora, lo que hace que su monitoreo sea importante para el buen rendimiento de los cultivos, ya que la deficiencia de este resulta en retraso en el crecimiento y desarrollo de los mismos; los niveles de fósforo disponible en el suelo deben de mantenerse entre el 12 y 30% (Mapare et al., 2013; Villasanti et al., 2013).

Se emplean diversas prácticas para asegurar cierto nivel de calidad y de productividad en los cultivos, tales como los fertilizantes, los cuales son utilizados con el objetivo de poder brindar a los cultivos de los nutrientes que necesitan para poder alcanzar su óptimo crecimiento y desarrollo (FAO, 2002). A pesar de que las concentraciones de fósforo en el suelo pueden ser altas, las plantas comúnmente se ven limitadas al adquirirlo debido a que el fosfato inorgánico es poco soluble a través de las raíces y altamente absorbido por el suelo, generalmente la concentración de fósforo en las plantas se mantiene entre el 0.05 a 0.5% de peso seco de la planta, independientemente de las limitaciones, es importante su monitoreo constante (Ribot et al., 2008). Según el Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria (CEDRSSA), en México solamente, de 22 millones de hectáreas destinadas al cultivo, el 68% (15 millones de hectáreas) utilizan fertilizantes. Tan solo en el país las importaciones de fertilizantes fosfatados ascendieron a 4,798.6 millones de pesos en el 2018, siendo el segundo fertilizante más utilizado después de los fertilizantes nitrogenados. Los fertilizantes fosfatados más comercializados en México son los superfosfatos, el fosfato diamónico (DAP) y el fosfato monoamónico (MAP) (CEDRSSA, 2018).

Para poder diseñar un esquema adecuado para la fertilización de los cultivos se necesitan análisis químicos que usualmente se obtienen a través de pruebas de laboratorio que son complejos e intensos y que además son costosos y toman mucho tiempo. El monitoreo continuo de los diferentes parámetros del suelo y de la información química de los cultivos que demanda la agricultura hoy en día no pueden ser atendidos de manera rápida con las técnicas de monitoreo tradicionales (Mapare et al., 2013).

Los biosensores son una herramienta analítica que está diseñada específicamente para detectar analitos de interés, los cuales cuentan con biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos o ácidos nucleicos que tienen la función de ser elementos clave para detectar la sustancia deseada. Esta característica los hace herramientas de alta especificidad, sensibilidad y velocidad con el propósito de poder detectar algún analito en específico sin la interferencia de otros componentes presentes en la muestra a analizar, el sistema del biosensor se complementa con un transductor y una herramienta de visualización y análisis de datos (Mapare et al., 2013; Singh et al., 2023).

La solución salina se propone como un modelo de estudio para el desarrollo del biosensor de fosfatos, ya que esta es un ambiente factible para cuantificar los fertilizantes y es un paso importante para corroborar el correcto funcionamiento del sistema de medición de fluorescencia (FAO, 2002).

Es por esto que en este proyecto se propone el desarrollo de un biosensor versátil, mediante el uso de un sistema de medición de fluorescencia que permitirá tener la capacidad de detectar y medir concentraciones de fosfatos en condiciones *in vitro* en solución salina, lo que permitirá asegurar su funcionamiento y servirá como un primer paso para poder utilizarlo, en un mediano plazo, para cuantificar fosfato en tejido de planta, suelo y agua; y de esta manera poder competir con los métodos convencionales. Lo anterior podría ayudar a generar estrategias de manejo de fertilización de manera rápida y confiable.

VI. Planteamiento del problema

Actualmente existen varios métodos de análisis para cuantificar fosfatos en los cultivos, estos presentan diversas desventajas. Debido a que existe una gran variedad de fosfatos en los tejidos y células de las plantas, además de la complejidad que esto representa como una matriz de análisis, no se considera que algún método en específico sea la mejor opción para la cuantificación cualitativa y cuantitativa fosfatos (Wieczorek et al., 2022).

Algunos ejemplos de técnicas son las espectrofotométricas y las espectrométricas como la espectrometría de absorción atómica de llama (FAAS), espectroscopia de absorción atómica electrotermica (ETAAS), la espectroscopia de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) y la espectroscopia de emisión atómica de plasma acoplado por inducción (ICP-AES). Todos estos métodos tienen en común que, para la cuantificación de fosfatos totales, es necesario un paso previo de mineralización de la muestra, que busca la descomposición de sustancias orgánicas en compuestos inorgánicos más simples. La precisión del análisis dependerá de la efectividad de la destrucción total de la muestra vegetal, lo cual compromete la sensibilidad de todos estos métodos. Otra desventaja es el largo tiempo que toma la descomposición de la muestra y lo peligroso que es hacer este tipo de preparaciones para el analista, debido al uso de ácidos concentrados a altas temperaturas (Mapare et al., 2013; Wieczorek et al., 2022).

Los biosensores actuales aún necesitan el desarrollo de métodos para la detección de la respuesta que sean igual de específicos que los equipos de laboratorio y que cumplan con la ventaja de la especificidad, ya que varían entre el 70 y el 80%, además se demanda satisfacer la demanda de portabilidad (Hicks et al., 2020). Por esto se sugiere un biosensor que represente una opción de bajo costo, que sea portable y altamente específico como alternativa para cuantificaciones de fosfatos en el campo.

VII. Antecedentes científicos

El primer biosensor que se hizo a partir de una proteína de fijación a fosfato (PBP) fluorescente a través de un injerto químico de un colorante emisor de azul, 7-dietilamino-3-([[(2-maleimidil)etil]amino]carbonil)cumarina (MDCC-PBP) y se hizo con la ayuda de *Escherichia Coli*, donde también se utilizó la PBP. La proteína marcada posee un máximo de excitación a 425 nm y un máximo de emisión a 474 nm en ausencia de fósforo inorgánico (Pi), cambiando a 464 nm con un aumento de 5.2 veces en la fluorescencia ($X_{\text{max}}/X_{\text{max}}$) cuando forma complejo con Pi a pH 7. Este biosensor fue capaz de medir rápidamente concentraciones micromolares de fosfato inorgánico, con el objetivo de seguir la liberación de Pi en tiempo real de enzimas tales como las fosfatasas (Brune et al., 1994).

En el año 2002, se diseñó un biosensor basado en fluorescencia para endotoxinas y bacterias gramnegativas a través de la mutagénesis dirigida al sitio de la proteína verde mejorada (EGFP) expresado en *E. coli* (Goh et al., 2002). La familia de proteínas que han funcionado a la fecha como base para la construcción de biosensores de fosfatos son las proteínas bacterianas de unión periplásmica (bPBP), que son componentes receptores de los sistemas de transporte ABC (Lamarche et al., 2008).

También se ha utilizado una cepa termófila de *Synechococcus* para crear un sensor genético PiBP (Proteína de unión específica de fosfato inorgánico). Se hizo a través de una mutagénesis con dirección al sitio para generar bacterias recombinantes con afinidad a una amplia gama de concentraciones de fosfatos. Estas bacterias recombinantes que expresan FLIPPI (proteína indicadora fluorescente para fosfato inorgánico) permiten la visualización directa de la actividad de fosfatos inorgánicos en cortes de órganos u organismos completos (Gu et al., 2006). Otro ejemplo de un biosensor utilizando *E. coli*, donde se injertaron dos mutaciones de cisteína, fueron marcadas con 6-yodoacetamidotetrametilrodamina, para incrementar la fluorescencia hasta 18 veces más de lo habitual (Okoh et al., 2006).

En ocasiones los biosensores no se diseñan desde cero, sino que también se han utilizado otros biosensores como base para después rediseñarlos y de esta manera mejorar sus características. Un ejemplo de este caso es la modificación de un biosensor para la detección de fosfato inorgánico utilizando la proteína de unión a fosfato PstS de *E. coli*, donde se hicieron cambios para permitir obtener mediciones a concentraciones más altas de fosfato (ya que es común que los biosensores detecten concentraciones micro o nano molares de

este) y a su vez a concentraciones más bajas del mismo biosensor, esto con la finalidad de que su uso sea económico al necesitar menor cantidad de este para cuantificar mayores concentraciones. Esto se logró a través del debilitamiento de la unión a fosfato utilizado en el “biosensor base” (Solscheid et al., 2015).

Otro ejemplo de un método continuo, sensible y versátil para detectar y medir el nivel de fosfato inorgánico en concentraciones que van desde lo subnanomolar a micromolar en volúmenes de muestra de hasta 10 μL , combina las ventajas de un receptor biológico basado en una proteína bacteriana que se une al fosfato con el principio de termoforesis, lo que quiere decir que se ve implicado el movimiento de partículas en respuesta a un gradiente de temperatura. Se registraron los cambios en el flujo de difusión neto del sensor de P_i , impulsados por la entropía, en un gradiente de temperatura en intervalos de tiempo definidos. Además, se demostró su utilidad al analizar reacciones enzimáticas estacionarias relacionadas con la liberación de P_i en tiempo real. Esto alcanzando una alta sensibilidad y selectividad para el P_i , la capacidad de separar la señal de lectura de posibles interferencias químicas y espectroscópicas, la utilización de volúmenes de muestra mínimos y un análisis de datos sencillo (Franz et al., 2020).

La tecnología de biosensores como herramienta de monitoreo para detección de fosfatos es amplia y no se limita a la superficie terrestre. Ha habido interés de monitorear la presencia de fósforo en el agua debido al fenómeno de eutrofización que es cuando el exceso de estos elementos (fosfatos, sulfatos etc.) en el agua favorece la sobrepoblación de plantas acuáticas y por ende limitando recursos para la fauna que ahí se encuentra. Es por esto que se llevó a cabo el desarrollo de un biosensor basado en transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia, lo que permite una alta sensibilidad y selectividad para detectar fósforo inorgánico en el agua. Para este caso se utilizó una proteína fluorescente diferente a la antes mencionada, de nombre NanoLuc y Venus. La primera aportaba la bioluminiscencia y la última como aceptor de energía dando como resultado límites de detección de 3.3 a 434 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fósforo en agua (Yu et al., 2023).

El campo de la medicina no se queda atrás en el desarrollo de nuevas alternativas más selectivas y rápidas para detectar ciertos analitos de interés con el uso de biosensores. Se realizó un biosensor enzimático basado en fibra óptica para la cuantificación estimada de fosfato inorgánico en muestras complejas de orina. El biosensor funciona gracias al efecto de

inhibición causado por el fosfato inorgánico en la actividad de la fosfatasa ácida. Esta enzima es responsable de transformar el p-nitrofenilfosfato en un compuesto coloreado llamado p-nitrofenol, que se puede detectar ópticamente a una longitud de onda de 405 nm. La presencia del fosfato inorgánico en la muestra suprime esta reacción, y la magnitud de la inhibición se relaciona con la concentración de fosfato inorgánico presente en la muestra de orina. En el caso específico de este biosensor, tiene vida de anaquel de más de 80 días y tiene un tiempo de respuesta de 20 minutos (Kulkarni & Karve, 2020).

Lo anterior sugiere que, los biosensores son una herramienta competitiva y más atractiva en contra de los métodos convencionales de medición, debido su alta sensibilidad y especificidad (Singh et al., 2023), lo que quiere decir que la interacción durante la medición únicamente ocurrirá con el analito de interés, además, el corto tiempo de reacción, permite tener una cuantificación rápida y facilidad de trabajar en tiempo real.

VIII. Antecedentes Tecnológicos

Se han registrado algunas patentes de biosensores ópticos sensibles a fosfatos. En el 2012 se patentó un biosensor óptico que tiene la finalidad de detectar pesticidas organofosforados. Se compone de un equipo óptico de transmisión, un equipo óptico de detección y una cámara simple que contiene enzimas inmovilizadas. Su fin es la detección de pesticidas organofosforados, monitoreo veloz de fuentes de contaminación en el ambiente y la integración de sistemas de monitoreo en plantas de tratamiento de aguas residuales (Lan Wesheng et al., 2012).

Se otorgó una patente para la detección de fosfato inorgánico a través de la luminiscencia, se realiza una prueba a través de la producción enzimática de ADP, el cual se transforma en ATP y este se emplea en una reacción luminiscente. Esto se puede aplicar para monitorear reacciones enzimáticas acopladas que consumen o producen fosfato inorgánico (Mondal et al., 2014).

También, recientemente se ha patentado un kit para medir los nutrientes del suelo, extrayendo una muestra de suelo utilizando ácido cítrico para obtener un extracto de suelo que contenga fósforo, a través de la medición del fósforo extraído con citrato en la muestra. Después se debe ajustar la cantidad basándose en un método de referencia para obtener un

contenido de fósforo corregido. (Blackwell et al., 2024).

Se tiene también el registro de una patente para la detección de la actividad de la fosfatasa alcalina. Entre más alta sea la concentración de la fosfatasa, habrá emisión de fluorescencia. Como sustrato utiliza fosfato de p-aminofenilo, este es catalizado e hidrolizado en una solución acuosa por la fosfatasa alcalina para generar p-aminofenol y este pueda reaccionar con etilendiamina agregada posteriormente con el fin de generar puntos de carbono poliméricos que emitan fluorescencia. Su uso está pensado dentro de la industria clínica para detectar la actividad de la fosfatasa alcalina en muestras diluidas de suero humano (Jian et al., 2020).

IX. Monitoreo Tecnológico

Existen métodos para la cuantificación de nutrientes en las plantas, sin embargo, es importante tomar en consideración que no resultan del todo efectivos y que presentan diversas desventajas. Por ejemplo, los métodos que requieren el tejido de las plantas como lo son los métodos de digestión Kjeldahl y combustión Dumas presentan algunos inconvenientes. En el caso del método Kjeldahl, el análisis es lento, invasivo y destructivo, además de que se utilizan reactivos tóxicos en su proceso. La combustión de Dumas resulta también destructiva y puede haber pérdida de P si hay una combustión incompleta, además de que ambos métodos requieren preparaciones antes del análisis, lo cual también incrementa su costo (Muñoz-Huerta et al., 2013).

Por otra parte, hay métodos más específicos como la espectrofotometría de rayos X (XRF) y la espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS), que proporcionan una cuantificación relativa y la preparación de la muestra es complicada (Wieczorek et al., 2022).

Existen otras dos técnicas de laboratorio altamente efectivas para la cuantificación de ortofosfatos (fosfatos en su forma más simple), la cromatografía líquida con análisis de inyección de flujo (HPLC-FIA) y la técnica de Olsen. Aunque ambos métodos se caracterizan por su calidad en la medición debido a su efectividad, se limitan únicamente a realizarse dentro de un laboratorio, por lo que el costo de análisis de este tipo, se eleva considerablemente (Mapare et al., 2013).

X. Fundamentación Teórica

10.1 Fósforo

El fósforo es uno de los macronutrientes más importantes para el desarrollo de la vida en el planeta Tierra. En el caso de las plantas, este tiene relación directa con su crecimiento y desarrollo, ya que gracias a su presencia se aceleran mecanismos como la maduración y la producción de semillas, además de ser parte esencial en la respiración, fotosíntesis y biosíntesis de membranas y ácidos nucleicos (Lambers, 2022). Las plantas asimilan el fósforo a través de fosfatos (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} o PO_4^{3-}), los cuales pueden obtenerse a través de otros grupos orgánicos mediante enzimas presentes en las plantas. La biosíntesis de glúcidos, de lípidos, la síntesis de clorofila y carotenoides, metabolismo de ácidos orgánicos y glucólisis son algunos procesos del metabolismo vegetal en los cuales el fósforo es parte importante. En ausencia de fósforo las plantas sufren atraso y detenimiento en su maduración, lo que se refleja como cambios en adelgazamiento, coloración verde oscuro y disminución del tamaño de las hojas (Mixquititla-Casbis & Villegas-Torres, 2016). El fósforo comúnmente limita la productividad en ambientes naturales y agrícolas en todo el mundo (Lambers, 2022).

10.2 Biosensor

Un biosensor es un sistema analítico que es utilizado para la detección de cierto analito de interés. Este sistema está conformado por un elemento biológico de reconocimiento y un transductor de señal para poder obtener una señal medible que sea proporcional a la concentración del analito de interés (Dai & Choi, 2013). Adicionalmente a esto, también es necesaria una herramienta de análisis de datos y de visualización. La tecnología de los biosensores tiene una amplia gama de aplicaciones como la agricultura, estudios ambientales, diagnóstico de enfermedades e inspección y seguridad de los alimentos por mencionar algunas (Singh et al., 2023).

Existen principalmente dos tipos de biosensores, los catalíticos y los de afinidad. Los catalíticos se caracterizan por utilizar biocomponentes que puedan reconocer especies bioquímicas y las transforman a través de una reacción química en un producto. También se pueden basar en la medición de la tasa de inhibición de una reacción catalítica por un inhibidor. En los biosensores de afinidad, por otra parte, se utiliza un elemento de reconocimiento biológico para que el analito de interés se una a él. Existen también biosensores de células completas que funcionan como elementos de reconocimiento, donde estas responden a ciertas

sustancias a través de la expresión de un gen específico (Borisov & Wolfbeis, 2008). Los biosensores microbianos o celulares utilizan microorganismos como sistema para poder cuantificar los analitos de interés, esto gracias a las enzimas que están en las células y que producen una respuesta de manera específica y selectiva a la presencia de estos (Lei et al., 2006). En el **Cuadro 1** se presenta la clasificación de biosensores según su mecanismo de acción.

Cuadro 1. Clasificación de biosensores por su mecanismo de acción.

Tipo de Biosensor	Característica	Referencia
Catalítico	Uso de biocomponentes que puedan reconocer especies bioquímicas y las transforman a través de una reacción química en un producto.	(Borisov & Wolfbeis, 2008)
Afinidad	Uso de un elemento de reconocimiento biológico para que el analito de interés se una a él.	(Borisov & Wolfbeis, 2008)
Microbiano	Uso de microorganismos como sistema para poder cuantificar los analitos de interés, esto gracias a las enzimas que están en las células y que producen una respuesta de manera específica y selectiva a la presencia de estos analitos.	(Dai & Choi, 2013).

10.3 Transductor

Como se mencionó anteriormente, los biosensores también necesitan de un transductor que pueda obtener una señal medible proporcionada por la parte biológica del mismo. Las señales electroquímicas, ópticas, térmicas y de masas se pueden utilizar como estos factores medibles que se encuentran asociados al analito de interés presente en las muestras de análisis (Faridbod et al., 2014). Dicho esto, dependiendo del tipo de señal, los diferentes tipos de transductores se dividen en electroquímicos, ópticos, térmicos y piezoeléctricos (Bhardwaj,

2015).

Existen diferentes tipos de transductores ópticos dentro de la tecnología de biosensores para producir los cambios necesarios en diferentes propiedades ópticas cuantificables como lo puede ser adsorción, luminiscencia, fluorescencia o índice de refracción, comúnmente los más estudiados son los biosensores fluorescentes, bioluminiscentes y los colorimétricos debido a diversas ventajas como su selectividad, sensibilidad y flexibilidad (D'Souza, 2001).

Los transductores electroquímicos reciben señales eléctricas al momento que hay una reacción entre la biomolécula y el analito de interés, lo que produce un cambio químico sobre el piso de electrodos (Bhardwaj, 2015).

En el caso de los transductores térmicos, estos detectan cambios en la temperatura, ya que se basan en la absorción o producción de calor. Esto quiere decir que se produce una señal analítica debido a los cambios de temperatura que ocurren en el medio en el que ocurre la reacción. Se componen de termistores (sensores de temperatura) y enzimas inmovilizadas. Una vez que ocurre la unión entre el analito y la enzima, el sensor térmico mide la interacción obtenida de la reacción de calor y esta es calibrada por la concentración del analito. Esto finalmente se traduce como que el total de calor producido o absorbido en la reacción es proporcional a la entalpía y el número total de moléculas en la reacción (Faridbod et al., 2014).

Los transductores piezoeléctricos son capaces de detectar el cambio en la masa debido a la interacción entre el analito y la biomolécula de detección. Estos funcionan a través de cristales que pasan una deformación eléctrica después de la aplicación de un potencial eléctrico. Los potenciales alternos se encargan de producir ondas estacionarias en el cristal en una característica frecuencia. Este cristal debe estar recubierto con un elemento biológico de reconocimiento para que la unión del analito y el receptor cause un cambio en la frecuencia de resonancia y de esta manera producir una señal analítica (Faridbod et al., 2014).

La tecnología de biosensores puede consistir, en algunos casos, en usar moléculas fluorescentes e injertarlas ya sea química o genéticamente en proteínas de unión a fósforo, para que sirvan como transductor, esto gracias a que se hace un cambio en los reconocimientos del sustrato. Estos cambios permiten la fluorescencia de los fluoróforos sin tener que utilizar algún reactivo adicional. Los biosensores son en su mayoría usados en condiciones *in vitro*, sin embargo, los avances tecnológicos han permitido que poco a poco se hable de poderlos utilizar en condiciones *in vivo* (Kanno et al., 2016).

10.4 *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo gram negativo con forma de varilla que mide generalmente 1 μm de largo y 3.5 μm de ancho, su tamaño puede variar dependiendo de la cepa y las condiciones de cultivo. Es una bacteria aerobia facultativa, lo que quiere decir que puede crecer en presencia o ausencia de oxígeno. *E. coli* está conformada en un 55% de proteínas, 25% ácidos nucleicos, 9% lípidos, 6% de pared celular, 2.5% glicógeno y 3% de otros metabolitos. Esta ha sido por años la bacteria modelo para múltiples aplicaciones dentro del campo de estudio de la biología molecular y la biotecnología. Tiene diversas ventajas como su rápido crecimiento en medios de cultivo de precio accesible, se tiene un extensivo conocimiento acerca de su genética, de su transcriptoma, proteoma y metabolismo, además que existen varias cepas que son seguras para su manejo ya que no son de tipo patógenas (Vargas-Maya & Franco, 2017).

10.5 Promotores inducibles por estrés en *E. coli*

Durante los últimos años, ha surgido el uso de promotores inducibles por estrés, los cuales permiten diseñar sistemas basados en factores de transcripción (TF) capaces de detectar cambios ambientales que desencadenan la expresión génica cuando las células han alcanzado el crecimiento deseado. Estos tienen la ventaja sobre otros promotores que necesitan la adición de una molécula inductora o represora para que inicie la expresión de los genes que son responsables de la síntesis del producto de interés, los cuales generalmente son costosos y se vuelven tóxicos, por lo que al final es necesario removerlos del producto final (Torres-Bacete et al., 2021).

Anteriormente se ha estudiado el sistema de inanición de fósforo (PHO) en *E. coli*, que es un sistema global regulatorio conformado por dos componentes, en los que se relaciona con el transporte y asimilación de fosfato (Van Dien and Keasling, 1998). Este sistema de inanición es inducido bajo el agotamiento del fósforo extracelular. El sistema regulatorio está compuesto por PhoB/PhoR, quienes regulan a PHO. El regulador de respuesta PhoB es fosforilado por la histidina quinasa PhoR bajo el agotamiento de Pi (fósforo inorgánico). Posteriormente, la PhoB fosforilada (PhoB-P) activa la transcripción de un gran conjunto de genes al unirse a una región operadora conservada (la caja PHO), y reclutar la subunidad $\sigma 70$ de la ARN polimerasa. Esto indicaría que se pueden desarrollar promotores que sean regulados por la disponibilidad de

fosfato y controlar la expresión genética de la bacteria. El promotor que controla la expresión de la fosfatasa alcalina (PphoA), es uno de los mejores promotores regulados por PhoB caracterizados en *E. coli*, que se ha utilizado anteriormente en el desarrollo de biosensores de fosfato, en donde PphoA es activado a través de la unión de un díamero al factor de transcripción fosforilado de PhoB (Torres-Bacete et al., 2021).

En cuanto a la construcción genética del biosensor se ha propuesto anteriormente el uso del promotor PhoA de *E. coli* MG1655 amplificado mediante PCR y fusionado transcripcionalmente al acoplador traduccional bicistrónico BCD2 (Mutalik et al., 2013), el gen fluorescente msfgfp (GFP) del plásmido Pbg42 que funge como gen reportero (Zobel et al., 2015) y se genera así el fragmento PphoA-BCD2-msfgfp. Con los sitios de restricción PacI/Spel en el vector Pseva231, se llevó a cabo la clonación (Antoine and Loch, 1992; Martinez-Garcia et al., 2019), generando el pSE- Vector VA2317 phoA (Torres-Bacete et al., 2021).

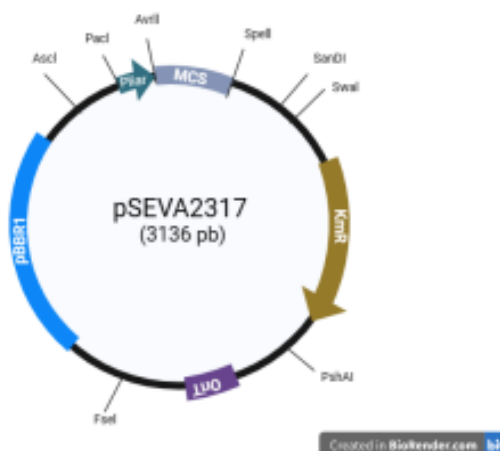


Figura 1. Vector pSEVA2317

10.5 Fluorescencia

La fluorescencia es actualmente una metodología de alta importancia que tiene varias aplicaciones en distintos campos de estudio, como el diagnóstico médico, análisis genético, secuenciación de ADN, ciencias forenses etc. Esto se debe a su alta sensibilidad al momento de señalar la localización de moléculas intracelulares al nivel de llegar a detectar una sola molécula, esto como un importante avance en las imágenes celulares y moleculares (Demchenko, 2009).

Se le denomina fluorescencia a la emisión de luz proveniente de cualquier sustancia.

tejido o ser vivo, esta viene de estados electrónicamente excitados. Cuando un electrón en un orbital excitado, posiblemente por fotones o alguna fuente externa de energía, se empareja (con espín opuesto) con otro electrón en un orbital en estado fundamental o en un estado de energía más bajo, libera fotones, muchas veces a otras longitudes de onda a la fuente de excitación, a eso se le conoce como fluorescencia. Los espectros de emisión de fluorescencia son gráficos de la intensidad de la fluorescencia frente a cierta longitud de onda (medida en nanómetros) o el número de onda (cm^{-1}) y esto puede obtenerse al hacer un barrido de la longitud de onda del espectro electromagnético en la fuente de excitación para generar una respuesta a otra longitud de onda en la respuesta fluorescente. Existe variación entre los espectros de emisión del tejido, sustancia u organismo, ya que estos dependen directamente de la estructura química del fluoróforo (los cuales pueden ser moléculas pequeñas, proteínas o nanopartículas) y del disolvente (Demchenko, 2009; Nawrot et al., 2018).

El uso de la longitud de luz adecuada ocasiona la excitación del fluoróforo, lo que puede causar que aumente la fluorescencia de intensidad o que disminuya. Dentro de la tecnología de biosensores, la luz que proviene de un proceso de fluorescencia es detectado a través de fotodiodos o fotomultiplicadores (Singh et al., 2023).

Para que la fluorescencia pueda ser detectada, es necesaria una fuente de luz, como un diodo a cierta longitud de onda, para la excitación de las moléculas, estos diodos, se pueden combinar con filtros ópticos de longitud de onda específica para moléculas. Para poder detectar la fluorescencia de las moléculas con los diodos anteriormente mencionados, generalmente se emplea un fotodiodo o un fototransistor, el cual es un dispositivo que genera corrientes eléctricas cuando es irradiado, existe una gran variedad de fotodiodos o fototransistores que son sensibles a diferentes longitudes de onda, estos dispositivos se utilizan, en combinación de filtros ópticos para que se puedan aislar las emisiones de fotones de las moléculas excitables con la finalidad de poder medir la fluorescencia a la longitud de onda a la que emiten fluorescencia las moléculas, este principio permite la generación de un detector que registra los cambios en la intensidad de la fluorescencia y genera un valor que pueda ser cuantificable, el cual generalmente es corriente o voltaje (Nawrot et al., 2018).

10.6 Proteína Verde Fluorescente

A través de la ingeniería genética, se han desarrollado los biosensores fluorescentes, esta tecnología se basa en la fusión de un promotor a un gen reportero que codifique para una proteína fluorescente (generalmente GFP) y de esta manera se emita una fluorescencia

detectable a través de la adaptación de un organismo predeterminado, comúnmente se utiliza *E. coli* debido a su versatilidad (Dai & Choi, 2013).

La proteína verde fluorescente o GFP es una herramienta que se ha utilizado ampliamente en la rama de la ingeniería genética desde 1991, cuando se clonó por primera vez el gen de la GFP proveniente de la medusa *Aequorea victoria*. Una de las razones de la popularidad de esta proteína dentro de la investigación y desarrollo científico es que no es necesario el uso de cofactores o de sustratos para la generación de la luz verde (Misteli & Spector, 1997).

La propiedad de la GFP de generar un fluoróforo interno, es la que permite generar fluorescencia en las moléculas, la cual es visible mediante el uso de dispositivos adecuados y por lo tanto cuantificable. En una solución normal, la λ excitación a 395 nm presenta un pico de λ emisión de 508 nm y si se expone a una λ excitación de 475 nm presenta un pico de λ emisión de 503 nm (Tsien, 1998).

La bioluminiscencia bacteriana promovida por la GFP posee dos ventajas importantes en el monitoreo de activación de genes, una es que es la rápida respuesta y la otra que alcanza sensibilidades más altas en un corto periodo de tiempo. Estas dos ventajas tienen que ver con las propiedades catalíticas del indicador enzimático, que permite que un número relativamente pequeño de moléculas indicadoras genere una señal lo suficientemente fuerte para que sea detectada. La proteína GFP es altamente estable, ya que una vez inducida, la señal se mantiene acumulada y es posible detectarla aun después de muchas horas, incluso después de la muerte celular (Sagi et al., 2003).

XI. Hipótesis

Se alcanzará una especificidad mayor al 80% y una mejora en la portabilidad de un biosensor utilizando *E. coli* con promotores de fluorescencia y genes inducibles por estrés en ausencia de fósforo para la medición de fosfatos presentes en soluciones salinas.

XII. Objetivos

11.1 Objetivo general:

Desarrollar un biosensor con mejora en la portabilidad para la cuantificación de fosfatos en soluciones salinas mediante un dispositivo optoelectrónico y una cepa de *E. coli* transformada

genéticamente.

11.2 Objetivos específicos:

1. Obtener cepas de *E. coli* recombinante con los plásmidos PphoA y Pilar 53.
2. Validar la transformación de las cepas de *E. coli* transformadas mediante fluorescencia en ausencia de fósforo.
3. Determinar la colonia con mayor fluorescencia a partir de la comparación de las cepas transformadas *E. coli* BL21, 296, y Top 10.

XIII. Metodología

13.1 Transformación bacteriana

Se almacenaron los plásmidos donados por el Dr. José Nogales del Centro Nacional de Biotecnología (Madrid, España) que se encontraban adheridos al papel filtro a 4 °C hasta que estuvieran listos para usarse. Para recuperar el ADN, se usaron guantes limpios de nitrilo y se recortó el área marcada del círculo que contenía el plásmido seco (40 ng). Con pinzas limpias, se colocó el papel filtro en un microtubo de 1.5 mL y se añadió 100 µL de buffer TE al microtubo. Posteriormente se usó el vórtex brevemente y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se utilizó nuevamente el vórtex y la centrífuga modelo Mikro 200 R (Hettich, Alemania) por 5 segundos. Se removieron 10 µL del sobrenadante para la transformación. Finalmente, el sobrante de la mezcla del papel filtro y TE se almacenaron a 4°C. (Torres-Bacete et al., 2021).

Se adicionaron 10 µL de ADN plasmídico a 50 µL de células *E. coli* 296, *E. coli* BL21 y TOP 10 proporcionadas por la Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Aeropuerto y el Instituto Tecnológico de Celaya y se dejaron incubar 20 min a 4°C en hielo. Inmediatamente que pasaron los 20 minutos, se incubaron a 42 ±1 °C durante 2 minutos, esto con un vaso de agua y en la plancha previamente calentada. Una vez transcurrido el tiempo se enfrió inmediatamente a 4 °C con ayuda de hielo. Posteriormente las células transformadas se

añadieron a 600 µL de caldo LB estéril y se dejaron incubar a 37 °C (1150 rpm) durante una hora. Finalmente se sembraron alícuotas de 75 y 200 µL para cada combinación en cajas Petri en agar LB con kanamicina como marcador de selección a una concentración de 50 µg/mL y se dejaron en incubadora Ecoshel modelo 9052 (Ecoshel, EU) a 37°C por 24 horas (Rojas, 2018). En el **Cuadro 2** se presentan cepas transformadas resultantes de las trasformaciones realizadas que fueron utilizadas para los análisis.

Cuadro 2. Combinaciones de cepas y plásmidos resultantes de las transformaciones.

Cepa <i>E. coli</i>	Plásmido	Cepa nueva	Nombre asignado
296	PphoA	296-PphoA	Colonia B
BL21	Pliar 53	BL21 - Pliar	Colonia C
Top 10	PphoA	Top 10- PphoA	Colonia D
Top 10	PphoA	Top 10- PphoA	Colonia E
Top 10	Pliar 53	Top 10- Pliar 53	Colonia F

13.2 Preparación alcalina para lisis de plásmidos

Se utilizó el kit de purificación de DNA GeneJET Plasmid Miniprep de la marca Fermentas ® (EU), se siguieron las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific). Se inocularon las diferentes colonias de *E. coli* transformada en 30 mL de medio LB suplementado con 50 µL/mg de kanamicina y se incubó durante 12 a 16 horas a 37 °C en agitación a 200-250 rpm. Se recolectó el cultivo bacteriano mediante centrifugación, a 8000 rpm en microcentrífuga modelo Mikro 200 R (Hettich, Alemania) por dos minutos a temperatura ambiente y se decantó el sobrenadante, se removió el medio sobrante.

Después se suspendió nuevamente el pellet celular en 250 µL de solución de resuspensión. Se transfirió a un tubo de microcentrífuga y se añadieron 250 µL de solución de lisis y se mezcló vigorosamente invirtiendo el tubo de cuatro a seis veces hasta que se volvió

viscosa y ligeramente clara. Se añadieron 350 mL de la solución neutralizante y se mezclaron inmediatamente invirtiendo el tubo de cuatro a seis veces, se centrifugó por 5 minutos a 8000 rpm.

Se transfirió el sobrenadante a la columna de centrifugado GeneJET mediante decantación y se centrifugó durante un minuto, se desechó el flujo y se volvió a colocar la columna en el mismo tubo de recolección, después se lavó la columna de centrifugado y se añadieron 500 μ L de solución de lavado y se centrifugó de 30 a 60 segundos. Posteriormente se desechó el flujo, dicho proceso se realizó dos veces. Se desechó el flujo y se centrifugó por un minuto más para remover los residuos de la solución de lavado.

Finalmente se transfirió la columna de centrifugado GeneJET a un tubo nuevo de 1.5 mL para microcentrífuga y se añadieron 50 μ L de buffer de elución al centro de la membrana de la columna de centrifugado GeneJET para eluir el plásmido de ADN y se incubó durante dos minutos a temperatura ambiente, se centrifugó durante dos minutos. Se desechó la columna y el plásmido de DNA purificado y se resguardó a -20 °C (Al-Shaibani et al., 2014).

13.3 Electroforesis

Se preparó un gel de agarosa al 1%, para el cual se pesó 1g de agarosa y este se disolvió en 100 mL de buffer TAE 1X. Después se calentó la mezcla en un matraz, con ayuda de un horno de microondas por 30 segundos hasta lograr una mezcla homogénea, esto evitando la ebullición violenta de la mezcla. Se vació con la mezcla de agarosa/buffer caliente evitando la formación de burbujas y se colocó un peine en un extremo de la cámara de electroforesis PowerPac (BIORAD, Singapur). Se dejó enfriar hasta que solidificó el gel, se colocaron 2 μ g/ μ L de muestras de ADN en cada pozo con buffer de carga y se corrió el gel a 70 voltios por una hora. Se retiró el gel y se dejó teñir durante 30 min en la disolución del buffer que anteriormente se seleccionó y se agregó bromuro de etidio (EtBr). El EtBr se agregó a una concentración de 500 ng/mL en el gel de agarosa (Rojas, 2017).

13.4 Validación de la transformación de las cepas *E. coli* transformadas mediante fluorescencia en ausencia de fósforo

Se realizaron las siguientes mediciones como se muestra en el **cuadro 3** utilizando el microscopio confocal-multifotónico LSM 710 NLO del Instituto Politécnico Nacional, Campus Zacatenco para determinar la fluorescencia de las cepas. Se tomaron diferentes colonias de cada una de las cepas transformadas directamente de una caja Petri con agar LB, previamente

incubadas a 37 °C por 24 h. Estas colonias fueron depositadas en tubos Eppendorf con 1.5 mL de agua destilada y se tomaron 200 µL de cada tubo para colocarse en un portaobjeto y medirse en el microscopio confocal a 2 longitudes de onda, 405 y 488 nm.

Se validó estadísticamente la fluorescencia bajo la ausencia de fósforo de las cepas transformadas mediante un análisis de varianza seguida de una prueba de Tukey utilizando R studio, con una α de 0.05, donde se tomó como referencia el trabajo de (Torres-Bacete et al., 2021)

Cuadro 3. Combinaciones de plásmidos y cepas.

Cepa <i>E. coli</i>	Plásmido	Cepa nueva	Nombre
		0% de Pi	asignado
296	PphoA	296-PphoA	Colonia B
BL21	Pliar 53	BL21 - Pliar	Colonia C

13.5 Construcción del dispositivo de medición

Se propuso el desarrollo de un biosensor que permita medir la fluorescencia de bacterias sensibles a fosfatos en medio líquido, para esto el sistema logró tener la posibilidad de intercambiar la fuente de excitación para poder irradiar bacterias modificadas genéticamente con el gen de la GFP, la cual, de acuerdo a la literatura, es sensible a 395 nm y 488 nm, esto permitió tener una versatilidad importante al momento de elegir el mejor filtro óptico. El sistema también cuenta con un filtro IR (Infrarrojo), para evitar que la muestra se caliente y un contenedor en el cual se podrá depositar la muestra, la cual se posiciona de manera que, permita ser irradiada con la fuente de iluminación, con la longitud de onda de 395 nm y 488 nm (con ayuda de filtros ópticos), y también permite medir la fluorescencia a través de los fotodiodos los cuales se buscó que su pico de respuesta máxima esté en los 508 nm (verde). No obstante, se buscó darle más versatilidad puesto que se desarrolló un sistema de adquisición de datos y una interfaz para la rápida consulta de resultados.

Con la finalidad de tener una cuantificación directa de la cantidad de fosfatos interactuando con las bacterias transformadas, fue necesario el diseño de un fluorómetro. Desde el diseño mecánico de la cámara de aislamiento que contenga el arreglo óptico basado en la información previamente adquirida a través del microscopio confocal. Asimismo; el arreglo óptico consta de dos etapas principales, como se muestra en la **Figura 2**. La primera es donde se genera la excitación de la muestra, y la segunda es la adquisición y procesamiento de la señal de fluorescencia. Ambos acotados a través de un arreglo de filtros ópticos para evitar que las señales de excitación y de fluorescencia se superpongan.

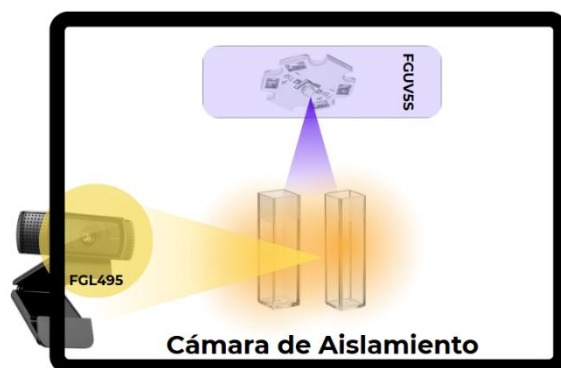


Figura 2. Cámara de aislamiento y arreglo óptico

La primera etapa está conformada de un arreglo óptico de un LED de alta intensidad modelo, LST1-01G01-UV04-00 del fabricante New Energy. El cual tiene una longitud de emisión de onda de 405 nm. Es bien sabido que este tipo de leds de alta intensidad generan una serie de armónicos los cuales nos pueden contaminar la respuesta de fluorescencia de nuestro objeto de estudio. Por lo cual; a través del filtro óptico FGUV5S fabricado por Thorlabs (Newton, NJ, Estados Unidos); nos permite acotar la longitud de onda de emisión para la excitación de la muestra. Mientras que, para adquirir la señal de respuesta, es a través de una cámara genérica que se puede adaptar a la cámara de aislamiento. Sin embargo, lo importante es suprimir las longitudes de onda cercanas a los 509 nm de respuesta de fluorescencia. Lo anterior; se lleva a cabo a través del filtro FGL495 por Thorlabs (Newton, NJ, Estados Unidos), el cual es un filtro pasa-alta para sólo dejar pasar de los 495 nm para adelante. Lo anterior, para suprimir las señales de excitación y sólo observar el efecto de la fluorescencia de las bacterias transformadas.

Aunado a lo anterior, el arreglo óptico y todos los componentes se sitúan dentro de la cámara de aislamiento. Se diseñó una cámara bastante versátil con la finalidad de hacer mediciones de diferentes tipos; como se muestra en la **Figura 3**. Es decir; con led o láser. Con la finalidad de evaluar diferentes resultados. Sin embargo; por la homogeneidad de la

iluminación a las muestras, se decidió trabajar con el led. Asimismo, montar una cámara web para adquirir las imágenes y hacer procesamiento de ellas.

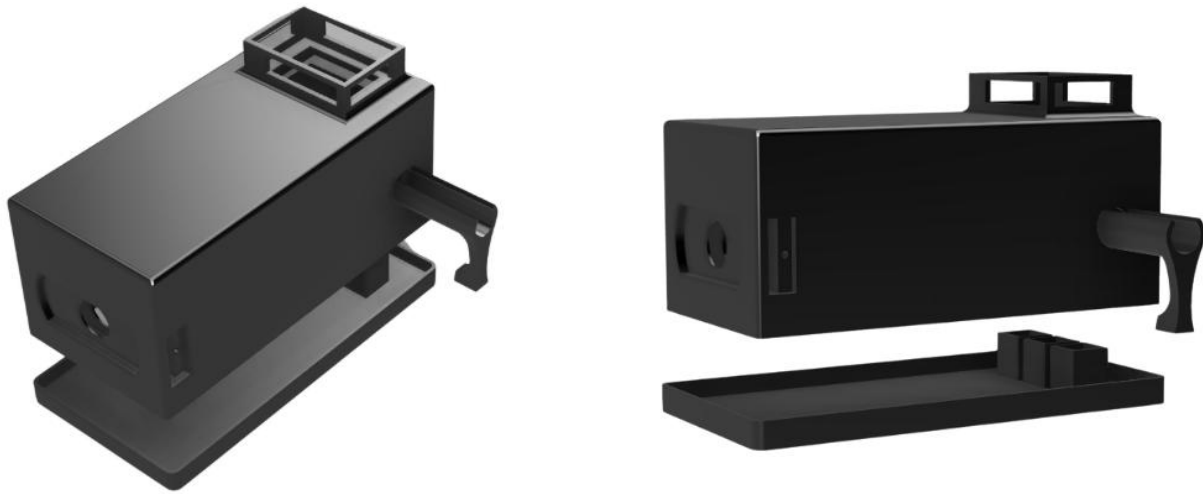


Figura 3. Diseño mecánico de la cámara de aislamiento

13.6 Ensayo de actividad de promotor basado en fluorescencia

13.6.1 Mediciones utilizando medio mínimo MOPS

Se precultivaron las cepas de *E. coli* portadoras de P_{liar} 53 y P_{phoA} durante la noche en medio líquido LB con kanamicina a una concentración de 50 µg/mL a 37 °C y una agitación de 200 rpm durante 20-22 h. Al día siguiente se tomó el 20% del cultivo de cada una de las cepas y se inoculó en medio mínimo MOPS con 5mM de fosfato de potasio dibásico KH₂PO₄, con kanamicina a una concentración de 50 µg/mL a 37 °C y una agitación de 200 rpm durante 20-22 h, o hasta que el cultivo alcanzó una fase exponencial media-tardía (0.6-0.9 OD₆₀₀). Luego, las células bacterianas se sedimentaron a 1500 g, temperatura ambiente durante 10 min y se lavaron 3 veces en agua destilada. Para realizar las mediciones se agregó el pellet lavado a 3 mL de medio MOPS con diferentes concentraciones de KH₂PO₄ y se colocaron en cubetas de cuarzo para espectrofotómetro para realizar la medición en el dispositivo de medición. La actividad de los promotores fue monitoreada usando el sistema de medición generado a una λ Excitación de 488 nm y una λ Emisión de 509 nm (Uluseker et al., 2019).

13.6.2 Mediciones utilizando medio LB

Se precultivaron las cepas de *E. coli* portadoras de Pliar 53 y PphoA durante la noche en medio líquido LB con kanamicina a una concentración de 50 µg/mL a 37 °C y una agitación de 200 rpm durante 20-22h o hasta que las células alcanzaron una fase exponencial media-tardía (0.6-0.9 OD₆₀₀). Luego, las células bacterianas se sedimentaron a 1500 g, temperatura ambiente durante 10 min y se lavaron 3 veces en agua destilada. Para realizar las mediciones se agregó el pellet lavado a 3 mL de medio MOPS con diferentes concentraciones de KH₂PO₄ y se colocaron en cubetas de cuarzo para espectrofotómetro para realizar la medición en el dispositivo de medición. La actividad de los promotores fue monitoreada usando el sistema de medición generado a una λ Excitación de 488 nm y una λ Emisión de 509 nm (Uluseker et al., 2019).

Se realizaron mediciones para cada una de las concentraciones de fosfatos (0 mM, 1mM y 50mM) y se determinó cuál es la mejor a través del análisis ANOVA seguida de una prueba de Tukey en el programa JMP, con un α de 0.05.

13.7 Análisis Estadístico

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y se utilizaron pruebas estadísticas de t de student y Tukey ($\alpha= 0.05$) para determinar qué cepa fue la más eficiente para la cuantificación de la fluorescencia. Se utilizó el programa estadístico JMP, versión 11 para la interpretación de los resultados.

XIV. Resultados y Discusión

14.1 Transformación bacteriana

14.1.1 Primera Transformación

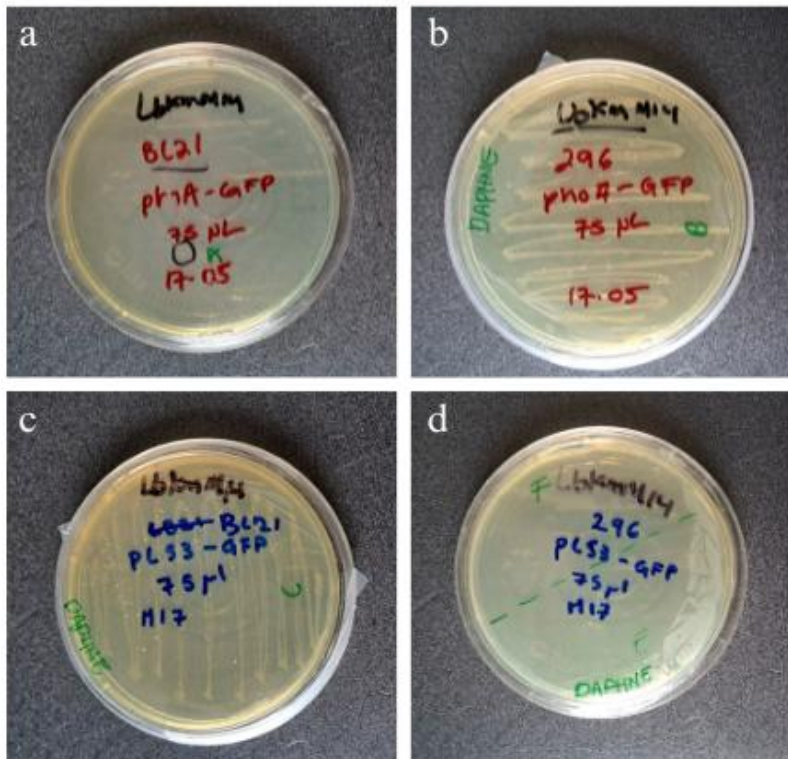


Figura 4. Primeras cepas de transformación *E. coli*. a) la combinación cepa-plásmido fue de BL21-PphoA, b) 296-PphoA, c) BL21-PL23 y d) 296-PL53.

En la **Figura 4** se presentan los cultivos de 24 h en agar LB con kanamicina a una concentración de 50 µg/mL. En todas, el inóculo fue de 75 µL. De las 4 combinaciones finales, solo 2 siguieron creciendo en las siguientes resiembras, las denominadas “Colonia B” y “Colonia C”, las cuales corresponden a la combinación 296-PphoA y BL21-PL53, como se muestra en la **Figura 5**. El resto dejó de crecer con el tiempo.

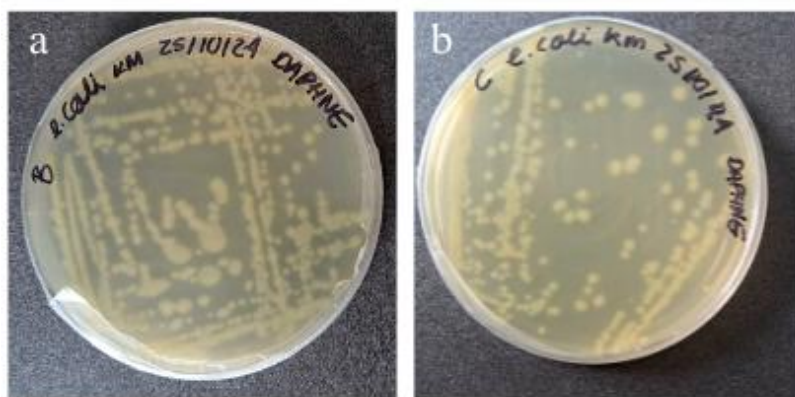


Figura 5. Cepas transformadas de *E. coli* octubre 2024.

14.1.2 Segunda Transformación

Para tener una mayor variedad de cepas, se decidió volver a transformar *E. coli* utilizando una cepa diferente y 2 métodos de transformación, choque térmico y electroporación. En la **Figura 6** se presentan 2 cultivos de 24 h en agar LB con kanamicina a una concentración de 50 µg/mL. En esta ocasión se utilizó la cepa Top 10, proporcionada por el Instituto Tecnológico de Celaya (TECNM). La **Figura 6 a**, hace referencia a la combinación cepa-plásmido Top10-PL53 y la **Figura 6 b**, a Top10-PphoA. De esta segunda transformación se obtuvieron en total 4 cultivos, 2 mediante electroporación y 2 de choque térmico. Con las combinaciones Top 10-Plar 53 y Top 10-PhoA.

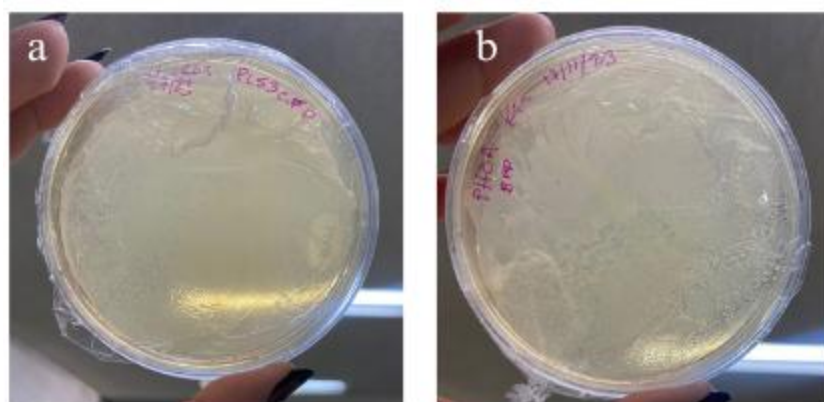


Figura 6. Segunda transformación, cepa top 10, a) con plásmido PL53 y b) con plásmido PphoA.

14.1.3 Tercera transformación bacteriana

Se decidió hacer una tercera transformación debido a que, como se presentará más adelante, los resultados obtenidos con las anteriores 3 combinaciones no fueron favorables para el desarrollo del biosensor. Esta nueva transformación se realizó utilizando nuevamente la cepa Top 10 y los dos plásmidos PphoA y PL53 en agar LB y kanamicina a una concentración de 50 µg/mL (**Figura 7**).

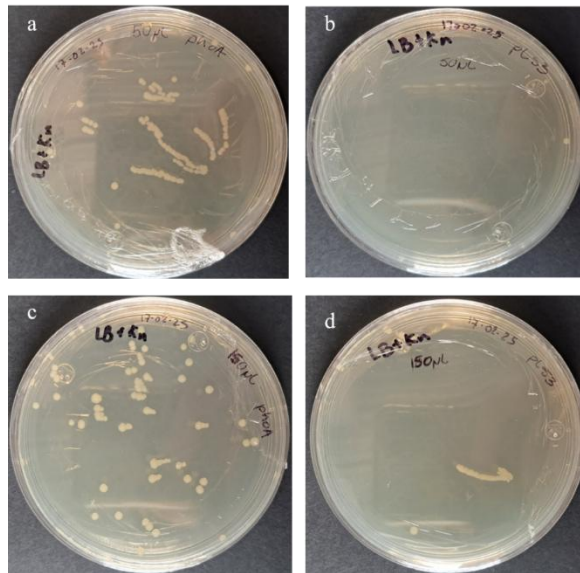


Figura 7. Tercera transformación, cepa Top 10.

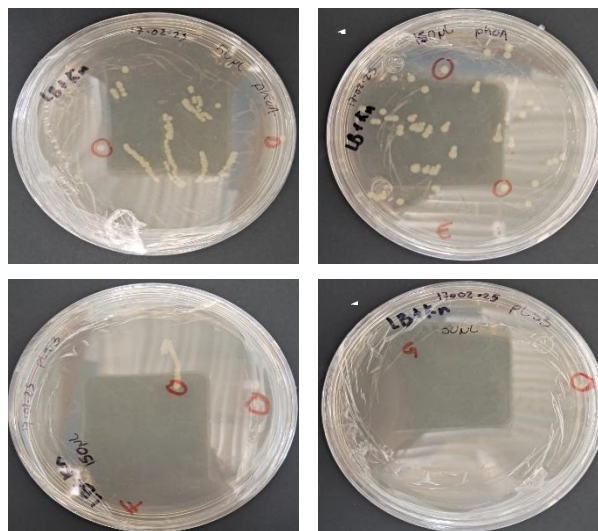


Figura 8. Colonias seleccionadas

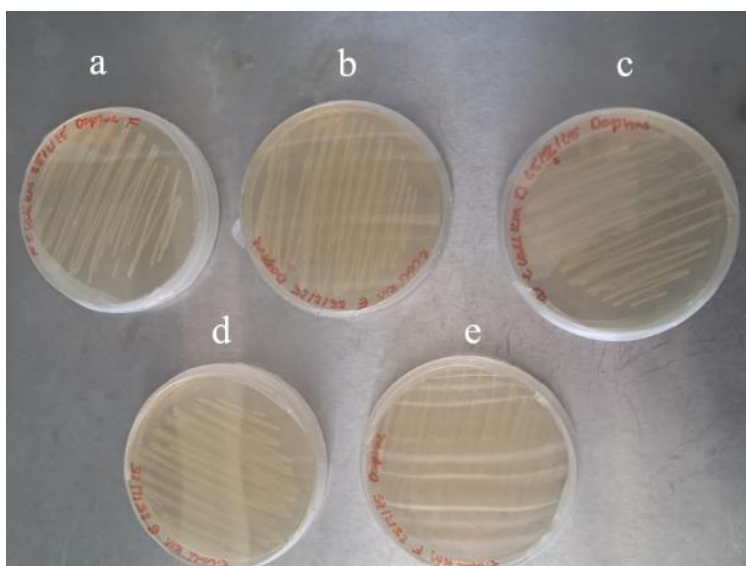


Figura 9. Colonias D, E, y F, a) y e) colonia F, c) colonia D, b) y d) colonia E.

En la **Figura 9** se presentan las cepas que siguieron creciendo, obtenidas de las colonias seleccionadas en la **Figura 8**, las cuales fueron nombradas colonia D y E, correspondientes al plásmido PphoA y la cepa F, con el plásmido PL53. Todas correspondientes a la cepa Top 10. Debido a que las colonias E y D comparten el mismo plásmido, y por cuestiones de tiempo de entrega, se decidió continuar las mediciones únicamente con las colonias E y F.

14.2 Electroforesis

Como se aprecia en la **Figura 10**, no se pudieron obtener bandas distinguibles correspondientes a los plásmidos PL52 y PphoA en ninguna de las electroforesis de la primera (**Figura 10 a**) y la segunda **Figura 10 b**) transformación. Si comparamos ambas figuras se podría decir que las colonias B y C muestran bandas un poco más claras a diferencias de las demás.

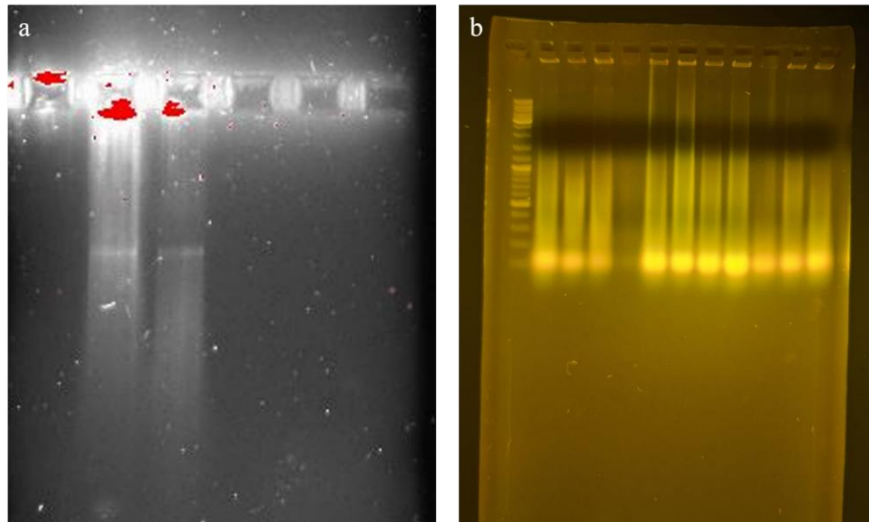


Figura 10. a) Electroforesis colonias B y C y b) Electroforesis cepas transformadas en Instituto Tecnológico de Celaya.

En la **Figura 11**, que corresponde a la a) primera y b) segunda electroforesis de las colonias E y F, tampoco se pudieron desarrollar bandas claras que nos indicaran una clara presencia de ADN plasmídico. Esto nos hace pensar la posibilidad que el plásmido se haya dañado con el tiempo, ya que estas pruebas fueron realizadas en marzo del 2025 y los plásmidos llegaron a Querétaro desde mayo de 2023. O que incluso, desde que llegaron la primera vez, hayan sufrido alguna afectación.

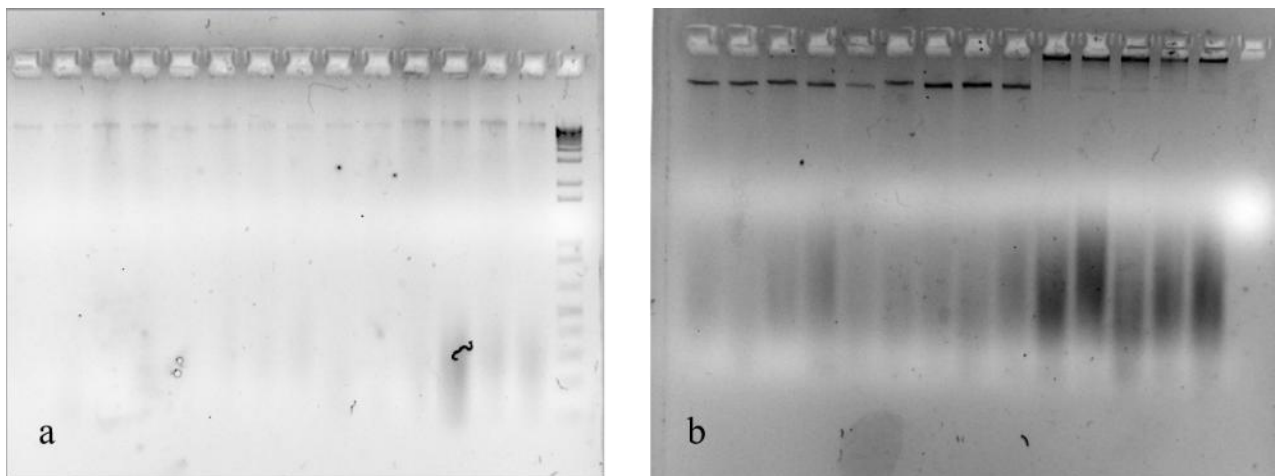


Figura 11. a) Primera y b) Segunda electroforesis de colonias E y F.

14.3 Determinación de cepa transformada más eficiente con sensibilidad a fosfatos

Para poder asegurar que se estaba induciendo una respuesta ante la ausencia de fósforo, se llevaron las primeras (B y C) y segundas colonias de bacterias transformadas al Instituto Politécnico Nacional en Zacatenco, Ciudad de México. En las **Figuras 12, 13 y 14** se presentan las imágenes captadas por el microscopio confocal por cada una de las cepas. La microscopía confocal resulta efectiva para la visualización de fluorescencia en microorganismos modificados con proteínas como la GFP y se ha utilizado anteriormente para monitorear la actividad de esta (Rusch et al. 2024; Tian et al.2024).

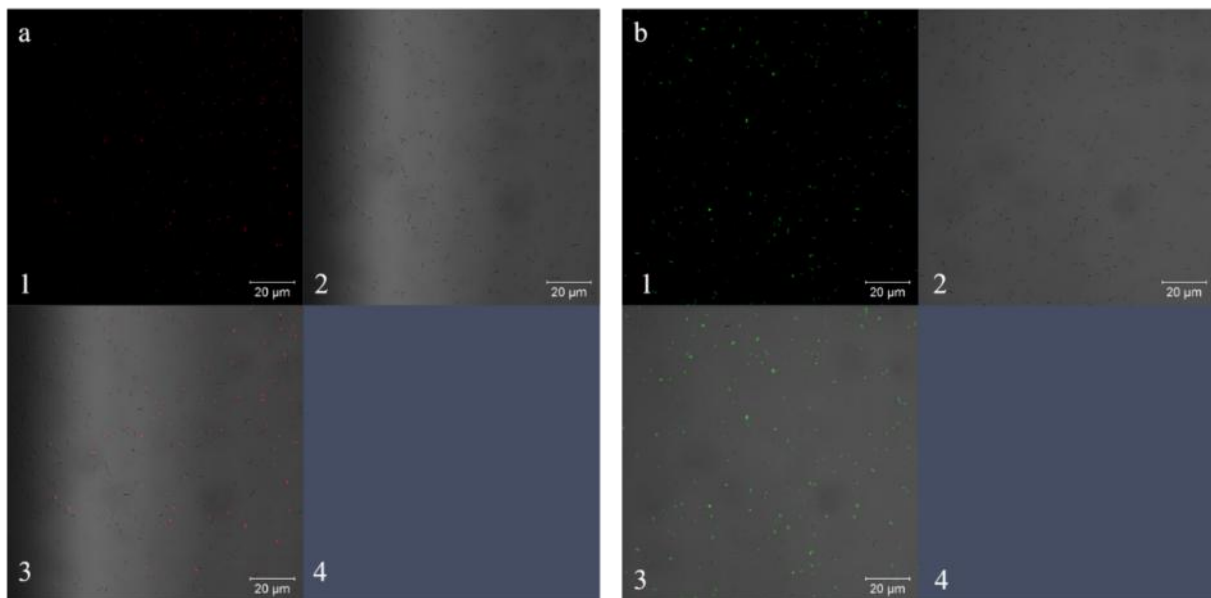


Figura 12. Microscopía confocal de *E. coli* colonia B con longitud de onda de λ excitación a) 405nm y b) 488 nm con una λ emisión en 509 nm. 1) bacterias que emiten fluorescencia, 2) todas las bacterias enfocadas, 3) superposición de todas las bacterias y las que presentan fluorescencia, 4) blanco.

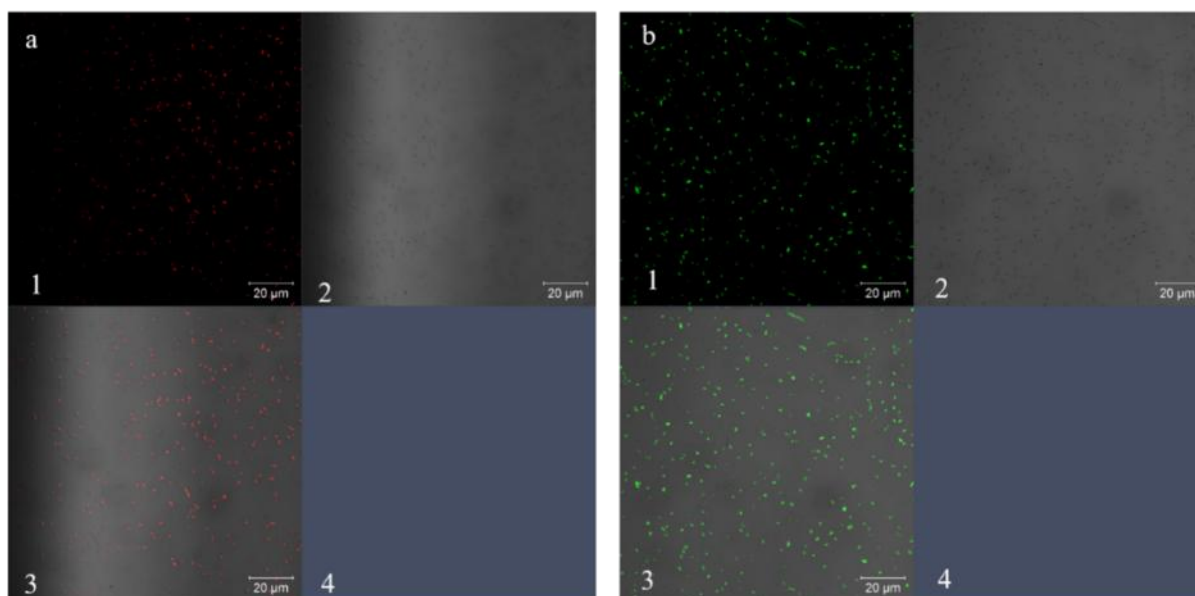


Figura 13. Microscopía confocal de *E. coli* colonia C con longitud de onda de λ excitación a) 405nm y b) 488 nm con una λ emisión en 509 nm. 1) bacterias que emiten fluorescencia, 2) todas las bacterias enfocadas, 3) superposición de todas las bacterias y las que presentan fluorescencia, 4) blanco.

Todas las cepas obtenidas de la segunda transformación fueron descartadas. Únicamente la fluorescencia de 2 de ellas, las denominadas “colonia 3” y “colonia 4” (**Figura 14**) fue detectada por el microscopio confocal, no sin antes tener que ajustar la intensidad del láser al 100% para que las bacterias pudieran emitir la mayor cantidad de luz posible, modificación que no fue necesaria en las demás mediciones con las colonias B y C. Al no ser capaces de ser detectadas sin esta configuración, se decidió no tomarlas en cuenta para los siguientes experimentos.

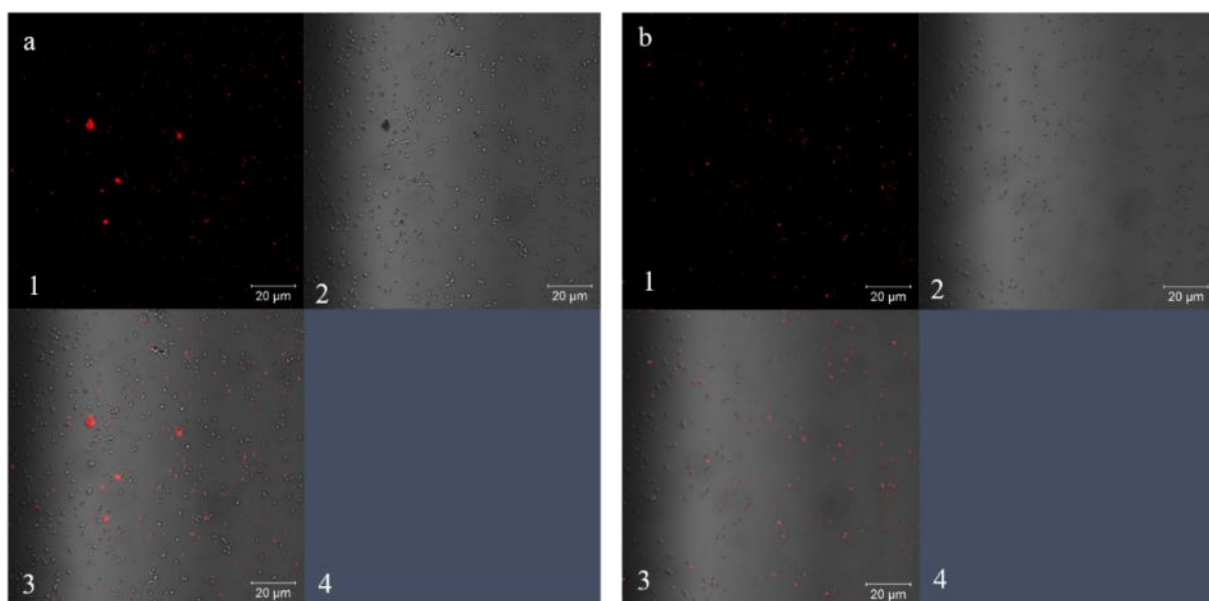


Figura 14. Microscopía confocal de *E. coli* a una longitud de onda de 405 λ excitación y 509 λ emisión en 509 nm con una intensidad del láser de 100% a) “colonia 3” y b) “colonia 4”, ambas con la misma combinación Top 10- PphoA. 1) Bacterias que emiten fluorescencia, 2) todas las bacterias enfocadas, 3) superposición de todas las bacterias y las que presentan fluorescencia, 4) blanco.

Todos los promedios de las intensidades de fluorescencia detectadas por el microscopio confocal fueron evaluadas estadísticamente en el programa R studio, mediante un análisis de varianza ANOVA y una prueba de Tukey con un $\alpha = 0.05$. Este análisis se realizó con el propósito de identificar la cepa que emitiera mayor fluorescencia en ausencia de fósforo.

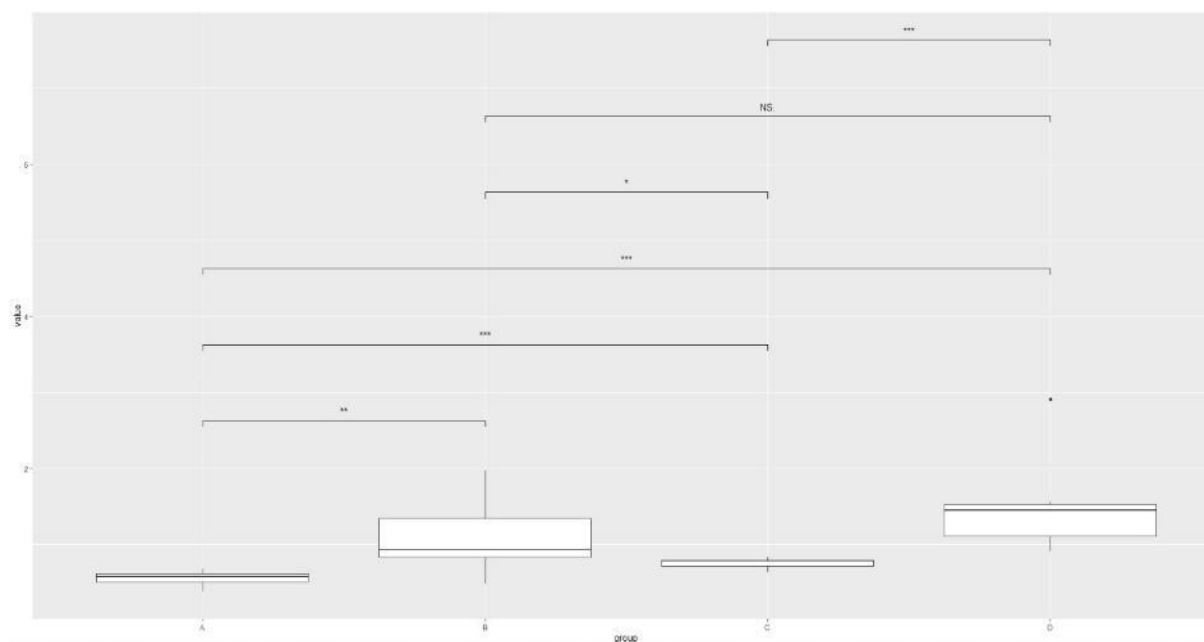


Figura 15. Diagrama de caja de las intensidades de fluorescencia colonias B y C. Grupo A: colonia B 405nm; Grupo B: colonia C 405 nm; Grupo C: colonia B 488 nm; Grupo D: colonia C 488 nm. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar. Nivel de significancia (α) *** = 0.001, ** = 0.01, * = 0.1, NS = No Significativo.

Con los resultados obtenidos (**Figura 15**), se determinó que los grupos B y D presentaron la mayor emisión de fluorescencia, mientras que los grupos A y C fueron los que expresaron menos. A pesar de que no se demostrara diferencia significativa entre los grupos B y D, se tomó como mejor opción el Grupo B, correspondiente a la colonia C, ya que, al ser λ excitada con una longitud de onda de 405 nm, está más separada del punto

de λ emisión (509 nm), que el grupo D, en el cual la λ excitación se encuentra en 488 nm. Uno de los puntos importantes a considerar en el desarrollo de un sistema analítico óptico, como en caso de un biosensor, es que los picos de λ emisión y λ excitación deben estar lo más separados posible, ya que esto tendría como resultado una medición más exacta. Existe el riesgo de que haya error en la medición si estos picos se encuentran muy pegados, ya que el filtro no puede hacer bien su trabajo y no es capaz de filtrar por completo toda la luz de emisión, ya que interfiere con la señal de fluorescencia y como resultado se tienen datos erróneos (Lewandowska-Andralojc y Marciniak., 2019). Es por esto que además de tener que cuidar estos picos, se tiene que trabajar de preferencia, con filtros ópticos precisos y de buena calidad (Yang et al., 2013).

14.4 Cuantificación de fluorescencia

A continuación, se describen los pasos que se realizaron para la cuantificación de la fluorescencia utilizando Python y Matlab.

1. Se tomó la imagen con el equipo (paso 1 de la **Figura 16**).
2. Se seleccionó la parte central, que es donde se encuentra el contenedor (paso 2 de la **Figura 16**).
3. La imagen tomada por el equipo mostrado en la **Figura 3**, fue contrastada para establecer manualmente la zona a cuantificar, esto debido a que la imagen original la mayoría de las veces no permitía visualizar el contenedor del todo y por lo tanto no podíamos cuantificar la zona de fluorescencia (esto se realizó con un código en Python, ver anexo 1).
4. Una vez mejorado el contraste de la imagen original, se seleccionó manualmente con el mouse la zona a cuantificar y dichas coordenadas se registran en un archivo en Excel para posteriormente ser leídas. Esto se realizó utilizando un algoritmo sencillo de Matlab (ver anexo 2).
5. Una vez seleccionada la zona, se cuantificó el promedio del mapa del verde de dicha

zona, la zona resaltada en color azul (ver paso 3 de la **Figura 16**), esto se realizó utilizando un algoritmo de Python (ver anexo 3).

6. Alternativamente y con fines de visualizar mejor qué zona se cuantificó, sobre la imagen contrastada, se remarca en azul la zona que se cuantificó (ver paso 5 de la **Figura 16**).
7. El promedio del color verde de la zona remarcada en el paso 4, se agregó a una hoja de Excel para su posterior análisis estadístico.

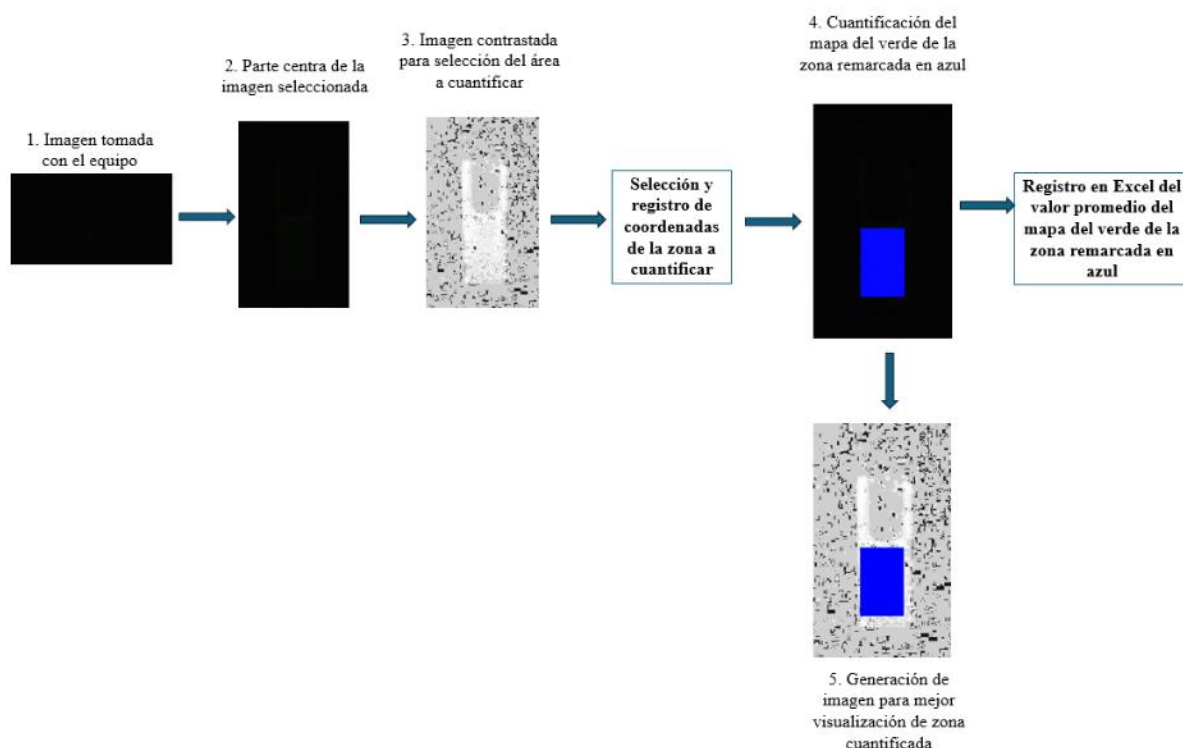


Figura 16. Procedimiento de procesamiento de imágenes para medir la fluorescencia

14.5 Medición de fosfato con biosensor

Debido a que durante las primeras mediciones se confirmó que el uso de medio LB durante los precultivos y cultivos, no era el adecuado debido a que por sí solo se detectaba fluorescencia en las imágenes captadas en el fluorómetro, es que se tomó en consideración comparar ambos medios, MOPS y LB durante las mediciones para ver si afectaba o no el resultado final de la medición. Además de que el medio MOPS estaba muy restringido en

nutrientes, lo que afectaba el crecimiento de las bacterias, ya que 48 h eran insuficientes para alcanzar la OD necesaria de 0.6 a 0.9. Es por esto que se llegó a la conclusión de que era necesario hacer los precultivos en medio LB líquido, para activar el crecimiento de las cepas y después hacer 3 lavados con agua destilada para retirar la mayor cantidad posible de los residuos del LB. Recordando el fundamento de los promotores PL53 y PphoA presentes en las construcciones genéticas de la cepa TOP 10, se esperaba que, a concentraciones menores de fosfatos, se viera activado el mecanismo de respuesta a la ausencia de fósforo, a través de la GFP, como sucede con estos mismos promotores en la cepa *E. coli* W (ATCC 9637) utilizados por Torres-Bacete et al., (2021), donde PL53 se consideró como uno de los promotores sintéticos más eficientes para expresar fluorescencia, cuya respuesta se encontraba muy similar a PphoA, el cual es el promotor nativo dentro de las *E. coli*. Sin embargo, en la **Figura 17**, donde se evaluó la colonia E, no se puede apreciar claramente este patrón. El valor más alto de fluorescencia (8.28), se alcanzó con los cultivos de medio LB líquido y una concentración de 50mM de fosfato de potasio dibásico K_2HPO_4 , obteniendo una diferencia significativa con los demás tratamientos. El nivel más bajo, (6.66) se obtuvo con medio MOPS a 0 mM y también presenta diferencia significativa en comparación a los demás tratamientos. Siguiendo la regla de lo que se conoce de los sistemas de ausencia de fósforo (menos fosfato, menor fluorescencia), este tratamiento debió de haber sido el que emitiera más fluorescencia.

El medio LB (Luria-Bertani) es muy utilizado debido a que, gracias a su fórmula, permite un crecimiento rápido, además de alcanzar buenos rendimientos de crecimiento en muchas especies de bacterias. Debido a la naturaleza de los nutrientes presentes en el medio como la triptona y el extracto de levadura, se aportan cantidades importantes de fosfatos orgánicos e inorgánicos, cuya concentración exacta es desconocida debido a que varía entre lotes (Sezonov et al., 2007). Los fosfatos presentes en LB pudieron haber causado la represión del regulón Pho, quien es quien responde en ausencia de este, ocasionando un valor de fluorescencia más alto que los demás tratamientos.

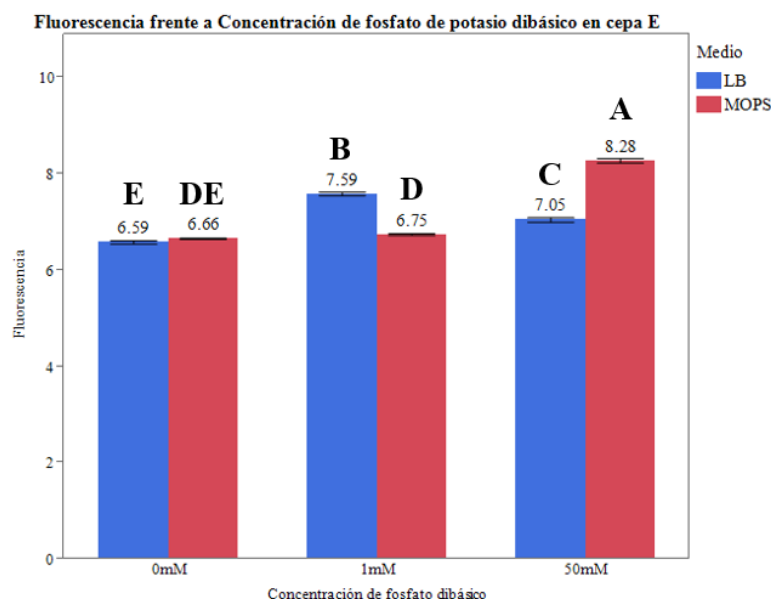


Figura 17. Fluorescencia colonia E evaluada frente a 3 concentraciones de fosfato (0, 1 y 50 mM) así como en medio LB y MOPS. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos y los resultados se expresan como la media \pm el error estándar, basado en una prueba t de student, $\alpha=0.05$.

A diferencia del resultado anterior, con la colonia F, representada en la **figura 18** si se puede apreciar que tanto para los pre cultivos y cultivos en el medio MOPS, como el LB, si hay una congruencia con el mecanismo de acción de los plásmidos. Los dos valores más altos con cada medio en LB (9.51) y en MOPS (7.14), se alcanzaron con la menor concentración de K_2HPO_4 , (1 mM). Por otro lado, los valores más bajos se obtuvieron a mayor concentración de fosfato (50Mm), tanto en LB (8.76), como en MOPS (6.73). Aquí el hecho de que las cepacrecidas en medio LB hayan alcanzado valores de fluorescencia más altas, pudo haber

tenido que ver con la presencia de fósforo en el medio LB.

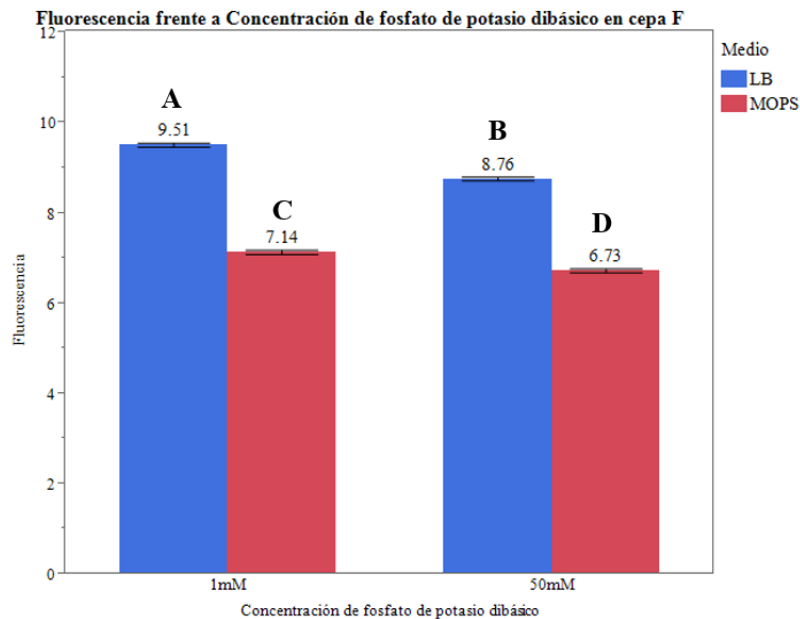


Figura 18. Fluorescencia colonia F evaluada frente a 2 concentraciones de fosfato (1 y 50 mM) cultivadas en medio LB y MOPS. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos y los resultados se expresan como la media \pm el error estándar, basado en una prueba t de student $\alpha=0.05$.

El que ambas colonias E y F no hayan tenido la respuesta esperada a las diferentes concentraciones de fósforo confirma lo presentado por Torres-Bacete et al. (2021), que menciona que no todas las colonias transformadas con los promotores presentan la capacidad de mostrar fluorescencia máxima a bajas concentraciones de K_2HPO_4 , y de reprimirse por completo a altas concentraciones. En el caso de esa investigación en particular, se seleccionaron únicamente las colonias que sí presentaban esas características, aunque es importante tomar en cuenta que no se menciona claramente algún porcentaje de éxito de la transformación descrita en su trabajo. Cabe aclarar también, que, en este estudio, no pudieron verse diferencias significativas en la fluorescencia a las concentraciones micro molares que en esa investigación se reportaron. Aunque no se podría decir a explícitamente a qué se debieron estas diferencias en las cuales no se obtuvieron resultados a las mismas concentraciones, si se conocen ciertas probables causas que pudieron afectar la construcción genética final, las cuales podrían relacionarse con el cambio de cepa, ya que no se utilizó la misma durante la transformación.

Debido a este cambio, se pueden presentar diferentes fenómenos. Uno de ellos es que, al ser una cepa diferente, esta puede tener un sistema regulador de fósforo diferente al que activa la respuesta en la cepa original. Otra acción que se puede presentar es la presencia de represores o activadores adicionales que modulen o anulen la expresión de los promotores (Martín-Martín et al., 2018). Este cambio puede ocasionar que el promotor no se active o que se active de forma anómala, como se mostró en la **Figura 17** que no se pudo identificar un patrón congruente con su comportamiento. Otro posible motivo puede ser que la cepa TOP 10 pueda tener un metabolismo basal diferente que *E. coli* W. Esto implica que existan alteraciones en las vías de la glucólisis, el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y la vía de las pentosas fosfato (PP) en células portadoras de plásmidos (Gonçalves et al., 2011), lo cual puede afectar la expresión del promotor. Esto debido a que si se presentan altas tasas de glucólisis o de la vía de PP, se tiene como consecuencia un mayor flujo de Pi intracelular que engañe al sistema de detección y en respuesta se no se active el regulón Pho, quien es el responsable de activarse a bajas concentraciones de fósforo. En ocasiones también se ha encontrado que mutaciones o polimorfismos en las proteínas reguladoras PhoR y PhoB, lo que puede causar afecciones en la fosforilación y activación del promotor (Yamada et al., 1989).

En la **Figura 19**, se compara la fluorescencia emitida por cada una de los cultivos E y F, en medio MOPS, donde se destaca la colonia F que sigue el comportamiento esperado, ya que alcanza su valor de fluorescencia más alto en 7.14 a una concentración de 1 mM y una fluorescencia menor de 6.73 a una concentración 50mM de K₂HPO₄. En todos los tratamientos se muestra una diferencia significativa. Por lo contrario la cepa E, presenta un comportamiento invertido, presentando mayor fluorescencia (8.28) a una concentración de 50 mM de K₂HPO₄.

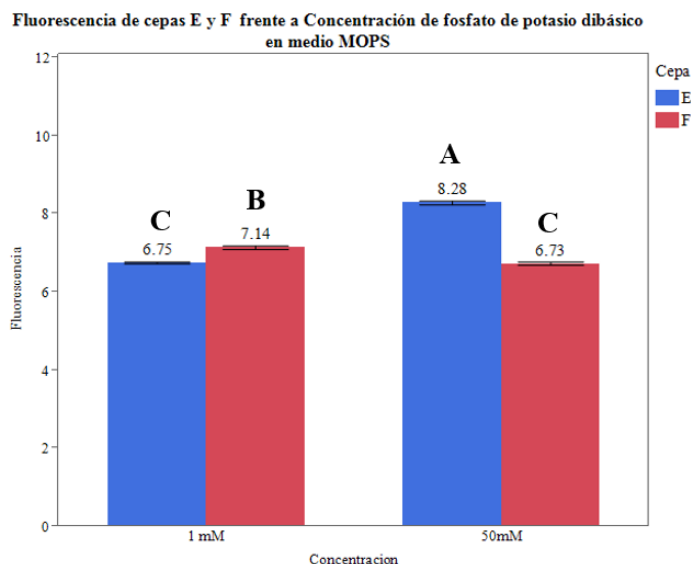


Figura 19. Se muestran los valores promedio de fluorescencia de las colonias E y F frente a 2 concentraciones de fosfato 1 mM y 50 mM, cultivadas en medio MOPS. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos y los resultados se expresan como la media \pm el error estándar, basado en una prueba t de student $\alpha = 0.05$.

Como resultado en la **Figura 20**, se compara la fluorescencia emitida por cada una de los cultivos E y F, ahora en medio LB, donde se destaca que la colonia F sigue el comportamiento esperado, ya que alcanza su valor de fluorescencia más alto en 7.59 a una concentración de 1mM. En cuanto a la cepa E, a pesar de que pareciera que se comporta de forma esperada ya que se obtuvo una fluorescencia más alta a menor concentración de K_2HPO_4 , recordemos que a nivel de 0 Mm presentado en la **Figura 17**, se obtuvo una lectura de 6.59, que no es más alto que los 7.59 a una concentración de 1mM presentados en la **Figura 20**. Debido a esto, se tiene la duda de si algunos de los factores mencionados anteriormente, tuvieron algún efecto que afectara la cuantificación de fósforo.

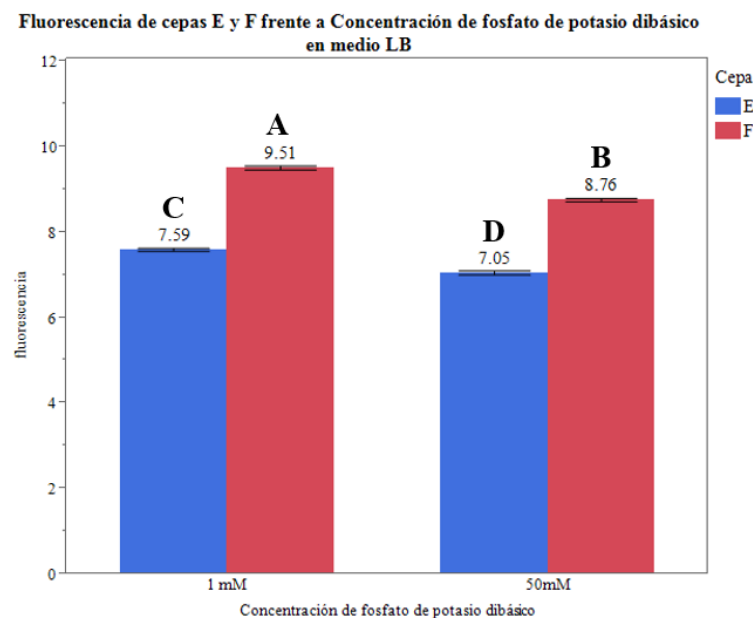


Figura 20. Se muestran los valores promedio de fluorescencia de las colonias E y F frente a 2 concentraciones de fosfato 1 mM y 50 mM, cultivadas en medio LB. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos y los resultados se expresan como la media \pm el error estándar, basado en una prueba t de student $\alpha = 0.05$.

En el **Cuadro 3** se describen los genotipos de 5 cepas diferentes de *E. coli* en cuanto a la expresión de la fosfatasa alcalina (PhoA), enzima relacionada con el regulón Pho (regulador de genes relacionados con la respuesta a escasez de fosfato) que responde a los niveles de Pi en el medio. Cuando hay poco fosfato disponible, se activa PhoA con el objetivo de ayudar a la célula a conseguir fósforo y cuando este está se encuentra en abundancia, se reprime. El sistema PstSCAB-PhoU es un sistema de transporte de fosfato, encargado de la regulación del regulón Pho y está compuesto por una serie de genes (pstS, pstC, pstA, pstB y phoU) y proteínas (PstS, PstC, PstA, PstB y PhoU) relacionadas con el transporte de fosfatos dentro de *E. coli* (Wanner, 1993).

Las cepas BL21, 296, y Top 10 fueron las que se utilizaron durante el desarrollo de esta investigación, debido a que fueron las que se proporcionaron por la Universidad Autónoma de Querétaro, campus Aeropuerto y el Instituto Tecnológico Nacional de México, campus Celaya. Es probable entonces que las colonias B y C, al ser transformadas con la combinación 296-PphoA y BL21-PL53, presentaran problemas en la función del sistema de transporte PstSCAB-PhoU, como se muestra en el **Cuadro 3**. En el caso del uso de la cepa BL21, se reporta una inducción débil en condiciones de bajo fosfato, debido a una regulación deficiente en el sistema PstSCAB-PhoU, causando una expresión de phoA muy baja, lo que se traduce a una expresión no confiable (Gardener et al., 2014). Debido a que no se encuentran actualmente referencias del uso de la cepa 296 para este tipo de pruebas, habla de que posiblemente también tenga problemas dentro del Sistema PstSCAB-PhoU y por eso no sea considerada para este tipo de análisis. Finalmente, la única de las 3 cepas usadas, la Top 10, si cuenta con un mecanismo de acción funcional (Torrauni, 1990; Santos-Beneit, 2015) como es el caso del descrito por la *E. coli* W (ATCC 9637) utilizada por Torres-Bacete et al. (2021). Sin embargo, no se descarta el hecho de que haya ocurrido algún error dentro del sistema que no permitió una medición que siguiera el mecanismo en ausencia de fósforo. Como dato adicional, la cepa 291, no se recomienda tampoco debido a posibles mutaciones en los genes psts o en la proteína PhoU, lo que impide exista una respuesta al fosfato.

Cuadro 4. Comparación de genotipo de diferentes cepas de *E. coli* para sistemas reguladores de fosfato.

Cepa <i>E. coli</i>	Sistema PstSCAB-PhoU	Estado funcional	Regulación de phoA	Referencias
Top 10	Presente y funcional	Activo y regulado	Inducida en condiciones de bajo fosfato y reprimida en alto fosfato	Torriani, 1990, Santos-Beneit, 2015.
BL21	Presente, aunque con regulación deficiente	Parcial o atenuado	Inducción débil en condiciones de bajo fosfato	Gardner et al., 2014.
296	Desconocido	Desconocido	Desconocido	No encontradas
W (ATCC 9637)	Presente y funcional	Activo y regulado	Inducida en condiciones de bajo fosfato y reprimida en alto fosfato	Santos-Beneit, 2015.
291	Mutaciones (pst o PhoU)	Inactivo o disfuncional	No responde a fosfato	Rice et al., 2008, Santos-Beneit, 2015.

XV. Conclusión

Se logró transformar y encontrar una colonia de *E.coli* funcional para la detección de fosfatos en soluciones salinas a diferentes concentraciones de fosfatos. La denominada cepa F, que corresponde a la combinación del plásmido PL53 y la cepa TOP 10, fue la única de todas las cepas obtenidas en esta investigación que siguió el mecanismo de fluorescencia inducido por estrés en ausencia de fósforo, logrando una diferencia significativa ante dos concentraciones diferentes de fosfatos 1 y 50 mM. Adicional a esto, se consiguió desarrollar un dispositivo de medición portable capaz de proporcionar el ambiente y la longitud de onda necesaria (488 nm) para la detección de la fluorescencia emitida por la *E. coli* transformada. Es importante destacar que el no haber utilizado la misma cepa que la descrita por Torres-Bacete et al. (2021), pudo haber afectado la efectividad de los plásmidos PL53 y PphoA en las cepas utilizadas. Por lo tanto, se resalta la importancia de mantener la uniformidad en cuanto a la elección de cepas para poder asegurar la confiabilidad y reproducibilidad de los experimentos. A futuras investigaciones se sugiere conseguir la misma cepa que se utilizó originalmente y a su vez evaluar la efectividad de todas las cepas transformadas para poder evaluar entre ellas cual es la mejor en cuanto a sensibilidad e incluso ver la interacción con otros nutrientes en el medio. También se recomienda continuar la evaluación de todas las colonias transformadas e incluso repetir el experimento con la cepa F a más concentraciones de fosfatos, en resoluciones más bajas dentro del rango donde se detectaron diferencias significativas. Un futuro cercano en donde se pueda cuantificar nutrientes en tiempo real, a bajo costo y en campo podría estar más cerca de lo que pensamos, sin embargo, aún hay mucho trabajo por hacer.

XVI. Literatura Citada

- Bhardwaj, T. (2015). Review on Biosensor Technologies. *International Journal of Advanced Research in Engineering & Technology* 6 (2),36–62.
- Blackwell, M., Tandy, S., Hawkins, J. (2024). Soil nutrient testing kit. United Kingdom GB2626307. Rothamsted Research Limited. [https://patents.google.com/patent/GB2626307A/en?q=\(phosphate+biosensor+for+plants\)&oq=phosphate+biosensor+for+plants](https://patents.google.com/patent/GB2626307A/en?q=(phosphate+biosensor+for+plants)&oq=phosphate+biosensor+for+plants)
- Bonetto, M. C., Cortón, E., Pérgola, M. & Sacco, N. J. (2018). Biosensores y celdas de combustible microbianas: Ciencia con texto. *Química viva*, 14 (1), https://www.researchgate.net/publication/325428576_Biosensores_y_celdas_de_combustible_microbianas_Ciencia_con_texto/link/5b0d99fd0f7e9b1ed70118f1/download
- Borisov, S. M., & Wolfbeis, O. S. (2008). Optical biosensors. *Chemical reviews*, 108(2), 423–461.
- Brune, M., Hunter, J. L., Corrie, J. E. T., & Webb, M. R. (1994). Direct, Real-Time Measurement of Rapid Inorganic Phosphate Release Using a Novel Fluorescent Probe and Its Application to Actomyosin Subfragment 1 ATPase. *Biochemistry*, 33(27), 8262–8271. <https://doi.org/10.1021/bi00193a013>
- Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria CEDRSSA (2018). Fertilizantes. http://www.cedrssa.gob.mx/post_n-fertilizantes-n.htm
- D'Souza, S. F. (2001). Immobilization and stabilization of biomaterials for biosensor applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 96(1–3), 225–238. <https://doi.org/10.1385/ABAB:96:1-3:225>
- Dai, C., & Choi, S. (2013). Technology and Applications of Microbial Biosensor. *Open Journal of Applied Biosensor*, 2(3), 83–93. <https://doi.org/10.4236/ojab.2013.23011>
- Faridbod, F., Ganjali, M. R., Larijani, B., Norouzi, P., & Hosseini, M. (2014). Biosensors in Endocrinology- Review Article. *Iranian J Publ Health*, 43(1), 94–104.

- Franz, P., Gassl, V., Topf, A., Eckelmann, L., Iorga, B., & Tsiavalariis, G. (2020). A thermophoresis-based biosensor for real-time detection of inorganic phosphate during enzymatic reactions. *Biosensors and Bioelectronics*, 169(September), 112616. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112616>
- Gardner S.G., Johns K.D., Tanner R., McCleary W.R. (2014). The PhoU protein from *Escherichia coli* interacts with PhoR, PstB, and metals to form a phosphate-signaling complex at the membrane. *Journal of Bacteriology*, 196(9),1741-1752. doi: 10.1128/JB.00029-14.
- Gu, H., Lalonde, S., Okumoto, S., Looger, L. L., Scharff-poulsen, A. M., Grossman, A. R., Kossmann, J., Jakobsen, I., & Frommer, W. B. (2006). A novel analytical method for in vivo phosphate tracking. 580, 5885–5893. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.09.048>
- Gonçalves, G. A. L., Bower, D. M., Prazeres, D. M. F., Monteiro, G. A., & Prather K. L. J. (2011). Rational engineering of *Escherichia coli* strains for plasmid biopharmaceutical manufacturing. *Biotechnology Journal*. 7, 251-261. doi 10.1002/biot.201100062
- Grossman, A. R., Kossmann, J., Jakobsen, I., & Frommer, W. B. (2006). A novel analytical method for in vivo phosphate tracking. 580, 5885–5893. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.09.048>
- Hicks, M., Bachmann, T. T., & Wang, B. (2020). Synthetic biology enables programmable cell-based biosensors. *ChemPhysChem*, 21(2), 132-144.
- Jian, S., Xiurong, Y., Guoyong, L., Zhicai, X. (2020). Fluorescence method for detecting alkaline phosphatase activity. China CN110501318B, Changchun Institute of Applied Chemistry of CAS [https://patents.google.com/patent/CN110501318B/en?q=\(optical+phosphate+biosensor+for+nutrient+monitoring\)&oq=optical+phosphate+biosensor+for+nutrient+monitoring](https://patents.google.com/patent/CN110501318B/en?q=(optical+phosphate+biosensor+for+nutrient+monitoring)&oq=optical+phosphate+biosensor+for+nutrient+monitoring)
- Kulkarni, S. J., & Karve, M. S. (2020). Fabrication of enzyme-based optical biosensor for estimation of inorganic phosphate in a urine sample. *SN Applied Sciences*, 2(6), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-2748-6>
- Lamarche, M. G., Wanner, B. L., Crépin, S., & Harel, J. (2008). The phosphate regulon and

bacterial virulence: A regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(3), 461–473. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00101.x>

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>

Lewandowska-Andralojc, A. & Marciniak, B. (2019). Five Major Sins in Fluorescence Spectroscopy of Light-Harvesting Hybrid Materials. *ACS Energy Letters*. 4 (8), 1898-1901. doi: 10.1021/acsenenergylett.9b01146

Mapare, S. V., Yu, P. L., Sarkar, A., & Mukhopadhyay, S. C. (2013, December). A Review of sensor technology for in-field phosphate monitoring. In 2013 Seventh International Conference on Sensing Technology (ICST) (pp. 411-418).

Martín-Martín, S., Rodríguez García, A., Santos-Beneit, F., Franco-Domínguez, E., Sola-Landa, A & Martín, J. F. (2017). Self-control of the PHO regulon: the PhoP-dependent protein PhoU controls negatively expression of genes of PHO regulon in *Streptomyces coelicolor*. *The Journal of Antibiotics*. 71, 113-122. <https://doi.org/10.1038/ja.2017.130>

Mondal, S., Hsiao, K., Goueli S. (2014). Luminescent detection of inorganic phosphate and coupled reactions. United States US20140273036A1. Promega Corporation. [https://patents.google.com/patent/US20140273036A1/en?q=\(phosphate+biosensor\)&oeq=phosphate+biosensor&page=3](https://patents.google.com/patent/US20140273036A1/en?q=(phosphate+biosensor)&oeq=phosphate+biosensor&page=3)

Naciones Unidas (2022). La población mundial llegará a 8000 millones en 2022. <https://www.un.org/es/desa-es/la-poblaci%C3%B3n-mundial-llegar%C3%A1-8000-millones-en-2022>

Nawrot, W., Drzozga, K., Baluta, S., Cabaj, J, Malecha, K. A fluorescent biosensor for detection vital body fluids' agents, *Sensors* 18 (8) (2018) 2357

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2002). Los Fertilizantes y su uso. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. <https://www.fao.org/3/x4781s/x4781s.pdf>

Okoh, M. P., Hunter, J. L., Corrie, J. E. T., & Webb, M. R. (2006). A Biosensor for Inorganic Phosphate Using a Rhodamine-Labeled Phosphate Binding Protein †. 14764–14771.

- Ribot, C., Wang, Y., & Poirier, Y. (2008). Expression analyses of three members of the AtPHO1 family reveal differential interactions between signaling pathways involved in phosphate deficiency and the responses to auxin, cytokinin, and abscisic acid. *Planta*, 227, 1025-1036.
- Rice, C. D., Pollard, J. E., Lewis, Z. T., & McCleary, W. R. (2008). Employment of a Promoter-Swapping Technique Shows that PhoU Modulates the Activity of the PstSCAB2 ABC Transporter in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 75 (3), 573–582, doi 10.1128/AEM.01046-08
- Rusch, G., Wang, J., Breau, K., Kilgour, K., Gilleskie, G., Keele, J., Selle, K., Magness, S. T., Menegatti, S., & Daniele, M. (2024). Comparative Approaches for Quantification of Product Yield in a Model Recombinant Green Fluorescent Protein Expressed in *E. coli*. *bioRxiv*. doi: 10.1101/2024.06.24.600411
- Santos-Beneit, F. (2015). The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 6 (402). doi: 10.3389/fmicb.2015.00402
- Sezonov, A., Joseleau-Petit, D., & D'Ari, R. (2007). *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *Journal of Bacteriology*. 189 (23), 8746–8749.
- Singh, A. K., Mittal, S., Das, M., Saharia, A., & Tiwari, M. (2023). Optical biosensors: a decade in review. *Alexandria Engineering Journal*, 67, 673-691.
- Solscheid, C., Kunzelmann, S., Davis, C. T., Hunter, J. L., Nofer, A., & Webb, M. R. (2015). Development of a Reagentless Biosensor for Inorganic Phosphate, Applicable over a Wide Concentration Range. *Biochemistry*, 54(32), 5054–5062. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00449>
- Tian, D., Liu, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Xia, Y., Xu, B., Xu, J., & Yomo, T. (2024). Implementation of Fluorescent-Protein-Based Quantification Analysis in L-Form Bacteria. *Bioengineering*. 11 (1), 81. <https://doi.org/10.3390/bioengineering11010081>
- Torres-Bacete, J., Luis Garcia, J., & Nogales, J. (2021). A portable library of phosphate-depletion based synthetic promoters for customizable and automata control of gene expression in bacteria. *Microbial Biotechnology*, 14(6), 2643-2658.
- Torriani, A. (1990). From cell membrane to nucleotides: The phosphate regulon in *Escherichia coli*. *BioEssays*, 12(8), 371–376. doi:10.1002/bies.950120804

Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annual review of biochemistry*, 67(1), 509-544.

Uluseker, C., Torres-Bacete, J., Garcia, J.L., Hanczyc, M.M., Nogales, J., and Kahramanogullari, O. (2019) Quantifying dynamic mechanisms of auto-regulation in *Escherichia coli* with synthetic promoter in response to varying external phosphate levels. *Sci Rep* 9: 2076.

Villasanti, C., Román, P., & Pantoja, A. (2013). El manejo del suelo en la producción de hortalizas con buenas prácticas agrícolas. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 31.

Vaidya, A. M., & Annapure, U. S. (2019). Enzymes in Biosensors for Food Quality Assessment. Elsevier EBooks, 659–674. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813280-7.00038-4>

Wanner, B. L. (1993). Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. *Journal of Cellular Biochemistry*. 51, 47-54. <https://doi.org/10.1002/jcb.240510110>

Wensheng, L., Guoping, C., Feng, T., Ran, L., Longying, G., Xinmin, J. (2012). Renewable Optical biosensor for detecting organophosphorus pesticides. China CN101923050B. Fundan University of CAS, Animal and Plant Inspection and Quarentine Technology Center of Shenzhen [https://patents.google.com/patent/CN101923050B/en?q=\(phosphate+biosensor+for+plants\)&oq=phosphate+biosensor+for+plants](https://patents.google.com/patent/CN101923050B/en?q=(phosphate+biosensor+for+plants)&oq=phosphate+biosensor+for+plants)

Wieczorek, D., Źyszka-Haberecht, B., Kafka, A., & Lipok, J. (2022). Determination of phosphorus compounds in plant tissues: from colourimetry to advanced instrumental analytical chemistry. *Plant Methods*, 18(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13007-022-00854-6>

Yamada, M., Makino K., Amemura, M., Shinagawa, H. & Nakata, A. (1989). Regulation of the Phosphate Regulon of *Escherichia coli*: Analysis of Mutant *phoB* and *phoR* Genes Causing Different Phenotypes. *Journal of Bacteriology*. 171 (10), 5601-5606.

Yang, C., Hou, V., Nelson, L.Y., Seibel, E. J. (2013). Mitigating fluorescence spectral overlap in wide-field endoscopic imaging. *Journal of Biomedical Optics*. 18 (8), 86012. doi:

10.1117/1.JBO.18.8.086012

Yu, J., Zhang, Y., Zhao, Y., Zhang, X., & Ren, H. (2023). Highly Sensitive and Selective Detection of Inorganic Phosphates in the Water Environment by Biosensors Based on Bioluminescence Resonance Energy Transfer. *Analytical Chemistry*, 95(11), 4904-4913.

XVII. Anexos

17.1 Códigos para la cuantificación de fluorescencia

17.1.2 Anexo 1 Código usado para contrastar la imagen en Python.

```
#Programa para analizar las imágenes de fluorescencia de bacterias
import numpy as np
import cv2 as cv
import matplotlib.pyplot as plt

#Leemos la imagen

lectura = "FL 1 a R.png"
escritura = "FL 1 a R contraste.png" #Poner en matlab
a=cv.imread(lectura,1)
cv.imshow('Imagen original',a)

#se puede dividir usando el comando split
b,r,g = cv.split(a)

cv.imshow('mapa azul',b)
cv.imshow('mapa verde',r)
cv.imshow('mapa rojo',g)

equg = cv.equalizeHist(g)
cv.imshow('Imagen ecualizada verde',equg)
cv.imwrite(escritura,equg)

histg = cv.calcHist([g],[0],None,[256],[0,256])
ret,threshg1 = cv.threshold(g,10,255,cv.THRESH_BINARY) #si el valor es mayor a 127,
tomara el valor de 255
cv.imshow('imagen umbralizada verde',threshg1)
plt.plot(histg)
plt.show()
```

17.1.3 Anexo 2 Código MATLAB para la obtención de las coordenadas de la zona a cuantificar.

```
a=imread('FL 1 a R contraste.png');
%eqa=histeq(a)
imshow(a)
b=imread('FL 1 a R contraste.png');
```

```
%set(b, 'Position', [x_pos y_pos width height]);
```

17.1.4 Anexo 3 Código para la cuantificación de la muestra en Python

```
#Programa para analizar las imágenes de fluorescencia de bacterias
```

```
import numpy as np
```

```
import cv2 as cv
```

```
import matplotlib.pyplot as plt
```

```
#Leemos la image
```

```
a = cv.imread('FL 1 a R.png',1)
```

```
lc = cv.imread('FL 1 a R contraste.png',1)
```

```
#Recortamos la imagen con las coordenadas establecidas
```

```
x1 = 246
```

```
y1 = 105
```

```
x2 = 400
```

```
y2 = 190
```

```
cv.imshow('Imagen original',a)
```

```
#se puede dividir usando el comando split
```

```
b1,g1,r1 = cv.split(a)
```

```
b3,g3,r3 = cv.split(lc)
```

```
b2 = b1
```

```
r2 = r1
```

```
g2 = g1
```

```
cv.imshow('mapa azul',b1)
```

```
cv.imshow('mapa rojo',r1)
```

```
cv.imshow('mapa verde',g1)
```

```
eii1 = np.array([x1-1,y1-1])
```

```
esd1 = np.array([x2-1,y2-1])
```

```
'''
```

```
renglones,columnas = IReclzquierda.shape
```

```
suma=0
```

```
for i in range(0,renglones,1):
```

```
    for j in range(0,columnas,1):
```

```
        suma = suma + IReclzquierda[i,j]
```

```
promedioNI = suma/(renglones*columnas)
print("Izquierda = ",promedioNI)
'''
```

```
suma = 0
cuenta = 0
for i in range(x1-1,x2,1):
    for j in range(y1-1,y2,1):
        suma = suma + g1[i,j]
        cuenta = cuenta + 1
        b2[i,j] = 255
```

```
        r3[i,j] = 0
        g3[i,j] = 0
        b3[i,j] = 255
```

```
'''
```

```
if(i==x1-1):
    g2[i,j] = 255
```

```
        r3[i,j] = 0
        g3[i,j] = 0
        b3[i,j] = 255
```

```
if(i==x2-1):
    g2[i,j]=255
```

```
        r3[i,j] = 0
        g3[i,j] = 0
        b3[i,j] = 255
```

```
if(j==y1-1):
    g2[i,j]=255
```

```
        r3[i,j] = 0
        g3[i,j] = 0
        b3[i,j] = 255
```

```
if(j==y2-1):
    g2[i,j]=255
```

```
        r3[i,j] = 0
        g3[i,j] = 0
        b3[i,j] = 255
```

```
'''
```

```
promedio = suma/cuenta
print("el promedio es = ",promedio)
```

```
a2 = cv.merge([b2, g2, r2])
cv.imshow("Selección cuantificada",a2)
```

```
a3 = cv.merge([b3,g3,r3])
cv.imshow("Selección imagen cuantificada", a3)
```

```
#Se guarda la imagen con el área cuantificada
cv.imwrite("Zona cuantificada.png",a2)
```

```
#Se guarda la imagen con el área cuantificada
cv.imwrite("Zona cuantificada contraste.png",a3)
```

```
'''
```

```
#eii2 = np.array([227,150])
#esd2 = np.array([307,300])
dx1=esd1[0]-eii1[0]
dy1=esd1[1]-eii1[1]
```

```
#dx2=esd2[0]-eii2[0]
#dy2=esd2[1]-eii2[1]
```

```
#Recorte imagen derecha
lReclzquierda = g[eii1[0]:esd1[0],eii1[1]:esd1[1]]
#lRecDerecha = g[eii2[0]:esd2[0],eii2[1]:esd2[1]]
```

```
plt.figure()
histlReclzquierda = cv.calcHist([lReclzquierda],[0],None,[256],[0,256])
#histlRecDerecha = cv.calcHist([lRecDerecha],[0],None,[256],[0,256])
plt.plot(histlReclzquierda)
plt.title('izquierda')
```

```
#plt.figure()
#plt.plot(histlRecDerecha)
#plt.title('derecha')
plt.show()
```

```
#cv.imshow('Recorte Izquierda',lReclzquierda)
#cv.imshow('Recorte Derecho', lRecDerecha)
```

#Realizamos la sumatoria

```
renglones,columnas = IRecIzquierda.shape
suma=0
for i in range(0,renglones,1):
    for j in range(0,columnas,1):
        suma = suma + IRecIzquierda[i,j]

promedioNI = suma/(renglones*columnas)
print("Izquierda = ",promedioNI)
```

```
suma=0
for i in range(0,renglones,1):
    for j in range(0,columnas,1):
        suma = suma + IRecDerecha[i,j]
promedioND = suma/(renglones*columnas)
print("Derecha = ",promedioND)
#Irec = np.zeros([dx,dy]
'''
```

17.1.5 Anexo 4 Receta Medio Mínimo MOPS

17.1.5.1 Receta final MOPS

1. Mezclar los ingredientes descritos y ajustar pH a 7.2 con 300 µL de NaOH a 10 M.
2. Esterilizar con filtro.
3. Antes de su uso, añadir glucosa como fuente de carbono a una concentración final de 0.1%.

Cuadro 5. Receta final MOPS

Mezcla MOPS 10x	100 mL
0.132 M K ₂ HPO ₄	10 mL
Agua destilada	880 mL
Total	990 mL

17.1.5.2 Mezcla MOPS 10x

1. En un matraz de 1L agregar 83.72 g de medio MOPS a 300 mL de agua destilada y agitar con mosca hasta que se haya disuelto.
2. Añadir KOH a 10 M, hasta alcanzar un pH aproximado de 7.4.
3. Llevar el volumen final a 440 mL.
4. Hacer una solución fresca de 10 mL con 0.028g de FeSO_4 y añadirla a la mezcla de MOPS
5. Añadir en orden las siguientes soluciones a la mezcla de FeSO_4 y MOPS.

Cuadro 6. Soluciones para medio MOPS

Compuesto	Volumen
1.9 M NH_4Cl	50 ml
0.276 M K_2SO_4	10 ml
0.02 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25 ml
2.5 M MgCl_2	2.1 ml
5 M NaCl	100 ml
Stock de micronutrientes	0.2 ml
H_2O destilada autoclaveada	387 ml

6. Esterilizar con filtro la mezcla.

Cuadro 7. Mezcla de micronutrientes

Compuesto	Gramos en 50 mL de agua destilada
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.009
H_3BO_3	0.062
CoCl_2	0.018
CuSO_4	0.006
MnCl_2	0.040
ZnSO_4	0.007