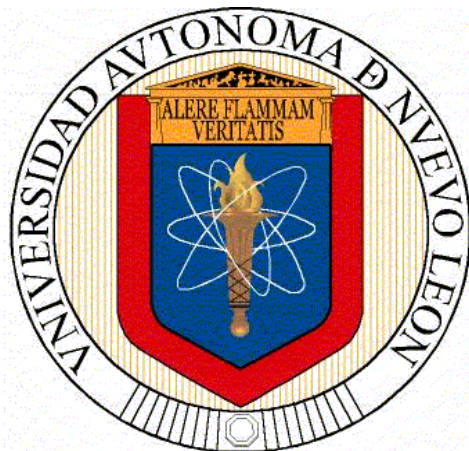


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



TESIS

***EXPRESIÓN GENÉTICA EN *Escherichia coli* CONTROLADA POR
MEDIO DE TEMPERATURA Y POTENCIALMENTE CON LUZ PARA
EL DISEÑO DE AGENTES TERAPÉUTICOS.***

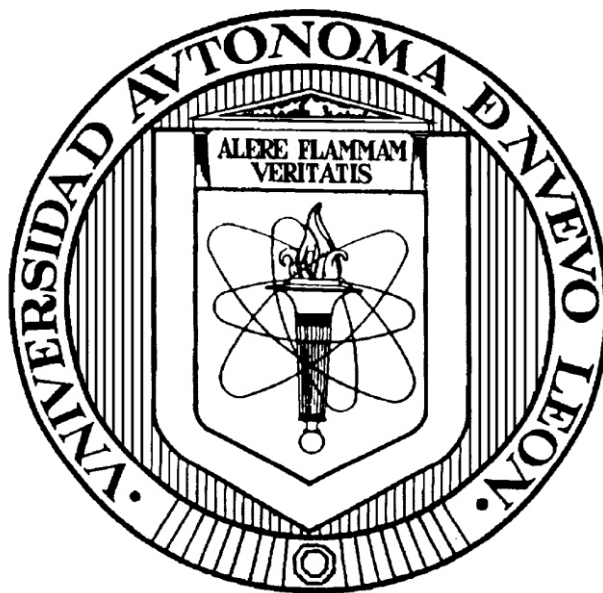
PRESENTA

ESTHER BALTAZAR ENCARNACIÓN

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON
ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA APLICADA**

MAYO 2015

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS**



***EXPRESIÓN GENÉTICA EN Escherichia coli CONTROLADA POR MEDIO DE
TEMPERATURA Y POTENCIALMENTE CON LUZ PARA EL DISEÑO DE
AGENTES TERAPÉUTICOS.***

Por

ESTHER BALTAZAR ENCARNACIÓN

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA
EN CIENCIAS CON ORIENTACION EN MICROBIOLOGIA APLICADA**

Mayo 2015

EXPRESIÓN GENÉTICA EN Escherichia coli CONTROLADA POR MEDIO DE TEMPERATURA Y POTENCIALMENTE CON LUZ PARA EL DISEÑO DE AGENTES TERAPÉUTICOS.

APROBACIÓN DE LA TESIS

**Dr. JOSÉ RUBÉN MORONES RAMÍREZ
DIRECTOR DE TESIS**

COMITÉ TUTORIAL

Dra. MARÍA TERESA GARZA GONZÁLEZ

Dra. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS

Dr. ULRICO JAVIER LÓPEZ CHUKEN

**Dra. MA. ARACELY HERNÁNDEZ RAMÍREZ
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

*Empieza por hacer lo necesario,
luego lo que es posible y de
pronto te encontrarás haciendo
lo imposible...*

San Francisco de Asís



AGRADECIMIENTOS

A la vida por haber puesto en el camino a seres maravillosos que han cuidado de mí en diferentes etapas de existencia.

A mi familia: de ellos he aprendido que trabajo, esfuerzo, voluntad y persistencia hacen posible lo imposible; que los sueños se realizan siempre y cuando te esfuerces en convertirlos en realidad, que desvelos y mal pasadas no son más que eslabones que te llevan a él, que lo que tú no hagas por ti... difícilmente alguien más lo hará. Mamá, papá, hermanos, sobrinos por quererme y apoyarme, a mis abuelos que en vida me dieron ese ejemplo de trabajo y constancia pero sobre todo recuerdos de infancia bien vivida y que hoy se me cuidan desde el cielo. Al hermano Salvador que fue digno representante de un Dios de amor y bondad aquí en la tierra (†).

A mis amigos; Lynette, por ese cariño y ternura que te caracteriza, que hace que quien te conozca te quiera, Tania por regañarme y apoyarme siempre, por esa franqueza que pocas veces es valorada y sin embargo siempre es necesaria; Paty por su apoyo no solo en el proyecto sino en mis ideales de un país y una vida mejor para todos, por hacer divertidos esos ensayos interminables y siempre sonreír (creo que algo de mi locura te contagio), sé que aunque el tiempo y la vida nos separe físicamente, el alma nos mantendrá juntas; Erik González por no escandalizarse y no censurar mis palabrotas y reírse de vez en cuando de mis historias, Daniel por su apoyo y dejarme conocerlo un poco, a mi sobrino Jordy porque nunca dejó de hablarme y apoyarme aunque lo amedrentaban y como olvidar a Jorge Peña, que codo a codo iniciamos este proyecto, que sus comentarios y ayuda fueron vitales para darle forma y vida a este proyecto, a Dago por su apoyo y sonrisas.

Al Dr. José Rubén Morones Ramírez, no solo por asesorarme, por dejarme trabajar libremente, porque gracias a él recuperé la confianza y sensación de

independencia, por todos los inconvenientes que involuntariamente cause, por ser mi guía en esta etapa. Al comité tutorial; a la Dra. María Elena Cantú Cárdenas de quien admiro su fortaleza, disciplina y congruencia, valoro sus consejos y recomendaciones, por su apoyo absoluto; a la Dra. María Teresa Garza González por su apoyo ilimitado, por esa sencillez y humildad que solo las grandes personas poseen, por esa sonrisa sincera que siempre me brindo; al Dr. Ulrico Javier López Chuken por su asesoría y apoyo en las diferentes etapas de esta tesis.

Al Dr. Domingo García por su apoyo en la realización de las micrografías de SEM, pero sobre todo por su calidez y confianza; además de hacer amena y agradable nuestra estancia en el CIIDIT.

Al Dr. Edgar Abraham García Zepeda y la Dra. María del Rayo Camacho, por mostrarme el camino de la ciencia, despertar mi curiosidad y porque su apoyo motivo el deseo de conocer y aprender algo más.

A mis amigos de ahora y siempre que desde que inicie el posgrado no he visto tanto como he querido, pero que nos hemos mantenido al pendiente uno del otro, a mi adorado equipo triple A (Alicia, Anita y Arturo) por todo, a Chinto por esas platicas esporádicas y breves pero muy fructíferas, Chino por su humor, visitas y por la confianza, por compartir mis ideales bélicos.

Índice	Pág.
LISTA DE TABLAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE GRÁFICAS	vii
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	xii
CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Reacción adversa a medicamentos	1
1.2 Microbioma	3
1.3 Fusión de biología sintética y nanotecnología	5
1.3.1 Biología sintética	5
1.3.2 Nanotecnología	7
CAPÍTULO 2	10
ANTECEDENTES	10
2. 1 Nanopartículas	10
2.2.1 Síntesis de Nanopartículas	11
2.2.2 Biosíntesis de nanopartículas	15
2.3 Termómetro de RNA	16
2.4 Control óptico	17
2.5 Terapias inteligentes	19
PolySTAT	19
Ins-PBA-F	19
Justificación	20
CAPÍTULO 3	22
HIPÓTESIS, OBJETIVOS DEL PROYECTO	22
3.1 Hipótesis	22
3.2 Objetivo general	23
3.3 Objetivos específicos	23
CAPÍTULO 4	25
MATERIALES Y MÉTODOS	25
4. 1 Bacterias recombinantes	25
4.1.1 Escherichia coli K12DH5α	26

4.1. 2. <i>Escherichia coli</i> Top10	26
4.2 Biosíntesis y caracterización de nanopartículas (AgNPs) de Ag por medio de <i>E. coli K12 DH5α</i> recombinante (Ec-PC).....	28
4.2.1 Reactivación de Ec-PC	28
4.2.2 Cultivo Overnight.....	29
4.2.3 Ensayo: Biosíntesis AgNPs	29
4.2.4 Muestreo y caracterización	30
4.3 Biosíntesis de AgNPs por <i>Escherichia coli</i> Top 10 (Ec-TS) y <i>Escherichia coli</i> - ATCC 25922 (Migula) Castellani.	32
4.3.1 Reactivación de cepas <i>Escherichia coli</i> Top 10 (Ec-TS) y <i>Escherichia coli</i> - ATCC 25922 (Migula) Castellani.....	32
4.3.2 Cultivo Overnight.....	32
4.3.3 Ensayo: Biosíntesis AgNPs	33
4.4 Comprobar viabilidad de las cepas de <i>Escherichia coli</i> Top 10 (Ec-TS) y <i>Escherichia coli</i> -ATCC 25922 (Migula) Castellani (Ec-MC) en medio con diferentes concentraciones de AgNO ₃	34
4.5 Desarrollar una metodología para el control y manipulación en la expresión del termosensor de Top 10.....	36
4.6 Conservación de Cepas.....	37
4.7 Disposición de residuos generados.....	37
CAPÍTULO 5	38
RESULTADOS	38
5.1 Bacterias recombinantes.....	38
5.1.1 <i>Escherichia coli k12DH5α</i> (Ec-PC).....	38
5.1.2 <i>Escherichia coli</i> Top 10	39
5.2 Biosíntesis de AgNPs.....	40
5.2.1 Efecto de los factores utilizados en la biosíntesis de AgNP	40
5.2.2 Espectrofotometría UV-vis	44
5.2.3 Microscopia Electrónica de Barrido y Espectroscopia por dispersión de energía de Rayos X.....	48
5.3 Evaluación del crecimiento de Ec-TS y Ec-PC posterior a la biosíntesis de AgNPs.....	50
5.4 Efectos de los factores en la expresión de la proteína <i>mcherry</i>	52
CAPÍTULO 6	55
DISCUSIÓN.....	55
CAPÍTULO 7	62
CONCLUSIONES.....	62

Perspectivas a futuro	64
Bibliografía.....	65
APÉNDICE I.....	76
Reportes de secuenciación de bacterias recombinantes.....	76
<i>Escherichia coli</i> <i>k12DH5α</i> (<i>Ec-PC</i>).....	76
<i>Escherichia coli</i> <i>Top 10</i>	80
Tablas de resultados de viabilidad del punto 5.4	84
<i>Ec-MC</i>	84
<i>Ec-TS</i>	85

LISTA DE TABLAS

TABLA	Página
I. REPORTE ANUAL DE EVENTOS ADVERSOS (FDA).....	2
II. FACTORES PARA MEJORAR LA BIOSÍNTESIS DE AgNPs POR <i>Escherichia coli</i> K12DH5α (Ec-PC).....	30
III. FACTORES PARA MEJORAR LA VIABILIDAD DE LAS CEPAS Y LA BIOSÍNTESIS DE AgNPS.....	33
IV. COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO PARA MEJORAR LA VIABILIDAD DE LAS CEPAS Y LA BIOSÍNTESIS DE AgNPS.....	35
V. COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA <i>mcherry</i>	37

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Página
1.1 Aplicaciones de la Nanomedicina	9
2.1 Síntesis de fitoquelatinas.....	14
2.2 Estructura general de fitoquelatinas.....	14
5.1 Secuencia sintética de la proteína quelante	39
5.2 UFC de <i>Escherichiacoli K12DH5α</i> transformada para la expresión de proteína quelante.....	39
5.3 Crecimiento de las cepas recombinantes en medio sólido (I) y líquido (II).....	40
5.4 Biosíntesis de AgNPs por <i>Ec.PC</i> y <i>Ec-GFP</i>	41
5.5 Biosíntesis de AgNPs por <i>Ec-PC</i>	42
5.6 Biosíntesis de AgNPs por <i>Ec-TS</i> y <i>Ec-MC</i> en medio de cultivo LBE y con diferentes concentraciones de $AgNO_3$	43

FIGURA	Página
5.7 Micrografías SEM en <i>Ec-PC</i> ; 0h, 1mM AgNO ₃	48
5.8 Micrografías SEM en <i>Ec-PC</i> ; 2h, 10mM AgNO ₃	49
5.9 Espectro EDX de <i>Ec-PC</i> ; 0h, 1mM AgNO ₃	49
5.10 Espectro EDX de <i>Ec-PC</i> ; 2h, 10mM AgNO ₃	50
5.11 Cultivos de la cepa <i>Ec-TS</i> para evaluar la expresión de <i>mcherry</i> en Medio LB y LBA a 30°C y 37°C.....	54

LISTA DE GRÁFICAS

GRÁFICA	Página
1.1 Reportes Anuales de Reacciones Adversas a Medicamentos de la FDA.....	3
5.1 Espectrofotometría UV-Vis, <i>Ec-GFP</i> , en medio de cultivo LB.....	45
5.2 Espectrofotometría UV-Vis, <i>Ec-PC</i> , en medio de cultivo LBN.....	46
5.3 Espectrofotometría UV-Vis de la cepa <i>Ec-PC</i> en medio de cultivo LBE.....	46
5.4 Espectrofotometría UV-Vis, <i>Ec-TS</i> , en concentraciones de 0 a 1 mM de AgNO_3 , a 2h de incubación.....	47
5.5 Espectrofotometría UV-Vis, <i>Ec-MC</i> , en concentraciones de 0 a 1mM de AgNO_3 , 2h de incubación.....	47

5.6	Viabilidad de la cepa Ec-TS con diferentes concentraciones de AgNO ₃	51
5.7	Viabilidad de la cepa Ec-MC con diferentes concentraciones de AgNO ₃	52
5.8	Curva de crecimiento de la cepa <i>mcherry</i> (<i>Ec-TS</i>) en medios de cultivo LB y LBA a 30°C y 37°C.....	53
5.9	Espectro de emisión de fluorescencia de la cepa <i>mcherry</i> (<i>Ec-TS</i>) en medio de cultivo LBA a 37.....	53

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AgNPS: nanopartículas de plata

ARN: Ácido ribonucleico

CELAES: Centro de Laboratorios Especializados, FCQ, UANL

CIIDIT: Centro de Innovación, Investigación y Desarrollo en Ingeniería y Tecnología

Ec-GFP: *Escherichia coli recombinante -: Green fluorescent protein*

Ec-MC: *Escherichia coli Migula Castellani*

Ec-PC: *Escherichia coli recombinante + proteína quelante*

Ec-TS: *Escherichia coli Top 10 recombinante, Termosensor + proteína mcherry*

EDXS: Energy-dispersive X-ray spectroscopy

FDA: Food and Drugs Administration - Administración de Alimentos y Medicamentos.

GFP: *Green fluorescent protein*

IF: intensidad de fluorescencia

KNO₃: nitrato de potasio

λ: Longitud de onda

LB: Luria Bertani

LBA: medio LB Lennox + Arabinosa al 0.02%

LBE: Medio LB Lennox + KNO_3 al 0.1% + lactosa 1%

LBN: medio LB + KNO_3 al 0.01%

log: logarítmico

MT: metalotioneína

NaCl: Cloruro de sodio

NPs: nanopartículas

pb: pares de bases

PC: protein chelate *-proteína quelante-*

PCS: phytochelatin synthase – Fitoquelatina sintasa-

PIIT: Parque de Investigación e Innovación Tecnológica

RAM: Reacción Adversa de medicamentos

rpm: revoluciones por minuto

SD: Shine-Dalgarno

SEM: Scanning Electron Microscope –Microscopia electrónica de barrido

UFC: Unidades formadoras de colonias

UTR: Untranslated Region –Región no traducida de genes-

UV-vis: ultravioleta-visible

RESUMEN

Esther Baltazar Encarnación Fecha De Graduación: Mayo 2015

Universidad Autónoma De Nuevo León

Facultad De Ciencias Químicas

Título del estudio: EXPRESIÓN GENÉTICA EN Escherichia coli CONTROLADA POR MEDIO DE TEMPERATURA Y POTENCIALMENTE CON LUZ PARA EL DISEÑO DE AGENTES TERAPÉUTICOS.

Número de páginas: 49 Candidato Para El Grado De Maestría En Ciencias Con Orientación En Microbiología Aplicada

Propósito y Método del Estudio: Utilizando la interfase entre la biología sintética y la nanotecnología, se propone el diseño de un material (bacteria), con sensibilidad optotérmica; es decir, que la sinergia entre la capacidad de las nanopartículas metálicas para convertir la luz absorbida en calor y la propiedad de respuesta térmica del termómetro de RNA, permitan una respuesta a la exposición de longitudes de onda concretas a nivel local, y además puedan ser controlados con el uso de incrementos globales en la temperatura del sistema, permitiendo con ello un precursor viable para el diseño posterior de nuevos agentes terapéuticos que actúen de forma específica y controlada. La metodología para construir los plásmidos incluyó métodos clásicos para su clonación (digestión, ligación y transformación), para la biosíntesis de AgNPs se trabajó con diferentes concentraciones de AgNO₃, y cuatro cepas de *Escherichia coli* en fase log. Se comprobó la viabilidad de las cepas por medio de la técnica de la gota en superficie, así como la actividad del termosensor y expresión de la proteína *mcherry*.

Contribuciones y Conclusiones: Se realizaron satisfactoriamente las transformaciones de *Escherichia coli* *k12DH5α* para la biosíntesis de nanopartículas y *Escherichia coli* *Top 10* para la expresión del termosensor. La biosíntesis de nanopartículas es favorecida por la fase log DO₆₀₀ 0.6, adquiriendo una tonalidad del medio de cultivo amarillo, marrón a café, se realizó SEM en la que se reporta AgNPs de 48.6 nm y EDXs en la cual se determina la presencia de Ag. Se obtuvieron mejores espectros en la aparición del pico de absorción enriqueciendo el medio de cultivo, el cual también tiene el propósito de mejorar la viabilidad de las cepas *Escherichia coli* *Migula Castellani* y *Escherichia coli* *Top 10* recombinante con el termosensor y la proteína *mcherry*.

Dr. José Rubén Morones Ramírez

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Reacción adversa a medicamentos

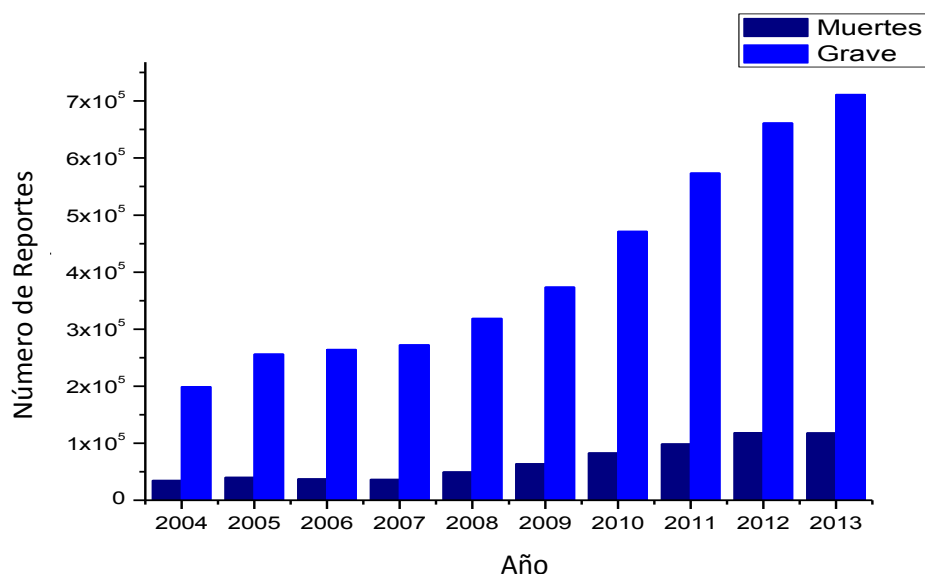
Las reacciones adversas a medicamentos (RAM) son definidas como: una respuesta a un fármaco que es nociva e involuntaria y se produce a dosis normalmente utilizadas en el hombre para la profilaxis, el diagnóstico o la terapia de enfermedad, o para modificar las funciones fisiológicas, con exclusión de los fracasos terapéuticos, sobredosis intencional, los errores en la administración de fármacos, y su incumplimiento (Edwards y Saronson., 2000; Phillips *et al.*, 2001). Muchas reacciones adversas son debidas a la utilización de fármacos con elevada toxicidad inherente, por lo tanto se llaman a menudo reacciones adversas *no prevenibles* y en algunos casos pueden ser debidas al control inadecuado de las terapias y dosis (errores humanos) y son considerados prevenibles (Chen *et al.*, 2008; Lazarus *et al.*, 1998), representan un problema clínico importante, ya que son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en la asistencia sanitaria (Alomar, 2013); Lazarous *et al.*, (1998) dedujeron que las RAM pueden ser de la cuarta a la sexta causa principal de

muerte y más de dos millones de pacientes sufrieron efectos secundarios graves en 1994 (Alomar, 2013; Lazarous *et al.*, 1998). Se estima que las RAM pueden dar lugar a un gasto adicional de \$ 1.56 a \$ 4 mil millones en costos hospitalarios directos por año en los Estados Unidos de América (Lazarous *et al.*, 1998). La farmacología clínica tiene un futuro prometedor, porque las posibilidades de interferir con los procesos de enfermedad a niveles más elementales y específicas, además de los avances genómicos permitirán la posibilidad del conocimiento y desarrollar una terapia más precisa (Edwards y Aronson, 2000).

El Sistema de Reporte de Eventos Adversos de la FDA, muestra el número de casos anuales a partir del 2004, en la gráfica 1.1 puede observar el incremento de estos reportes tanto de los graves (incluyen: muerte, hospitalización, incapacidad, la vida en peligro y / u otro resultado grave) como los no graves, el reporte de casos por año puede observarse en la tabla 1.1

TABLA I
 REPORTE ANUAL DE EVENTOS ADVERSOS (FDA)

Año	Muertes	Grave
2004	34739	198828
2005	40031	256208
2006	37313	264240
2007	36689	272345
2008	49711	318565
2009	63842	373512
2010	82729	471327
2011	98590	573402
2012	118444	661480
2013	117752	711232



Gráfica 1.1 Reportes Anuales de Reacciones Adversas a Medicamentos de la FDA.

La tendencia actual en el descubrimiento de fármacos es entender cómo las infecciones o enfermedades se controlan a nivel molecular (Pan *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010) y fisiológico para suprimir los factores causantes; por lo que la demanda de fármacos capaces de controlar la existencia y aparición de enfermedades o el desarrollo de microorganismos resistentes a antibióticos es cada vez mayor (Nikapitiya, 2012; Huh y Kwon., 2011).

1.2 Microbioma

La microbiota intestinal humana se compone de 10^{13} a 10^{14} microorganismos, cuyo genoma colectivo ("microbioma") contiene al menos 100 veces más genes que el genoma humano (Gill *et al.*, 2011). Las bacterias mantienen una relación compleja y generalmente beneficiosa con el anfitrión

cuando se retiene en el intestino, pero cuando escapan de este entorno pueden causar patología significativa, incluyendo bacteriemia y la formación de abscesos en múltiples sitios del cuerpo (Wexler., 2007). La interface microbioma-anfitrión sugiere que tienen importancia la interacción en relación con la susceptibilidad a la enfermedad y los efectos microbianos sobre la balanza del metabolismo del huésped y la inmunidad (Devoy *et al.*, 2011; Cho y Blaiser., 2012). Los estudios de microbioma proporcionan nuevas aplicaciones tanto en medicina preventiva como para el manejo médico de las enfermedades crónicas (Cho y Blaser., 2012). La microbiota tiene dos características que la convierten en una excelente fuente de diagnóstico: *i*) riqueza de información; las células bacterianas son extremadamente sensibles a su entorno, cambiando frecuentemente de número o la activación de los circuitos de la transcripción en respuesta a señales extracelulares. Por medio del metaproteoma y metaboloma habrá lecturas sensibles de, entre otras cosas, la inflamación y el metabolismo (Lemon *et al.*, 2012; *Peloquin y Nguyen., 2013*; *Hoope et al., 2012*) , *ii*) facilidad de recolección y análisis de muestras (heces, saliva y nasal), por ejemplo; para un paciente en riesgo de desarrollar la enfermedad de Crohn, el envío de una muestra fecal mensual del hogar sería más simple y más rentable que una colonoscopia anual (Lemon *et al.*, 2012).

1.3 Fusión de biología sintética y nanotecnología

Schmidt (2010), menciona que David Rejeski, predice: que una firme convergencia de la nanotecnología y la biología sintética redefinirán la manufactura en el transcurso de los próximos 100 años, catalogando esta fusión como la siguiente Revolución Industrial: "el control selectivo de la materia en la nanoescala cambiará el modo en que se producen casi todas las cosas, desde la electrónica hasta los fármacos, los combustibles, los materiales y los alimentos".

1.3.1 Biología sintética

La biología sintética es una nueva área de la biología y la tecnología que fusiona la biología molecular, la ingeniería genética y herramientas computacionales, para crear sistemas biológicos con funciones novedosas (Aguilar *et al.*, 2012), es reunir a ingenieros y biólogos para diseñar y construir (ingeniería de *novo*) nuevos componentes biomoleculares, redes y vías, reprogramar organismos. Estos organismos de re-ingeniería cambiarán nuestras vidas en los próximos años, dando lugar a medicamentos más baratos y terapias dirigidas para atacar 'superbacterias' y las enfermedades, como el cáncer (Benner y Sismour., 2005).

Una meta importante de la biología sintética es desarrollar una comprensión más profunda de los principios de diseño biológico, mediante la

construcción de circuitos genéticos y el estudio de su comportamiento en las células. Recientemente, los investigadores han comenzado a desarrollar una nueva generación de circuitos sintéticos que se integran con los procesos celulares endógenos. Estos enfoques están proporcionando conocimientos fundamentales en la arquitectura de la regulación, la dinámica y la evolución de los circuitos genéticos y permitiendo nuevos niveles de control a través de diversos sistemas biológicos (Nandagopa y Elowitz, 2011; Aguilar *et al.*, 2012). Organismos recombinantes terapéuticos, circuitos y vías sintéticas pueden ser utilizados para la entrega controlada de fármacos, así como para la terapia génica y metabólica. En algunos casos el sofisticado control sobre la cinética de liberación del fármaco en el cuerpo, puede producir ventajas terapéuticas y reducir los efectos secundarios no deseados. Los circuitos sintéticos ofrecen un enfoque más controlado como la capacidad para silenciar, activar, y sintonizar la expresión de los genes deseados (Khalil y Collins., 2010).

Los objetivos y beneficios de la fusión de la nanotecnología con la biología sintética del DNA son diversos: Por un lado, la nanotecnología de DNA puede entregar conceptos y componentes para estructuras artificiales que se aplicarán en los sistemas biológicos. Por ejemplo, nanodispositivos *RNA* que pueden ser utilizados como reguladores ribosomales artificiales y pueden ser implementados *in vivo*. Por otro lado, células biológicas o recombinantes se pueden usar para la producción de nanoestructuras de RNA basadas en y para el control de varias etapas complejas, por ejemplo las células biológicas se podrían utilizar para

producir nanodispositivos de RNA por transcripción. Los mecanismos de regulación de genes se pueden utilizar para controlar el tiempo de producción de los nanodispositivos y el RNA de origen natural (microRNA-o RNA) transcrito a partir de genes de control artificial (Jungmann *et al.*, 2008). El objetivo final es el desarrollo de un sistema altamente funcional de biosensores, “interruptores moleculares” (Moghimi *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007; Cameron *et al.*, 2014) e incluso análogos de tejidos para el cultivo de la piel, huesos, músculos y órganos del cuerpo (Liu *et al.*, 2007).

1.3.2 Nanotecnología

La nanotecnología es un área de la ciencia dedicada a la manipulación de átomos y moléculas que conducen a la construcción de estructuras en tamaño de escala nanométrica, típicamente, aunque no exclusivamente, las NPs son definidas como partículas microscópicas entre 1nm y 100nm (Moghimi *et al.*, 2005), con un poco de extensión en su definición de hasta 1µm (Praetorius and Mandal, 2007); que retienen propiedades únicas, las propiedades físicas y químicas de los materiales pueden mejorar significativamente o cambiar radicalmente cuando su tamaño es reducido a pequeños grupos de átomos. (Abou El-Nour *et al.*, 2010; Bhattacharyya *et al.*, 2010). Una tendencia en la nanotecnología es la aplicación de nanopartículas metálicas en el tratamiento de cáncer por medio de foto-quimioterapia y foto-termoterapia. Para este propósito es importante elegir los materiales y tamaños de nanopartículas que son capaces de: 1) cambios conformacionales; 2) la difusión y 3) las transformaciones

químicas en presencia de DNA, luz, temperatura, fuerza iónica, agentes redox y agentes cambiantes de polaridad (Bregadze *et al.*, 2013).

Debido a que los nanomateriales son similares en escala a las moléculas y sistemas biológicos, la nanotecnología es potencialmente útil en aplicaciones médicas (Thakkar *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011; Hulkoti y Taranath, 2014; Pavani *et al.*, 2013; Schröfel *et al.*, 2014). El campo de la nanomedicina tiene como objetivo utilizar las propiedades y características físicas de los nanomateriales en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades a nivel molecular (Nikapitiya, 2012). Los nanomateriales están siendo diseñados para facilitar el diagnóstico o el transporte de agentes terapéuticos a través de las barreras biológicas; obtener acceso a las moléculas para mediar interacciones moleculares y sensibles al detectar cambios moleculares de alto rendimiento (Kim *et al.*, 2010)

Los nanomateriales poseen una alta relación entre el área superficial y la captación óptica, catalítica y electrónica (He *et al.*, 2007), así como propiedades magnéticas y biológicas; pueden ser diseñados para tener diferentes tamaños, formas, composiciones químicas, características químicas de superficie, y huecos o estructuras sólidas. Estas propiedades se están incorporando en las nuevas generaciones de vehículos de liberación de fármacos, agentes de contraste, y dispositivos de diagnóstico, algunos actualmente están bajo

investigación clínica o han sido aprobados por la FDA, para el uso en seres humanos (Kim *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2011; De *et al.*, 2008).

Las nanopartículas (NPs) metálicas tienen aplicaciones en diversas áreas tales como la electrónica, de cosméticos, pinturas, embalajes, medicina y en la biotecnología (Thakkar *et al.*, 2009); las NPs en medicina son útiles ya que pueden cruzar a través del sistema vascular y localizar cualquier órgano diana (Thakkar *et al.*, 2009; Nath *et al.*, 2013; Schröfel *et al.*, 2014). Además, el tamaño de NPs permite interacciones con biomoléculas en las superficies celulares y dentro de las células en formas que no alteran necesariamente el comportamiento y propiedades bioquímicas de estas moléculas (Praetorius y Mandal, 2007). Potencialmente, esto puede dar lugar a nuevas terapias, formación de imágenes, y aplicaciones biomédicas (Thakkar *et al.*, 2009; Nath *et al.*, 2013; Schröfel *et al.*, 2014), estas aplicaciones pueden observarse en la figura 1.1.

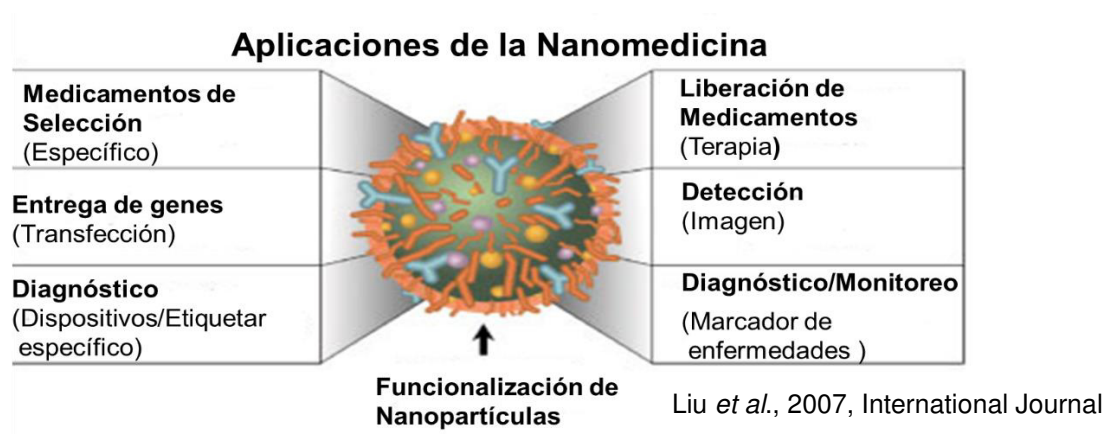


Figura 1.1 Aplicaciones de la Nanomedicina

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2. 1 Nanopartículas

Las nanopartículas pueden ser clasificadas sobre la base del tipo de material en metálico, semiconductor y nanopartículas poliméricas (Liu., 2006). En nanopartículas metálicas, las oscilaciones colectivas de electrones (resonancia de plasmon de superficie) están determinadas por las propiedades dieléctricas del metal y el medio, además del tamaño de partícula y forma, puede ser excitado por luz (Klar *et al.*, 1998). Las nanopartículas metálicas pueden generar calor eficientemente bajo iluminación óptica, el proceso de generación de calor no sólo implica la absorción de fotones incidentes, sino también la transferencia de calor desde las NPs a la matriz circundante (Govorov y Richardson., 2007). Las AgNPs presentan una mejor interacción con la luz visible que cualquier otro cromóforo orgánico e inorgánico, esto es debido a una gran densidad de electrones de conducción (Rajendran *et al.*, 2012).

Las NPs no se comportan de manera similar; su comportamiento variará de acuerdo a su microambiente biológico, estabilidad y distribución extracelular y celular, así como con su química, morfología y tamaño (Moghimi *et al.*, 2005).

Las NPs pueden imitar o alterar procesos biológicos por lo que su uso en la medicina podría dar solución a viejos problemas asociados con la solubilidad, biodisponibilidad, inmunocompatibilidad y citotoxicidad de muchos de los medicamentos de uso tradicional (Oropesa-Nuñez y Jáuregui-Haza., 2012). Las nanopartículas utilizadas en la administración de fármacos para terapia o para diagnóstico son sólidos coloidales que varían su tamaño de 2 nm a 1,000 nm (Bawarski *et al.*, 2008), la variación de tamaño afecta la biodisponibilidad y el tiempo de circulación en sangre. Después de la administración sistémica, partículas con diámetros de menos de 10 nm se eliminan rápidamente a través de la extravasación y el aclaramiento renal; partículas con diámetros que van de 10 a 70 nm pueden penetrar capilares muy pequeños; partículas con diámetros entre 70 y 200 nm demuestran los tiempos de circulación más prolongados (Goldberg *et al.*, 2007). Sin embargo, partículas mayores de 200 nm no son muy utilizadas debido a que pueden activar el sistema inmunológico y ser fagocitadas por las células Kupffer (Bawarski *et al.*, 2008; Oropesa-Nuñez y Jáuregui-Haza., 2012).

2.2.1 Síntesis de Nanopartículas

Hay dos enfoques alternativos para la síntesis de NPs metálicas:

Bottom –up; o ensamblaje del uno mismo, se refiere a la construcción de una estructura de átomo por átomo, molécula por molécula, o clúster por clúster. Los bloques de nanopartículas se forman en el material final utilizando

procedimientos químicos o biológicos para la síntesis. Una clara ventaja de este enfoque es la mayor posibilidad de obtener nanopartículas metálicas con defectos comparativamente menores y una composición química más homogénea (Leela y Vivekanandan., 2008).

Top-down; El material de partida se reduce en tamaño utilizando medios físicos (por ejemplo mecánicos) o químicos. Una desventaja importante es la imperfección estructural de la superficie. Tales defectos en la estructura de la superficie pueden tener un impacto significativo sobre las propiedades físicas y química de la superficie de las nanopartículas metálicas debido a la alta heterogeneidad entre ellas (Thakkar *et al.*, 2009).

La biosíntesis de nanopartículas más común es del tipo bottom up en donde la reacción principal es la reducción/oxidación (Durán *et al.*, 2011). Las nanopartículas también pueden ser sintetizadas mediante el uso de los procesos fisicoquímicos que implican reacciones a altas temperaturas en disolventes orgánicos (Korbekandi *et al.*, 2009; Iravani *et al.*, 2014; Nath *et al.*, 2013). En la naturaleza, organismos uni y pluricelulares son capaces de reducir y acumular iones metálicos como mecanismos de desintoxicación y homeostasis. En la aplicación de microorganismos para la remediación de sitios contaminados con metales tóxicos y radionúclidos, se incluye el uso de cepas bacterianas naturales y de ingeniería genética que son capaces de movilización e inmovilización de los iones metálicos. La oxidación bacteriana de minerales es importante en la

extracción de oro, cobre y uranio (Klaus-Joerger *et al.*, 2001). Una gran ventaja de utilizar procariotas como sintetizadoras de nanopartículas es que pueden ser modificadas fácilmente usando ingeniería genética para la sobreexpresión de enzimas específicas, aparte de la facilidad de manejo (Thakkar *et al.*, 2009).

La fitoquelatina (PC) y otras proteínas de unión a metales, se han utilizado para la eliminación de metales pesados en suelos, por lo que se pensó que podrían ser empleadas para la síntesis de nanopartículas metálicas. *Escherichia coli* recombinante expresa fitoquelatina sintasa (PCS por sus siglas en inglés) y metalotioneína (MT) por lo que estas enzimas se están utilizando para la biosíntesis *in vivo* de diversas nanopartículas de varios elementos metálicos, incluyendo semiconductores, alcalinotérreos, magnéticos, nobles (Ag y Au) y fluoruros de metales de las tierras raras (Park *et al.*, 2010). Las fitoquelatinas son ligandos de alta afinidad que complejan metales pesados, se identificaron después que las MTs (Navarro-Aviño *et al.*, 2007), se han identificado en una amplia variedad de especies de plantas y en algunos microorganismos, son estructuralmente relacionadas con el glutatión (Merlos *et al.*, 2014). En la figura 2.1 se presentan las reacciones para la síntesis de fitoquelatinas y en la figura 2.2 se muestra la estructura general de las mismas.

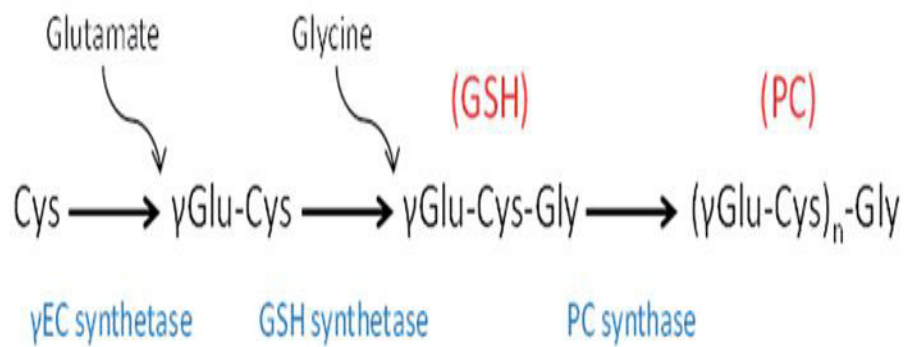


Figura. 2.1 síntesis de fitoquelatinas

Merlos *et al.*, 2014

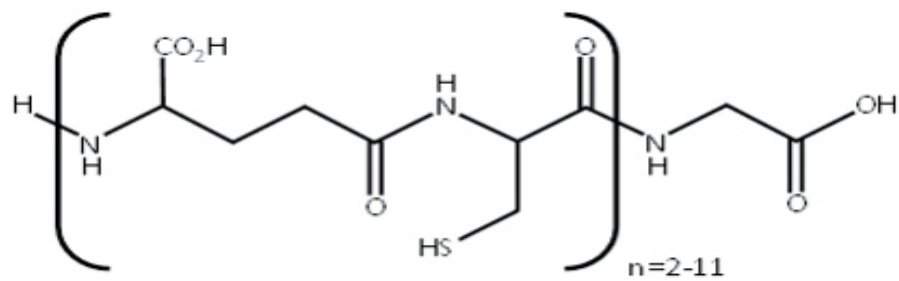


Figura 2.2 Estructura general de fitoquelatinas

2.2.2 Biosíntesis de nanopartículas

En la biosíntesis de nanopartículas por microorganismos se han utilizado bacterias, levaduras, hongos, y actinomicetos. La síntesis se puede clasificar en intracelular y extracelular de acuerdo a la ubicación donde se forman las nanopartículas (Jeevan *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2011; Narayanan y Sakthivel., 2010; Mahanpuria *et al.*, 2008; Malik *et al.*, 2014). Es un proceso limpio, no tóxico, y con procedimientos de "química verde", por lo tanto ambientalmente aceptables (Li *et al.*, 2011; Mahanpuria *et al.*, 2008; Jeevan *et al.*, 2011). El enfoque "biogénico" se ve apoyado por el hecho de que la mayoría de las bacterias habitan en condiciones ambientales de la variación de temperatura, pH, y presión. Las partículas generadas por estos procesos tienen mayor reactividad catalítica, mayor superficie específica, y un mejor contacto entre la enzima y la sal de metal debido a la matriz de soporte bacteriana (Li *et al.*, 2011).

La tasa de formación de partículas intracelulares, extracelulares y el tamaño de las mismas, podrían en cierta medida, ser manipuladas mediante el control de los parámetros como el pH (Praetorius and. Mandal, 2007), temperatura, concentración de las sales metálicas y tiempo de exposición del sustrato (Safekordi *et al.*, 2011; Gurunathan *et al.*, 2009).

2.3 Termómetro de RNA

Los termómetros de *RNA* son sistemas de control genético complejos basados en *RNA* que cambian su conformación en respuesta a la temperatura (Neupert *et al.*, 2008; Chowdhury *et al.*, 2006.; Chowdhury *et al.*, 2003; Kortmann y Norberhaus, 2012). A bajas temperaturas, el *RNA*m adopta una conformación que enmascara los sitios de unión al ribosoma (secuencia de Shine-Dalgarno [SD]) dentro de la región 5' no traducida (UTR-5') y, de esta manera, evita la unión de ribosomas y la traducción. A temperaturas elevadas la estructura secundaria del *RNA* se relaja (desdobla la estructura de tallo y asa), dando acceso a los sitios de unión de los ribosomas para iniciar la traducción (Miranda-Ríos 2006, Neupert *et al.*, 2008). Los termómetros de RNA difieren de los reguladores ribosomales, ya que no requieren la unión de un ligando (metabolito) para inducir el cambio de conformación, pero en su lugar, responden directamente a la temperatura. Los procesos biológicos controlados por termómetros de *RNA* incluyen, por ejemplo, la patogénesis bacteriana, la respuesta de choque térmico y el ciclo de vida de bacteriófagos (Neupert *et al.*, 2008).

A menudo, la regulación de la expresión génica controlada por el medio ambiente se realiza a nivel transcripcional por acción de las proteínas reguladoras. Sin embargo, se han descubierto estrategias postranscripcionales basadas en el *RNA*. El *RNA* mensajero (*RNA*m) no es solamente un simple sustrato para las ribozimas, contiene elementos de control que modulan la

expresión propia de un modo dependiente a estructuras, dichos *RNAs* sensoriales son inducidos por cambios ambientales específicos (Jungmann *et al.*, 2008; Narberhaus *et al.*, 2005; Sudarsan *et al.*, 2003). Se han identificado dos clases de elementos-*RNA*: los que actúan en ***cis***, cuya región reguladora de encuentra dentro de la secuencia de *RNA*m y *RNAs* pequeños que actúan en ***trans*** no codificantes que funcionan por apareamiento de bases con secuencias complementarias de *RNA*m codificados en otras partes del genoma (Narberhaus *et al.*, 2005; Sudarsan *et al.*, 2003).

El *RNA* que actúan en ***cis*** cambia su conformación en respuesta a las señales físicas o químicas. Los reguladores ribosomales controlan el estado metabólico de una célula mediante la unión a metabolitos con alta especificidad y afinidad, se sitúan en las regiones 5'UTR de los genes que codifican para la biosíntesis, absorción o degradación de los metabolitos pequeños y proporcionan control por retroalimentación de estas vías (Narberhaus *et al.*, 2005).

2.4 Control óptico

El control óptico es una técnica no invasiva en la que la amplitud y longitud de onda, ubicación espacial, el tiempo de exposición a la luz y la iluminación se pueden controlar fácilmente (Baker y Deiters, 2014). La optogenética es una tecnología dirigida que permite el control rápido de eventos definidos con precisión en sistemas biológicos complejos como el movimiento libremente de los mamíferos, mediante la entrega de control óptico a la velocidad (escala de

mili segundos) y con la precisión (tipo de células específicas) que se requieren para el procesamiento biológico (Deisseroth., 2011). La activación óptica de proteínas en células vivas y organismos proporciona el control espacial y temporal sobre los procesos biológicos, con una resolución que es teóricamente limitado sólo por la difracción de luz. Estas herramientas ópticas se han utilizado para inducir la luz para el control de canales iónicos, transducción de señales, localización de proteínas, transcripción, traducción, silenciamiento de genes, y otros procesos biológicos fundamentales mediante la inducción de luz (Baker y Deiters, 2014).

Morones-Ramirez (2013), plantea la necesidad de un sistema que proporcione respuesta rápida y reversible, utilizando luz a longitudes de onda específicas, que permitan un control de encendido/apagado. En este trabajo se propone aprovechar las propiedades opto-térmicas de las NPs metálicas. Las NPs son excelentes convertidoras de luz a calor, y cuando son acopladas a un polímero, que se somete rápidamente a cambios en su conformación física debido al calor, surge la oportunidad para incorporar componentes en los nanoporos de los materiales. Estas membranas porosas (Morones y Frey., 2010), se pueden utilizar en la manipulación de fluidos, dispositivos biomédicos, sensores, medicina y otros campos de la química, biología y la ingeniería mecánica (Morones., 2013).

2.5 Terapias inteligentes

PolySTAT

El reemplazo del factor de coagulación es el tratamiento estándar de la hemorragia aguda congénita y trastornos hemorrágicos adquiridos. PolySTAT es un polímero sintético homeostático que circula inocuamente en la sangre, identifica los sitios de lesión vascular, y promueve la formación de coágulos para detener el sangrado, induce la hemostasia mediante la reticulación de la matriz de fibrina dentro de los coágulos, imitando la función de la transglutaminasa factor XIII. Además, PolySTAT sintético se une específicamente a monómeros de fibrina y es uniformemente integrado en fibras de fibrina durante la polimerización de fibrina, lo que resulta en una red de polímero híbrido fortificada con una mayor resistencia a la degradación enzimática (Chan *et al.*, 2015).

Ins-PBA-F

Chou *et al.*, han sintetizado y desarrollado un derivado de insulina que está diseñada para proporcionar larga duración y mediar la actividad de respuesta de la glucosa a la insulina químicamente modificada. Para preparar estos derivados de insulina, pequeñas moléculas que contienen tanto un resto alifático y un resto de ácido fenilborónico (PBA) se sintetizaron para la conjugación covalente a la insulina. El uso de un dominio alifático se inspiró por el diseño de la acción prolongada de la insulina Detemir (Levemir) para proporcionar la unión a albúmina, u otros componentes hidrófobos en el suero, para prolongar la vida

media. Mientras tanto, la incorporación de PBA proporciona un elemento sensible a la glucosa dentro del conjugado para unirse reversiblemente a cis-1,2 o cis-1,3 dioles tales como la glucosa, que estabiliza una carga negativa en el ácido bórico. La inclusión de los grupos de PBA dentro de polímeros se ha utilizado previamente para la detección de glucosa y la administración de insulina a través de la modulación electrostática sobre la glucosa unida a PBA, PBA también se ha evaluado como un elemento óptico en sensores de glucosa. El derivado de conjugados alifáticos-PBA e insulina provee una actividad duradera de sensibilidad a la glucosa, proporcionando un potencial terapéutico mejorado para el manejo de la diabetes. La "insulina inteligente" (Ins-PBA-F), está diseñada para unirse a la albúmina sérica, tan pronto como se inyecta, lo cual permite que se almacene en el cuerpo y se libere cuando los niveles de azúcar alcancen cierto umbral.

Justificación

En el campo de la medicina el uso de fármacos (diagnóstico, tratamiento farmacológico y terapéutico) presentan diversos riesgos en la fisiología del usuario; ya que con los medicamentos actuales algunos pacientes pueden presentar reacciones secundarias, adversas, de interacción e inmunológicas. Las consecuencias de estas reacciones pueden ser de distintos grados; desde leves, incapacitantes e incluso causar la muerte. Por todo lo descrito anteriormente, es necesario el uso de agentes terapéuticos controlados y específicos. Este

proyecto tiene el objetivo de contribuir y presentar un precursor que posteriormente pueda ser una alternativa para el desarrollo de agentes terapéuticos utilizando la interfase entre la biología sintética y la nanotecnología.

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS, OBJETIVOS DEL PROYECTO

3.1 Hipótesis

La biosíntesis de nanopartículas (NPs) y la manipulación genética de *Escherichia coli Top10* para el control de la expresión génica en respuesta al estímulo externo de temperatura y potencialmente con luz, podrían ser medios precursores para el diseño de nuevos agentes terapéuticos.

3.2 Objetivo general

Transformar *E. coli Top 10* en la que sea posible la regulación de la expresión genética, tanto para la biosíntesis de nanopartículas; así como la respuesta a estímulos de temperatura que representen un precedente para el diseño de nuevos agentes terapéuticos.

3.3 Objetivos específicos

1. Clonar y transformar *Escherichia coli K12 DH5α* para la expresión de proteína quelante (PC).
2. Clonar y transformar *Escherichia coli Top 10* para la expresión de termosensor y la proteína mcherry.
3. Producir y caracterizar nanopartículas de Ag (AgNPs) por medio de *E. coli K12 DH5α* recombinante (Ec-PC).
4. Biosintetizar AgNPs por *Escherichia coli Top 10* (Ec-TS) y *Escherichia coli -ATCC 25922 (Migula) Castellani*.

5. Comprobar viabilidad de las cepas de *Escherichia coli* Top 10 (Ec-TS) y *Escherichia coli* -ATCC 25922 (Migula) Castellani (Ec-MC) en medio con diferentes concentraciones de AgNO₃.
6. Desarrollar una metodología para el control y manipulación en la expresión del termosensor de *E. coli* Top 10 (Ec-TS).

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología descrita a continuación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología ubicado en el CELAES de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL y en el Laboratorio de Nanotecnología en el CIDIIT ubicado en el PIIT.

4. 1 Bacterias recombinantes

La metodología para construir los plásmidos incluyó métodos clásicos para su clonación (digestión, ligación y transformación), la incorporación de las secuencias de los clones fueron confirmados por secuenciación (Genscript), para realizar las transformaciones se utilizaron dos cepas de *Escherichia coli*:

4.1.1 Escherichia coli K12DH5 α

Se utilizó como vector de clonación el plásmido pUC57 con resistencia a la ampicilina, T7 como terminador, además de las secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción *HindIII/EcoRI* y una secuencia sintética de oligonucleótidos que codifica a la proteína quelante (218pb), la cual se muestra a continuación:

```
GAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGTtgacagctagctcagtcctaggtataatgctagcAAA  
AAAATAAGGAGGTAAACCATGGAATGTGAATGTGAAGAATGTGAATGTGAA  
TGTGAATGTGAATGTGAATGTGAATGTGAATGTTAATACTAGTAGCGGCCG  
CTGCAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGA  
AGCTT
```

Las bacterias se cultivaron en medio LB Broth Miller (Luria-Bertani, Difco) líquido y sólido, con ampicilina SIGMA (100 μ g/ml), a 37°C, en agitación continua a 150rpm.

4.1. 2. Escherichia Top10

Se utilizó como vector de clonación el plásmido pUC57-Kan con marcador de selección para la Kanamicina, T7 como terminador, además de las secuencias para las enzimas de restricción (ligación) *HindIII/EcoRI* y una secuencia sintética 5'-UTR (U6 termosensor) que comprende el codón de inicio de la traducción de la proteína *mcherry* (906pb). La cual se muestra a continuación:

```
GAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGTtgacagctagctcagtcctaggtataatgctagcggatccT  
CTCCTTCaaaaaAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGAGATATACCCA
```

TGGTTAGCAAAGGTGAAGAAGATAATATGGCAATTATTAAGAATTTATGCG
TTTTAAAGTTCATATGGAAGGTAGCGTTAATGGTCATGAATTTGAAATTGAA
GGTGAAGGTGAAGGTCGTCCGTATGAAGGTACCCAGACCGCAAACACTGAA
AGTTACCAAAGGTGGTCCGCTGCCGTTTGCATGGGATATTCTGAGCCCGC
AGTTTATGTATGGTAGCAAAGCATATGTTAAACATCCGGCAGATATTCCGGA
TTATCTGAAACTGAGCTTTCCGGAAGGTTTTAAATGGGAACGTGTTATGAAT
TTTGAAGATGGTGGTGTGTTACCGTTACCCAGGATAGCAGCTTACAGGAT
GGTGAATTTATTTATAAAGTTAAACTGCGTGGTACCAATTTTCCGAGCGATG
GTCCGGTTATGCAGAAAAACAATGGGTTGGGAAGCAAGCAGCGAACGT
ATGTATCCGGAAGATGGTGCACCTGAAAGGTGAAATTAACAGCGTCTGAAA
CTGAAAGATGGTGGTCATTATGATGCAGAAGTTAAAACACCTATAAAGCA
AAAAACCGGTTTCAGCTGCCGGGTGCATATAATGTTAATA

TTAAACTGGATATTACCAGCCATAATGAAGATTATACCATTGTTGAACAGTA
TGAACGTGCAGAAGGTCGTATAGCACCGGTGGTATGGATGAACTGTATAA
ACTGGTTGCATAAACTAGTAGCGGCCGCTGCAGCATAACCCCTTGGGGCC
TCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGAAGCTT

Después de transformadas las bacterias se cultivaron en medio LB Miller (Luria-Bertani, marca Difco) sólido y líquido con Kanamicina SIGMA (100 µg / ml) a 37°C, en agitación continua (150 rpm) en el medio líquido.

Un indicio de la la transformación es el desarrollo de las colonias en los medios sólidos con antibiótico, adicionalmente en la *E coli Top 10 (Ec-TS)* es la coloración rosada en la UFC, para poder visualizar esto en medio líquido es necesario centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos.

Para confirmar la transformación de las cepas se aisló el DNAP (vector recombinante) de las bacterias crecidas en medio líquido con antibiótico (*Escherichia coli* K12DH5α/ampicilina y *Escherichia coli* Top10/kanamicina), para posteriormente ser secuenciados.

4.2 Biosíntesis y caracterización de nanopartículas (AgNPs) de Ag por medio de *E. coli* K12 DH5 α recombinante (Ec-PC).

En la biosíntesis de AgNPs se utilizarían dos cepas de *Escherichia coli*: *Ec-PC* para la biomineralización de AgNPs y *Ec-GFP* como control negativo, sin embargo; al realizar los ensayos ambas cepas presentaron capacidad de sintetizar las AgNPs, por lo que se utilizó a una tercera cepa de *E. coli* (*Ec-MC*), obteniendo el mismo resultado y probando finalmente a *Ec-TS*, se observó que las cuatro cepas podían ser utilizadas y que las cepas *Ec-PC* y *Ec-GFP* presentaban tiempos de crecimiento prolongados.

4.2.1 Reactivación de Ec-PC

Para reactivar a la cepa *E.coli* K12DH5 α de la cepa conservada en congelación se inocularon 50 μ l en un tubo con 5 ml de medio LB Broth, Miller (Difco) con ampicilina (100 μ g/ml). Se incubó a una temperatura de 37°C por 24 horas, con agitación de 150 rpm. Posteriormente se realizó dilución seriada seleccionando la dilución 1⁻⁵ para inocular por extensión en medio sólido LB Miller con agar bacteriológico (BIXON) al 2% y ampicilina 100 μ g/ml, se incubó nuevamente por 24 horas. Una vez desarrolladas las UFCs, se transfirió una UFC a 5ml de medio líquido LB, se incubó a las condiciones descritas anteriormente. Se repite el procedimiento en medio líquido y sólido previo al cultivo overnight.

4.2.2 Cultivo Overnight

Posteriormente se seleccionó una UFC y se inoculó en un matraz de 125ml con 20ml de medio LB/ampicilina a 150 rpm a 37 °C por 12-16 horas.

4.2.3 Ensayo: Biosíntesis AgNPs

Se tomó una alícuota de 1 ml de este cultivo por cada 50 ml de medio fresco LB/ampicilina, se incubó a 37°C a 150 rpm hasta alcanzar DO_{600} necesaria para cada ensayo experimental (DO_{600} 0.2 *lag* y DO_{600} 0.6 *log*). Al llegar a la DO_{600} deseada; se transfirieron 10 ml de este cultivo a tubos de ensayo con rosca (18X150mm) previamente preparados con la concentración de AgNO₃ requerida para cada experimento; se incubaron en las condiciones anteriormente descritas en oscuridad. Para favorecer la biomineralización de AgNPs se variaron los factores enunciados en la tabla II

TABLA II
FACTORES PARA MEJORAR LA BIOSÍNTESIS DE AgNPs POR
***Escherichia coli* K12DH5α (*Ec-PC*)**

Fase de crecimiento	[Ag]	Medio de cultivo	Condiciones
<i>lag</i>	0 μM	LB Miller	Cultivo completo
	10 μM	LB Lennox	
	20 μM	LB sin NaCl	Sobrenadante
	30 μM	Medio Cisteína	
	40 μM	Medio Nitrato	
	50 μM		
<i>log</i>	0 μM		Biomasa
	15 μM		
	30 μM		
	60 μM		
	120 μM		
	240 μM		
	0.5 mM		
	1 mM		
	2 mM		
	3 mM		
	4 mM		
	5mM		
	10 mM		

4.2.4 Muestreo y caracterización

De los tubos con tapón de rosca donde se desarrollaron los ensayos se muestreó a las 0, 2, 4, 6, 12 y 24 horas, tomado 100μl del cultivo se colocaron en una celda con 900μl de agua para evaluar la turbidez, posteriormente los muestreos se realizaron solo hasta completar las 6 horas. Para determinar turbidez se utilizó el espectrofotómetro Genesys 20, a una λ 600nm.

La caracterización incluyó un barrido espectrofotométrico, para identificar la presencia de las nanopartículas y tener una idea de la morfología y tamaño de las mismas; una microscopía electrónica de barrido (SEM) para confirmar la presencia y determinar el tamaño, además de un ensayo de espectroscopía de dispersión de rayos X (EDXs) para demostrar la presencia de plata.

De la dilución utilizada para medir la turbidez se tomó una alícuota de 30µl y se diluyó con agua a 300µl, para realizar la espectrometría UV-vis, en el rango de 200 a 800nm en espectrofotómetro VARIAN Cary 50.

Para la microscopía electrónica de barrido (SEM) y EDX, se eligieron las muestras que tuvieron el pico esperado en el espectro de absorción. Las muestras se trataron de la siguiente manera, se tomó un ml del cultivo, se centrifugó a 8000rpm por 5 minutos, se lavaron las células dos veces con buffer de fosfatos, se liofiliza para eliminación de agua, posteriormente del sólido obtenido se colocó una porción en una cinta de grafito para realizar la observación al microscopio y consecutivamente realizar espectrometría EDX en el área de nanotecnología del CIIDIT.

4.3 Biosíntesis de AgNPs por *Escherichia coli* Top 10 (Ec-TS) y *Escherichia coli* -ATCC 25922 (Migula) Castellani.

4.3.1 Reactivación de cepas *Escherichia coli* Top 10 (Ec-TS) y *Escherichia coli* -ATCC 25922 (Migula) Castellani.

Para reactivar a la cepa *E.coli* Top 10, de la cepa conservada en congelación se inocularon 50 µl en un tubo con 5 ml de medio LB Broth, Miller (Difco) con kanamicina (100 µg/ml). Se incubó a una temperatura de 37°C por 24 horas, con agitación de 150 rpm. Posteriormente se realizó dilución seriada seleccionando la dilución 1⁻⁵ para inocular por extensión en medio sólido LB Miller con agar bacteriológico (BIXON) al 2% y kanamciina 100µg/ml, se incubó nuevamente por 24 horas. Una vez desarrolladas las UFCs, se transfirió una UFC a 5ml de medio líquido LB, se incubó a las condiciones descritas anteriormente. Se repite el procedimiento en medio líquido y sólido previo al cultivo overnight.

4.3.2 Cultivo Overnight

Posteriormente se tomó una UFC y se inoculó en un matraz de 125ml con 20ml de medio LB kanamicina a 250 rpm a 37°C por 12-16 horas.

En el caso de *Escherichia coli* ATCC 25922 (Migula) Castellani el procedimiento es igual desde la reactivación, exceptuando el uso de antibiótico.

4.3.3 Ensayo: Biosíntesis AgNPs

En ambos casos se tomó 1 ml de este cultivo por cada 50 ml de medio LB Lennox fresco para EC-TS se agregó Kanamicina 100µg/ml, se incubó a 37°C a 150 rpm hasta alcanzar la DO₆₀₀ 0.6 y se transfirieron 5 ml de este cultivo a tubos Falcon de 15ml, previamente preparados con la concentración de AgNO₃ requerida para cada experimento; se incubaron en las condiciones anteriormente descritas en oscuridad. Para favorecer la biomineralización de AgNPS se variaron los factores enunciados en la tabla II:

TABLA III
FACTORES PARA MEJORAR LA VIABILIDAD DE LAS CEPAS Y LA BIOSÍNTESIS DE AgNPS

[AgNO ₃]	Medios cultivo	de	Condiciones de cultivo	Cepas	Nomenclatura asignada	
0 µM	LB Lennox		Biomasa	<i>Ec K12DH5 α</i> recombinante (proteína quelante)	Ec-PC	
15 µM	LB sin NaCl		Sobrenadante			
30 µM	Medio Nitrato					
60 µM	LBN (LB Lennox, KNO ₃)		Cultivo completo	<i>Ec Migula Castellani ATCC25922</i>	Ec-MC	
120 µM						
240 µM	LBE (LB Lennox, KNO ₃ y lactosa)				<i>Ec Top 10</i> recombinante con secuencia U6 + proteína mcherry	Ec-Ts
0.5 mM						
1 mM						

Los muestreos se realizaron por 6 horas (0, 4 y 6), se tomó una alícuota de 100µl del cultivo se colocaron en una celda con 900µl de agua para evaluar la turbidez empleando como blanco medio LB, utilizando el espectrofotómetro Genesys 20 a una λ 600nm. Se realizó caracterización por medio de espectrometría UV-vis, en una dilución 1:100 en espectrofotómetro VARIAN Cary 50.

4.4 Comprobar viabilidad de las cepas de *Escherichia coli* Top 10 (Ec-TS) y *Escherichia coli* -ATCC 25922 (Migula) Castellani (Ec-MC) en medio con diferentes concentraciones de AgNO₃.

Inicialmente el crecimiento de las bacterias sería medido por turbidimetría, sin embargo, aunque este método permiten establecer la población total de microorganismos existentes, no es posible diferenciar a las células vivas de las muertas, adicionalmente esta puede aumentar por la presencia o intensidad de coloración del medio.

Para realizar este conteo inicialmente se tomaron alícuotas de 100 µL del cultivo en cada muestreo, para posteriormente realizar dilución seriada por extensión, sin embargo por la cantidad de muestras se cambió el procedimiento y se realizó el método de gota en superficie, el cual consistió en efectuar diluciones seriadas en solución salina al 0.85% de cada cultivo hasta la dilución 10⁻⁶. Inmediatamente se depositan 20µl de cada dilución, en el sector correspondiente de la placa, se mantienen en la campana hasta la completa absorción de la gota y se incuban a 37°C durante 24h, por triplicado,

originalmente se realizó con medio LB Lennox, continuando con LBN y finalmente con medio LBE.

El crecimiento de bacterias posterior a la biosíntesis de NPs no era el esperado, por lo que fue necesario la adaptación de las cepas, es decir; del crecimiento de bacterias de los medios de cultivo expuestos a concentraciones menores de Ag por el método de gota en superficie, se seleccionó una UFC se reactivó para después aumentar la concentración de Ag, la reactivación se realizó con los diferentes medios de cultivo.

Los reactivos y concentraciones para la elaboración de los medios de cultivo utilizados en los ensayos se muestran en la tabla IV.

TABLA IV
COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO PARA MEJORAR LA VIABILIDAD DE LAS CEPAS y LA BIOSÍNTESIS DE AgNPS

Sales y Reactivos	LB Lennox	LBN	LBE
Peptona	1%	1%	1%
NaCl	0.5%	0.5%	0.5%
Extracto de levadura	0.5%	0.5%	0.5%
KNO ₃	0	0.1%	0.1%
Lactosa	0	0	1%
Agar bacteriológico	2%	2%	2%

4.5 Desarrollar una metodología para el control y manipulación en la expresión del termosensor de Top 10.

La reactivación de Ec-TS se describió anteriormente. Para determinar las condiciones que favorecen a la expresión de la proteína *mcherry* es necesario evaluar el crecimiento de la cepa, la actividad del termosensor y la expresión de *mcherry*. En la etapa de biosíntesis de AgNPs se observó la coloración rosada tenue de Ec-TS a 150rpm, durante el ensayo para la expresión macroscópica de *mcherry* se trabajó a 220rpm, se utilizaron dos medios de cultivo (LB y LBA), a dos diferentes temperaturas (30° y 37°C). El crecimiento fue determinado por turbidimetría a una λ 0.1 en un matraz de 125ml con 15ml de medio de cultivo, 50 μ l de inóculo, se añadió Kanamicina a una concentración de 100 μ g/ml y se muestreo a las 0, 3, 6, 12 y 24h. El crecimiento se evaluó por turbidimetría a DO₆₀₀, tomando una alícuota de 100 μ l aforado a 1000 μ l con agua. La expresión de la proteína *mcherry* se evaluó por espectrofluorimetría a las 0, 1, 2, 3, 4 y 5 horas por triplicado; para esto se tomó una alícuota de 10 μ l del cultivo, se aforó con 990 μ l de agua en una celda de cuarzo.

La tabla V describe los componentes y concentraciones utilizadas para evaluar la expresión macroscópica de la proteína *mcherry*.

TABLA V
COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA EXPRESIÓN DE LA
PROTEÍNA *mcherry*.

Sales y Reactivos	LBA	LB
Peptona	1%	1%
NaCl	0.5%	0.5%
Extracto de levadura	0.5%	0.5%
Arabinosa	0.02%	---

4.6 Conservación de Cepas

Para preservar las cepas utilizadas, se realizó el procedimiento ya descrito para la reactivación de cada una de las cepas; del cultivo overnight se tomó una alícuota de 400µl, se agregan a un tubo Eppendorf previamente preparado con 600µl de glicerol al 50% y son conservados a una temperatura de -20°C.

4.7 Disposición de residuos generados

Los procedimientos de disposición de residuos fueron efectuados de acuerdo con lo establecido en los lineamientos del Departamento del Medio Ambiental y Seguridad de la Facultad de Ciencias Químicas y laboratorios colaboradores.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

5.1 Bacterias recombinantes

Para asegurar la incorporación de las secuencias de interés en los vectores con que se transformaron las bacterias, se realizó la secuenciación de los vectores extraídos de las bacterias recombinantes.

5.1.1 *Escherichia coli* k12DH5 α (Ec-PC)

El reporte de secuenciación del plásmido recombinante indica las secuencias de corte de las enzimas de restricción e incorporación de nuestra secuencia de interés, reportando un total de 2847 pb, el pUC57 contiene 2631pb sin modificar, el reporte detallado se encuentra en el apartado de apéndice.

En la figura 5.1 se muestra la secuencia sintética de los 22 aminoácidos que forman la proteína quelante que fue incorporada al plásmido y está a la bacteria transformada. En la figura 5.2 se observa el crecimiento de UFC, esta cepa transformada contiene la secuencia sintetizada para la expresión de la proteína quelante y como marcador de selección la resistencia a ampicilina.

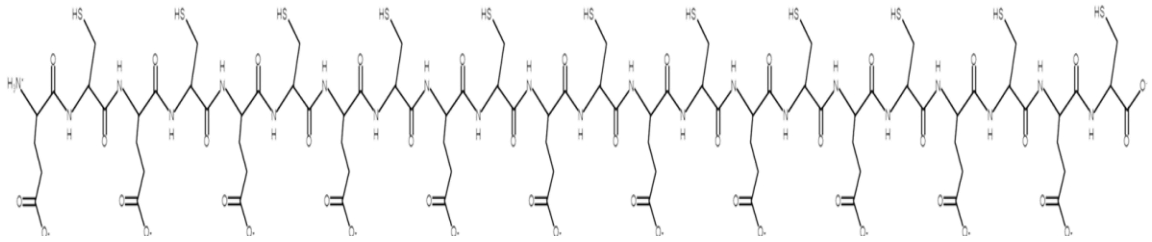


Figura 5.1 Secuencia sintética de la proteína *quelante*

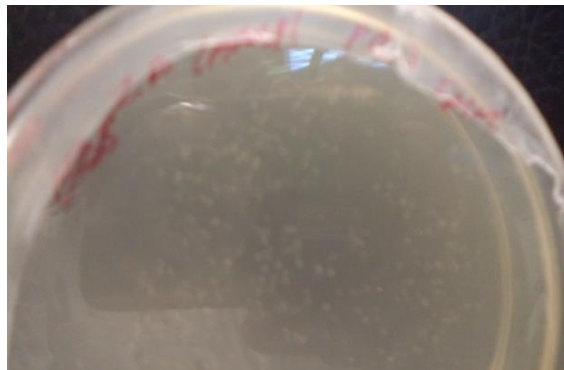


Figura 5.2. UFC de *Escherichia coli* *k12 DH5α* transformada para la expresión de proteína *quelante* (PC).

5.1.2 *Escherichia coli* Top 10

A esta cepa se incorporaron la secuencia para la expresión del termosensor 5'-UTR (U6 termosensor) que comprende el codón de inicio de la traducción de la proteína *mcherry*. El reporte de secuenciación del plásmido recombinante indica las secuencias de corte de las enzimas de restricción e incorporación de nuestra secuencia de interés, reportando un total de 3161 pb., el reporte detallado se encuentra en el apéndice.

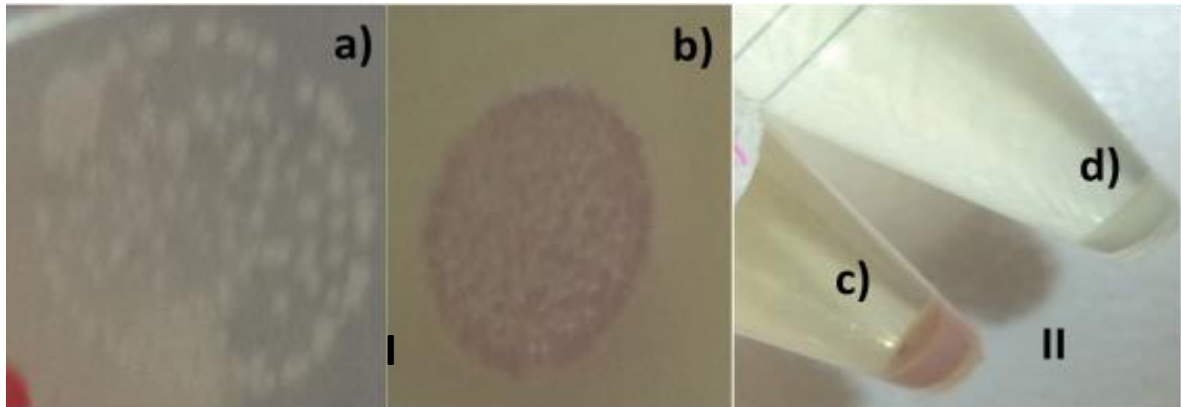


Figura 5.3 Crecimiento de las cepas recombinantes en medio sólido (I) y líquido (II). En I se puede observar el color de las colonias sobre el agar a) Ec-MC, UFC blancas; b) Ec-TS, UFC rosas. En II se puede observar el color de la biomasa obtenida después de \emptyset el cultivo de las cepas c) Ec-TS, UFC rosas y d) Ec-MC, UFC blancas.

En la figura 5.3 se muestra un comparativo de coloración de las UFC de Ec-MC y Ec-TS, en las cuales se observa: en Ec-MC una tonalidad habitual (blanca/beige), tanto en medio líquido como en medio sólido, mientras que las UFC de la cepa Ec-TS muestran una coloración violeta-rosada en medio sólido, para poder visualizar esto en medio líquido es necesario centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos.

5.2 Biosíntesis de AgNPs

5.2.1 Efecto de los factores utilizados en la biosíntesis de AgNP

La biosíntesis de nanopartículas es favorecida en la fase *log* DO_{600} 0.6, adquiriendo una tonalidad del medio de cultivo amarillo, marrón a café color característico reportado para las AgNPs esféricas con un pico en el espectro de absorción de $\approx 420\text{nm}$ (Mathur *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2012;

Mulfinger *et al.*, 2007; Dubey *et al.*, 2010; Duran *et al.*, 2005)): el cambio de color es debido a la excitación de las vibraciones de la superficie de plasmón debido a la interacción de la luz y nanopartículas metálicas ((Mohandass *et al.*, 2013; Lamprecht *et al.*, 2000).

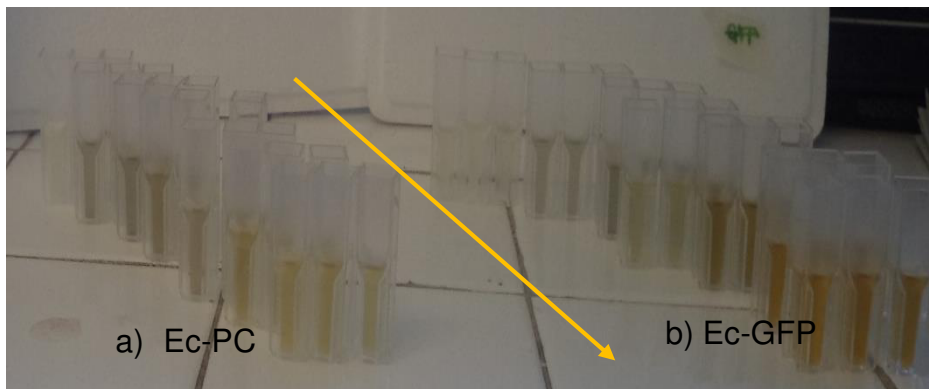


Figura 5.4. Biosíntesis de AgNPs por a) *Ec-PC* y b) *Ec-GFP*

Puede observarse en la figura 5.4 la biosíntesis de AgNPs por 2 cepas de *Escherichia coli*: a) *Ec-PC* y b) *Ec-GFP* con diferentes concentraciones de AgNO_3 , la flecha indica una concentración ascendente en dirección a la punta: 0, 30 μM , 60 μM , 120 μM , 240 μM , 0.5mM, 1mM, 5mM, 10mM, donde es evidente el cambio de coloración de los cultivos con diferentes concentraciones de AgNO_3 . El color amarillo presente en estas muestra indican la formación de AgNPs en medio de cultivo LB.

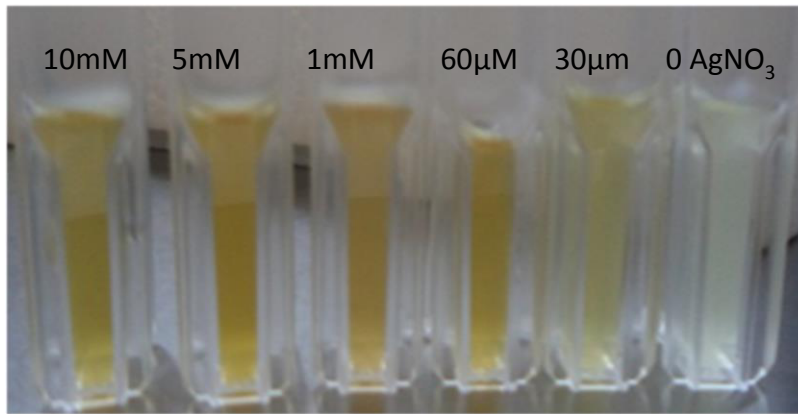


Figura 5.5 Biosíntesis de AgNPs por *Ec-PC*

En la figura 5.5 se observa la biosíntesis de AgNPs *Ec-PC* con diferentes concentraciones de AgNO_3 , 0, $30\mu\text{M}$, $60\mu\text{M}$, 1mM, 5mM, 10mM, donde la concentración de Ag es directamente proporcional a la adquisición y aumento de la coloración amarilla al medio de cultivo LBN.

Se mostró evidencia de la biosíntesis de AgNPs por el cambio de coloración del medio de cultivo, sin embargo tanto *Ec-PC* como *Ec-GFP*, después del cultivo overnight presentaban un tiempo de crecimiento prologado de aproximadamente 6 a 8 hrs para alcanzar la DO_{600} de 0.6, por lo que ambas cepas fueron descartadas.

Al descartar las cepas *Ec-PC* y *Ec-GFP* por su lento crecimiento, se recurrió a *Ec-MC* y *Ec-TS* para la biosíntesis de AgNPs. Se utilizó el medio de cultivo LBN y LBE, como se describió anteriormente esto favoreció a una mayor biosíntesis de AgNPs lo que incremento la longitud de onda de absorción, lo cual indica un mejor tamaño de NPs.

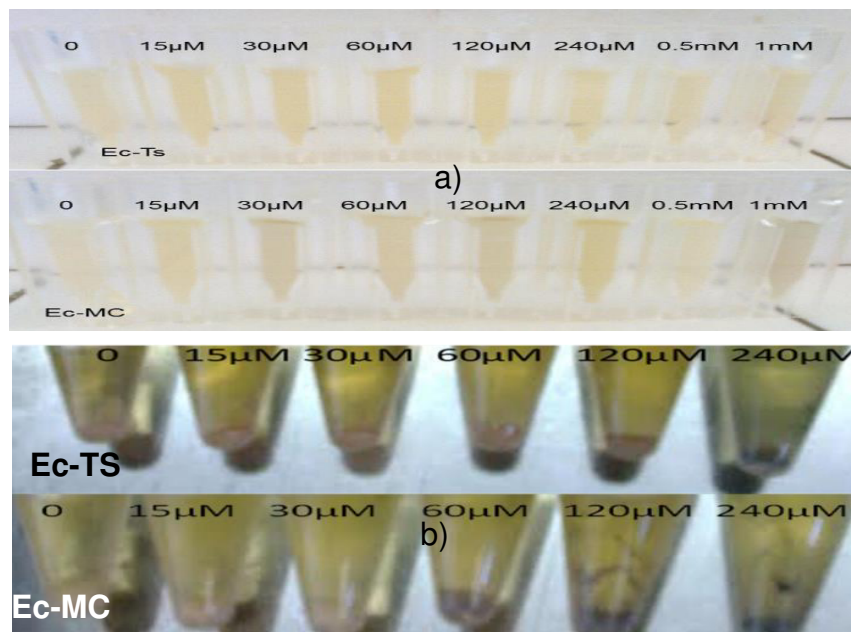


Figura 5.6 Biosíntesis de AgNPs por *Ec-TS* y *Ec-MC* en medio de cultivo LBE y con diferentes concentraciones de AgNO_3

En la figura 5.6 se puede observar: a) que el color del medio adquirió un tono amarillo, además de una disminución de turbidez con el incremento en la concentración de AgNO_3 en *Ec-TS*, sin embargo debido a que con la cepa *Ec-MC* el color del medio fue de amarillo a marrón, en b) además, al centrifugar las muestras también se observa la formación de exopolisacárido en algunas muestras ocasionado por el estrés en el que se encuentran las bacterias y una agregación de coloración de partículas oscura, la formación de agregados puede ser dada por el aumento de la fuerza iónica global, aunque también puede ser provocado por la adición de electrolitos como NaCl , ya que la sal protege las

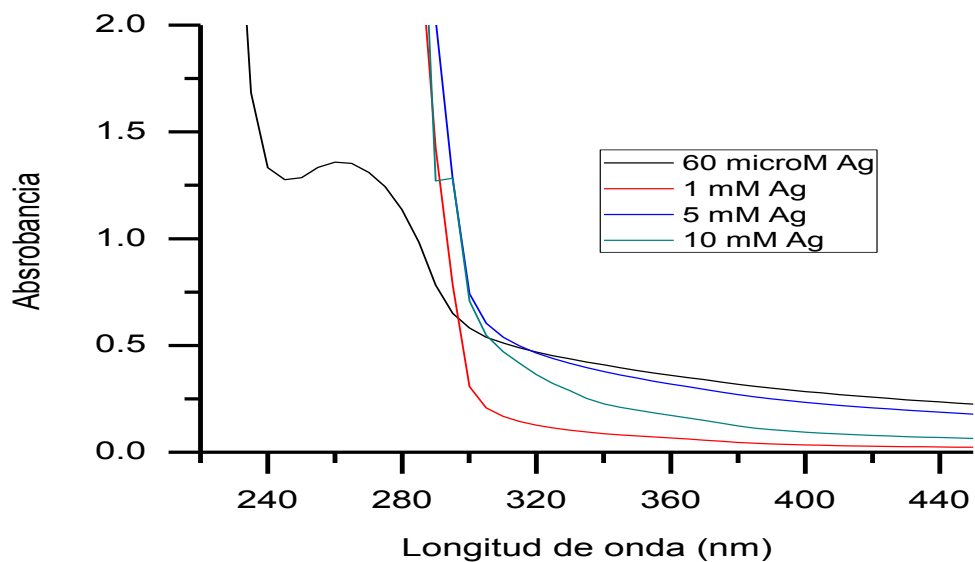
cargas que permiten que las partículas se agrupen para formar agregados (Solomon *et al.*, 2007).

5.2.2 Espectrofotometría UV-vis

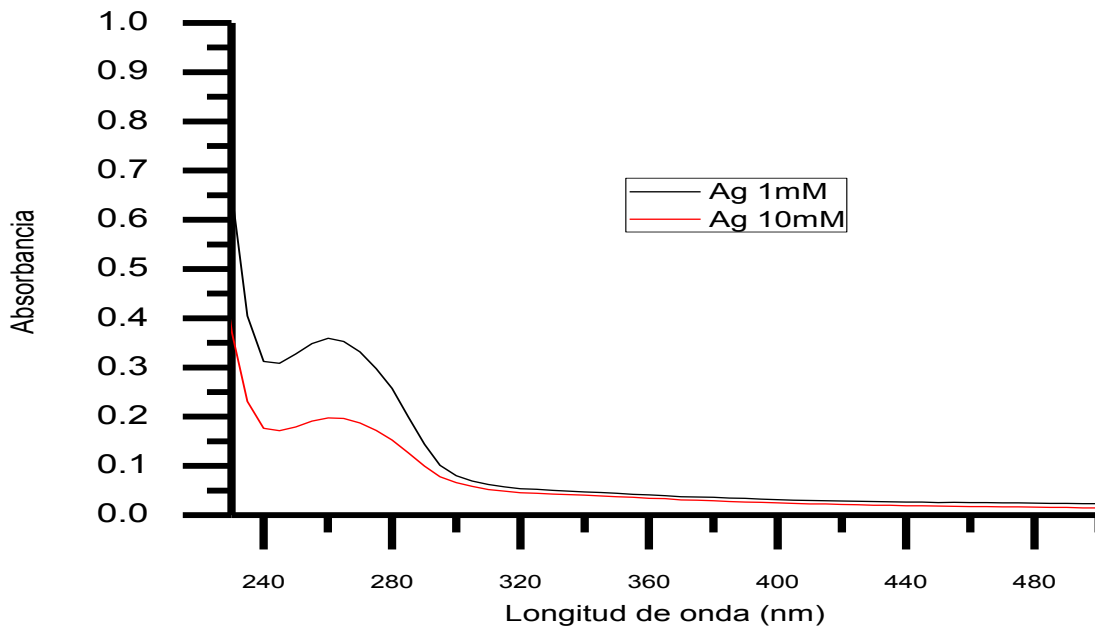
Se realizó caracterización por medio de espectrofotometría UV-vis, ya que el espectro proporciona un pico característico o firma espectroscópica para indicar la formación de AgNPs (Mohandass *et al.*, 2013). El tamaño y forma de las nanopartículas de metal determinan la posición espectral de la banda de absorción del plasmón así como su amplitud (Mohandass *et al.*, 2013; Huang y Xu., 2010), generalmente el espectro de absorción para las AgNPs es de 420nm (Logeswari *et al.*, 2012; Dubey *et al.*, 2010; Huang y Xu., 2010), Sujatha *et al.*, 2013 refieren que la biogénesis de AgNPs se produce a 300 nm, teniendo un rango en Uv-Vis de 342 a 450nm para las AgNPs (Mohandass *et al.*, 2013; Sathishkumar *et al.*, 2009).

En la gráfica 5.1 y 5.2 se observa que los picos de las AgNPs en los espectros de absorción que se obtenían con los medios de cultivo LB y LBN eran de λ 240 a 290nm independientemente de la concentración de AgNO₃ y de la cepa de *E. coli* utilizada (*Ec-GFP*: 60 μ M a 10 mM de AgNO₃ en medio de cultivo LB y *Ec-PC*: , de 1mM y 10mM de AgNO₃, en medio de cultivo LBN), estando estos rangos de longitud de onda fuera de los valores reportados por Logeswari *et al.*, 2012; Dubey *et al.*, 2010; Huang y Xu., 2010; Sujatha *et al.*, 2013

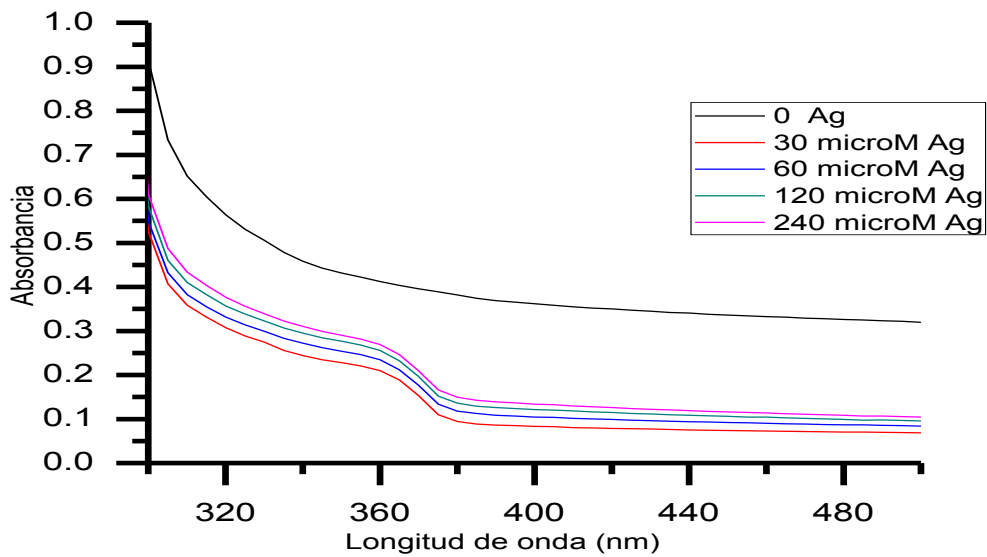
Mohandass *et al.*, 2013; Sathishkumar *et al.*, 2009, entre otros autores. Al enriquecer el medio de cultivo se favoreció la biosíntesis de AgNPS al incrementar la λ al rango de 330 a 390nm del espectro de absorción; esto puede observarse en las gráficas 5.3 y 5.4 con *Ec-PC* en concentraciones de 0 a 240 μ M y de 0 a 1mM de AgNO₃ respectivamente en medio de cultivo LBE y en la gráfica 5.5 se observa este incremento con la cepa *Ec-MC* en una concentración de 0 a 1mM de AgNO₃. Estos valores concuerdan con lo esperado, ya que al adicionar lactosa al medio de cultivo favorece la reducción de Ag.



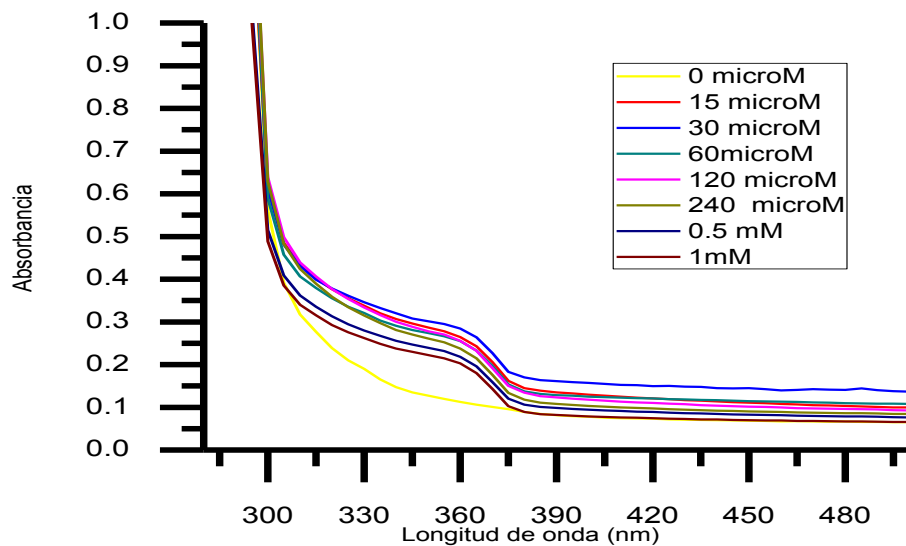
Gráfica 5.1. Espectrofotometría UV-Vis, *Ec-GFP*, en medio de cultivo LB.



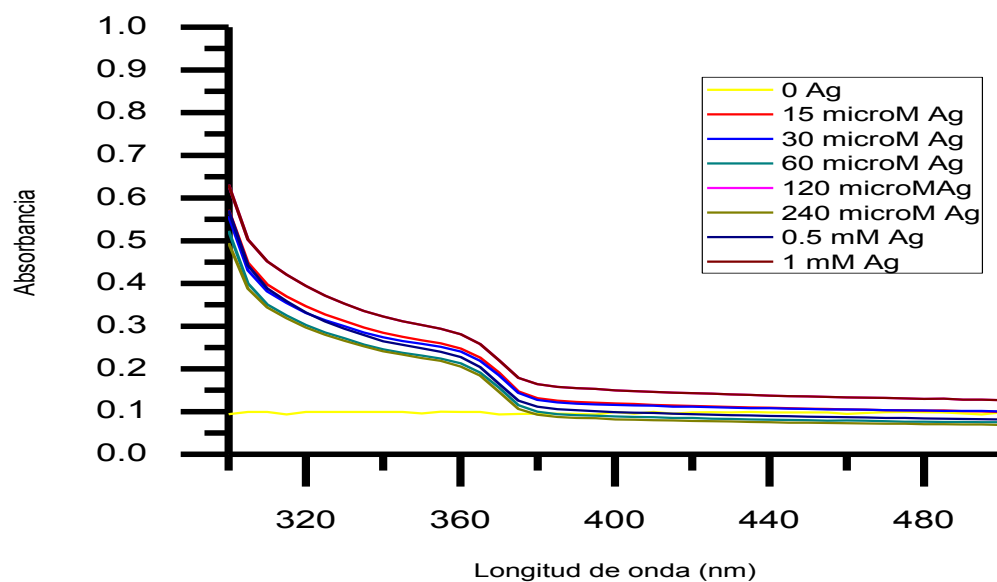
Gráfica 5.2. Espectrofotometría UV-Vis, *Ec-PC*, en medio de cultivo LBN.



Gráfica 5.3. Espectrofotometría UV-Vis de la cepa *Ec-PC* en medio de cultivo LBE.



Gráfica 5.4. Espectrofotometría UV-Vis, Ec-TS, en concentraciones de 0 a 1 mM de AgNO₃, a 2h de incubación



Gráfica 5.5 Espectrofotometría UV-Vis, Ec-MC, en concentraciones de 0 a 1 mM de AgNO₃, 2h de incubación.

5.2.3 Microscopía Electrónica de Barrido y Espectroscopia por dispersión de energía de Rayos X

Se utilizó microscopía electrónica de barrido para analizar la estructura de las nanopartículas que se formaron. En la figuras 5.7 y 5.8 se puede observar que AgNPs eran de forma esférica y semiesférica. También se puede observar que las NPs recubren la bacteria además de dispersarse en el medio de cultivo en *Ec-PC*, en tiempo 0 a una concentración 1mM AgNO₃ y en 10mM en 2h, respectivamente. Bajo una concentración 10mM en 2 horas, se detectaron AgNPs de un tamaño de 48.6nm, lo cual es muy aproximado a lo reportado por Nath *et al.*, (2013) el cual es de 50nm en *E coli*, anteriormente Klaus *et al.*, (1999) refieren que Slawson *et al.*, reportaron que la biosíntesis de AgNPs por *Pseudomonas stutzeri* AG259 (1992) son de un rango de 35 a 46nm.

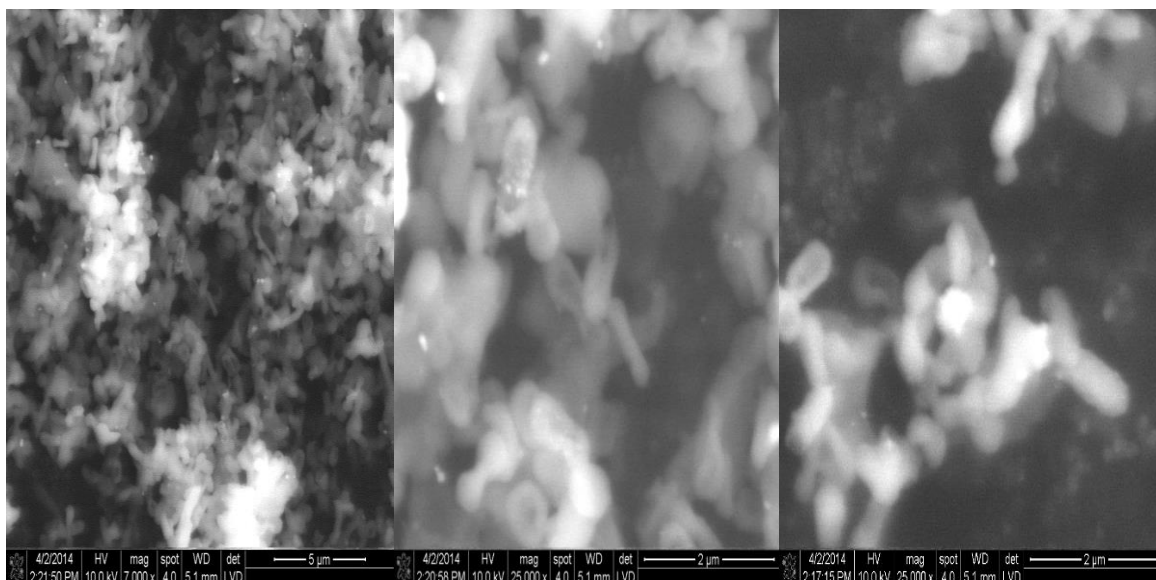


Figura 5.7 Micrografías SEM en *Ec-PC*; 0h, 1mM AgNO₃

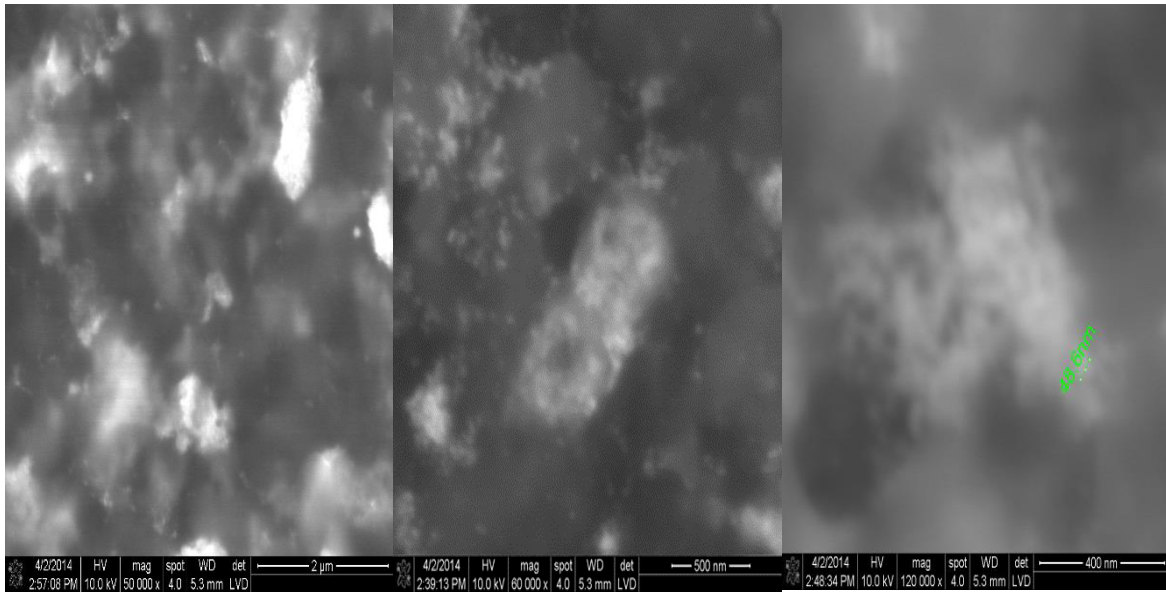


Figura 5.8 Micrografías SEM en *Ec-PC*; 2h, 10mM AgNO₃

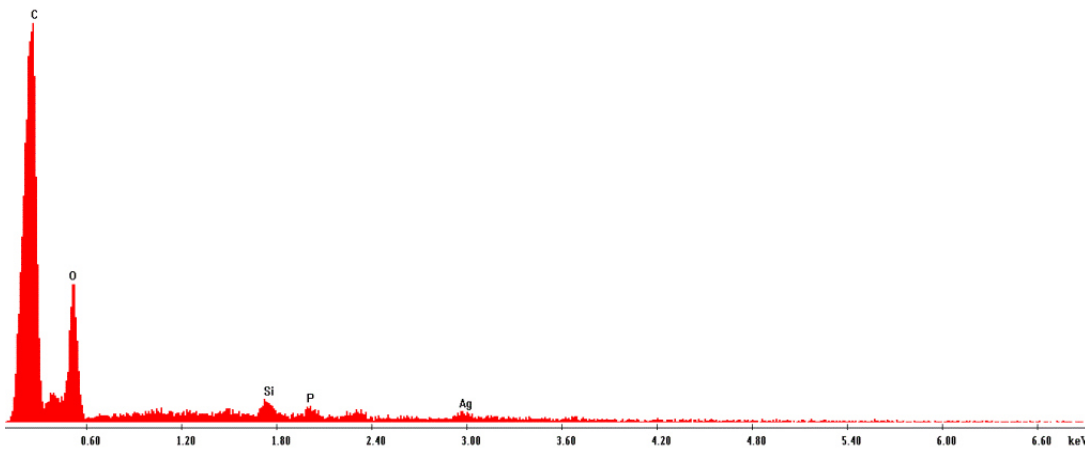


Figura 5.9 Espectro EDX de *Ec-PC*; 0h, 1mM AgNO₃

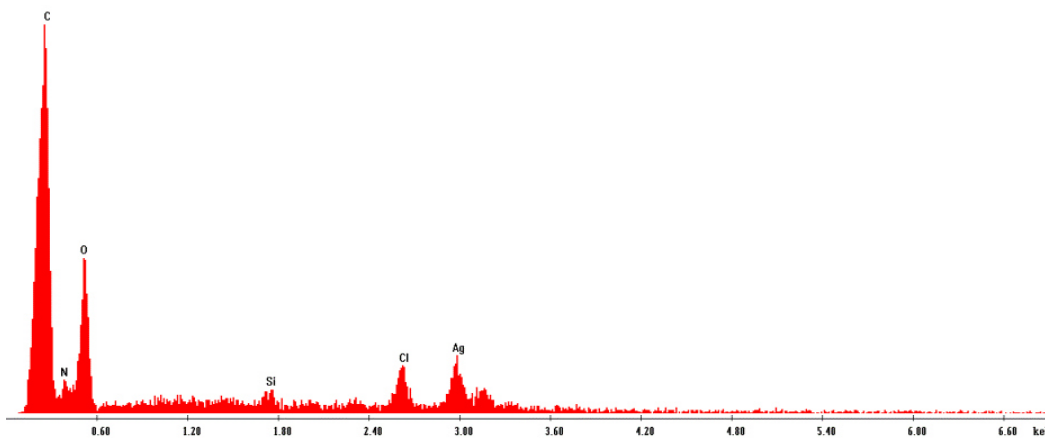


Figura 5.10 Espectro EDX de *Ec-PC*; 2h, 10mM AgNO₃

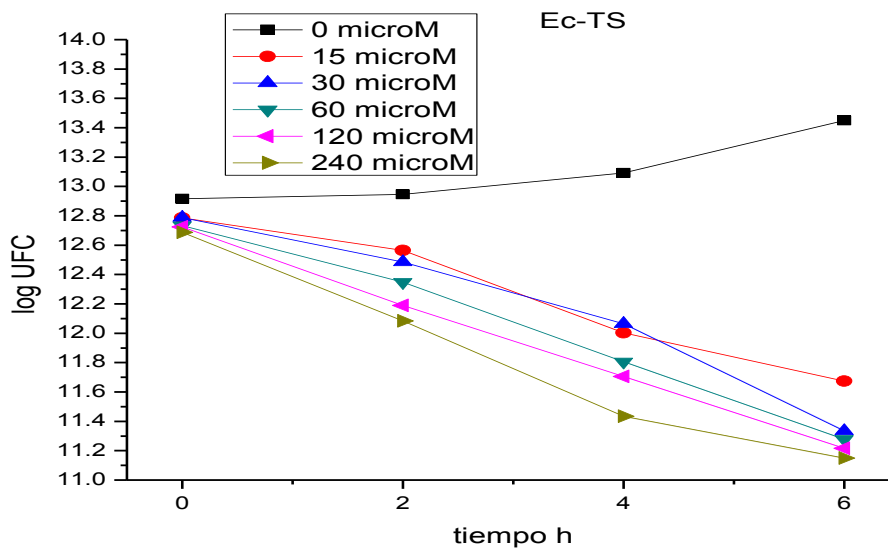
La presencia de Ag se puede observar en las figuras 5.9 y 5.10 confirmado por el análisis EDX de las nanopartículas obtenidas, lo que indica la reducción de iones de plata (Dubey *et al.*, 2010); Las AgNPs muestran por lo general un pico de absorción aproximado a 3 keV (Baharara *et al.*, 2014, Wei *et al.*, 2012; Dimitrijević *et al.*, 2013; Bar *et al.*, 2009), en los espectros obtenidos se puede observar el incremento de intensidad en la detección de Ag proporcional a la concentración utilizada en los ensayos que son de 1 y 10mM respectivamente.

5.3 Evaluación del crecimiento de *Ec-TS* y *Ec-PC* posterior a la biosíntesis de AgNPs.

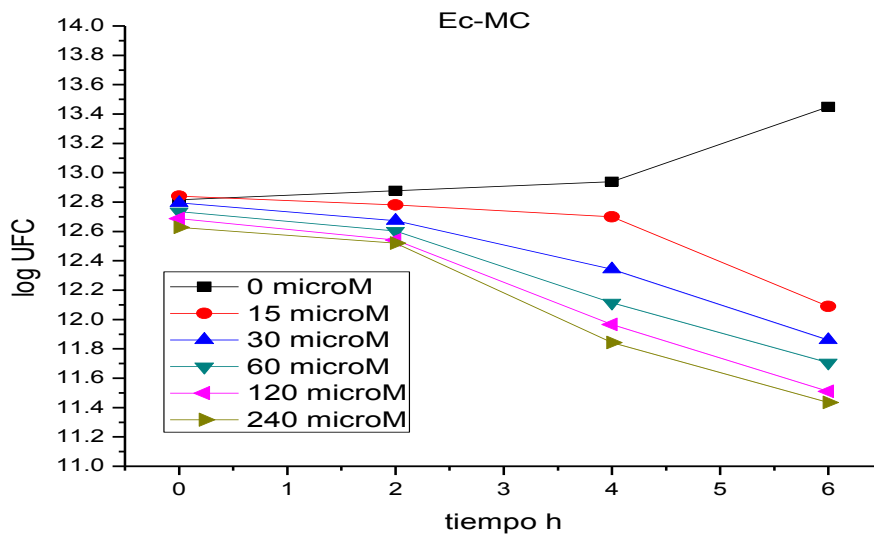
Durante el ensayo se utilizó un control positivo para evaluar la viabilidad de las bacterias y compararla con la viabilidad de las bacterias en contacto con AgNO₃; para incrementar la viabilidad de las bacterias fue necesario la adaptación en AgNO₃ en concentraciones ascendentes y modificación del medio de cultivo, la reactivación se realizó con los diferentes medios de cultivo, sin embargo el crecimiento de las

bacterias en los medios LB sin modificar fue muy escaso a nulo, en LBN escaso y en LBE fue el medio de cultivo con mejores resultados.

La modificación del medio de cultivo favoreció la viabilidad y la biosíntesis de NPs en diferentes concentraciones de AgNO_3 , en la gráfica 5.6 y 5.7 se observó que al aumentar la concentración de AgNO_3 el número de UFC disminuye comparado con las bacterias en ausencia de AgNO_3 , la disminución de UFC es esperada, por lo que el número de UFC es aceptable. Los datos graficados se encuentran en el apéndice.



Gráfica 5.6. Viabilidad de la cepa Ec-TS con diferentes concentraciones de AgNO_3 .

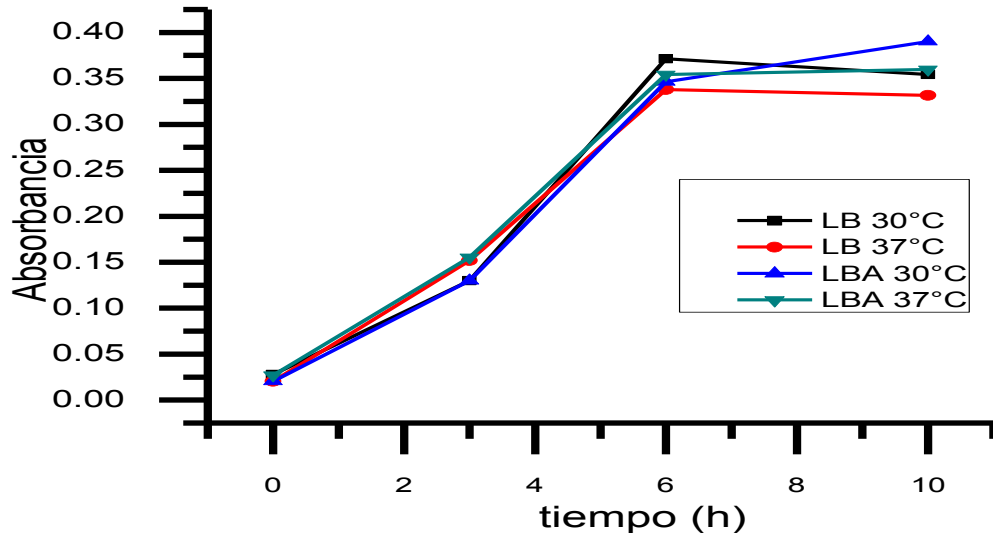


Gráfica 5.7. Viabilidad de la cepa Ec-MC con diferentes concentraciones de AgNO_3 .

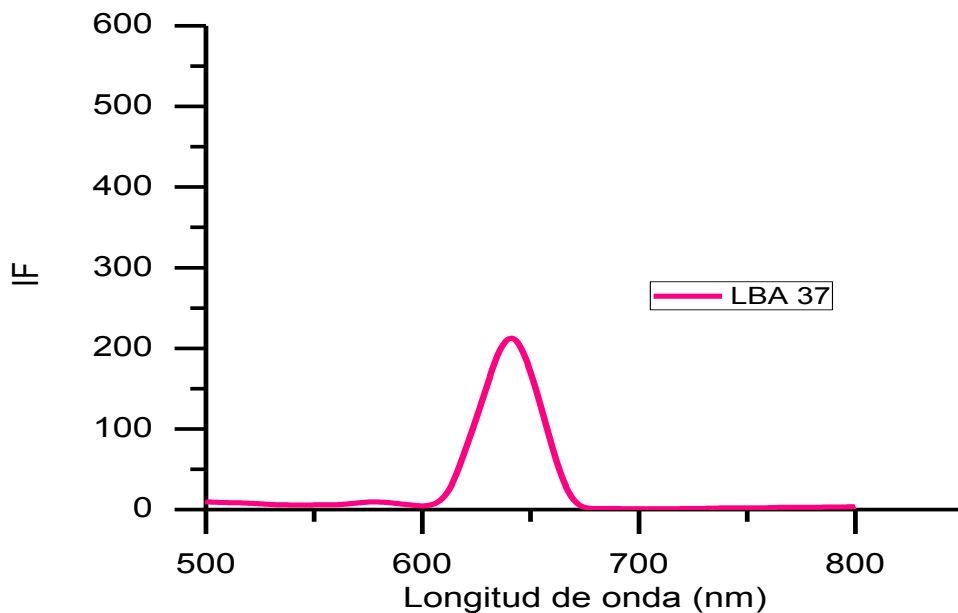
5.4 Efectos de los factores en la expresión de la proteína *mcherry*

La coloración de las UFC es un indicador de la expresión de la proteína *mcherry*. Para desarrollar la metodología para el control y expresión macroscópica de la proteína *mcherry* fue necesario conocer las condiciones que favorecen la coloración de las UFC. Se utilizaron dos medios de cultivo a dos temperaturas para corroborar el efecto de estos factores en la coloración de las UFC; en la gráfica 5.8 se observa que se obtiene un mayor crecimiento en medio LBA a 30°C y en la figura 5.11 se visualiza una mayor coloración en medio LBA a 37°C. Esto coincide con lo esperado ya que cuando el microorganismo crece a mayor temperatura la estructura del termosensor es diferente y queda accesible para su expresión. En la gráfica 5.9 se observó la intensidad de fluorescencia, además de una longitud máxima de emisión de 610nm que coincide con reportes anteriores (Shaner *et al.*,

2004; Shaner *et al.*, 2005; Müller-Taubenberger y Anderson., 2007; Fan *et al.*, 2008).



Gráfica 5.8. Curva de crecimiento de la cepa *mcherry* (*Ec-TS*) en medios de cultivo LB y LBA a 30°C y 37°C.



Gráfica 5.9. Espectro de emisión de fluorescencia de la cepa *mcherry* (*Ec-TS*) en medio de cultivo LBA a 37°C.

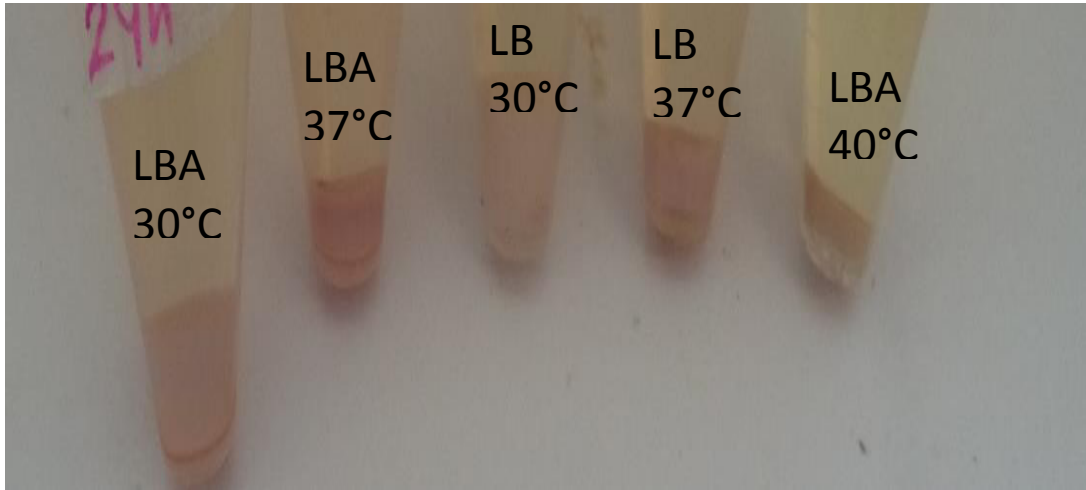


Figura 5.11 Cultivos de la cepa Ec-TS para evaluar la expresión de mcherry en Medio LB y LBA a 30°C y 37°C.

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN

El reporte de secuenciación indica la incorporación de la secuencia de interés, en *Escherichia coli K12DHa* el reporte muestra un total de 2847pb, el pUC57 contiene 2631pb, la diferencia en el número de pb se debe al tamaño de la secuencia codificante para la proteína *quelante*. En *Escherichia coli* Top 10 la expresión del termosensor y la proteína *mcherry* es evidente por la coloración presente en las UFC, el reporte de secuenciación indica las enzimas de restricción e incorporación de nuestra secuencia de interés, reportando un total de 3404pb, el pUC75-Kan contiene 2500pb; el reporte detallado de la secuenciación de ambas cepas se encuentra en el apéndice I.

Se variaron factores, ya descritos en la metodología en la cual se pudo determinar que los elementos que favorecen la biosíntesis de NPs en estas cepas fueron:

Fase de crecimiento: Se utilizaron la fase *lag* y la fase *log*, obteniendo mejores resultados con la fase *log* esto puede ser originado porque la fase de transición (*lag*) es el período inicial en la vida de una población bacteriana, cuando las células se están adaptando a un nuevo entorno (Rolfe *et al.*, 2011), representa el tiempo necesario para reiniciar el ciclo celular en los primeros minutos posteriores

al inicio del cultivo, se incrementa la expresión de los genes importantes para el crecimiento y en la fase exponencial representa el periodo en el que hay suficientes nutrientes; las bacterias recuperan el ciclo celular e incrementan su número exponencialmente (Ramírez *et al.*, 2005), cuando *Escherichia coli* entra en la fase estacionaria sintetiza alrededor de 30 proteínas, que no se encuentran en las células en la fase *log* y modifica la composición de algunos de los ácidos grasos de sus membranas (Ramírez *et al.*, 2005; Chung *et al.*, 2006; Pagán y Mackey, 2000) que confiere resistencia al estrés físico y químico (Chung *et al.*, 2006; lo que hace vulnerable a las bacterias en fase *lag* y *log*; por ejemplo Chung *et al.*, (2006) contrastaron trabajos anteriores con resultados diferentes e infirieron la posibilidad de que la variación de la resistencia a la acidez en *E. coli* podría ser ocasionada por el estado fisiológico de las bacterias, entre otros factores; (Rowbury (1995) utilizó células de *E.coli* en fase estacionaria que puede haber dado lugar a células en fase de mayor resistencia a los ácidos en comparación con el uso de bacterias de fase *log* (Paul y Hirshfield 2003). Estos resultados difieren en diferentes cepas de *E. coli* en shock osmótico de acuerdo con los resultados de Nossal y Happel (1966), en los cuales células en fase estacionaria disminuyen en un 50% la liberación de enzimas en comparación con células en fase exponencial (Cheung *et al.*, 2009).

Concentración de AgNO₃: Con el objetivo de evaluar si la concentración es determinante en la síntesis y tamaño de nanopartículas, se utilizaron diferentes concentraciones de AgNO₃, ya descritos en la metodología y los resultados. En las figuras 5.4-5.6 se puede observar que el cambio de coloración causado por la resonancia de plasmón (relacionada directamente con la síntesis de AgNPs), es

directamente proporcional al incremento en la concentración de AgNO_3 . En los medios de cultivo sin modificar la síntesis máxima de AgNPS ocurrió con las concentraciones de AgNO_3 de $60\mu\text{M}$, 1mM , 5mM y 10mM , la mayoría de estas concentraciones coinciden con los resultados obtenidos con sobrenadantes de cultivos microbiológicos tanto como de filtrados de extractos de plantas, obteniendo los mejores resultados de síntesis en concentraciones de AgNO_3 $1\text{-}5\text{mM}$ (Gurunathan *et al.*, 2009; Safecordi *et al.*, 2011; Rodríguez-León *et al.*, 2013; Umoren *et al.*, 2014; Gavade *et al.*, 2015). Sin embargo, estas concentraciones son muy altas para cultivos viables, por lo que se trabajó con medios de cultivo modificados, con buenos resultados en concentraciones de $15\mu\text{M}$ - $240\mu\text{M}$.

Condiciones del medio de cultivo: Se trabajó con tres condiciones; cultivo completo, sobrenadante y biomasa, era necesario evaluar la capacidad reductora de las tres condiciones; el objetivo principal era trabajar con la biomasa, sin embargo la capacidad reductora era menor al igual que el sobrenadante, obteniendo mejores resultado con el cultivo completo; se deduce que este resultado es ocasionado por la sinergia del sobrenadante que proporciona el medio reductor con los metabolitos que las bacterias depositan en el medio de cultivo y al KNO_3 que estimula a la enzima *nitrate reductase* presente en las bacterias que forman la biomasa lo cual favorece la biosíntesis de AgNPs. Cabe destacar que el sobrenadante presenta una mejor opción para la biosíntesis de AgNPs ya que pueden manipularse factores como la temperatura y el pH, se realizó este ensayo solo con el cambio de temperatura a 60°C sin agitación y se obtuvo el pico característico de 420nm para las AgNPs, en un tiempo de 15 minutos.

Medio de cultivo: El mecanismo exacto que conduce a la formación de la reducción de iones de plata y la formación de nanopartículas no se entiende completamente. Sin embargo, se sabe que la tolerancia de las células bacterianas y la formación de NPs es dependiente de la composición del medio de crecimiento (Malik *et al.*, 2014). Para la biosíntesis AgNPs, se diseñó un medio de cultivo tomando en cuenta los siguientes antecedentes; Sezonov *et al.*, (2007), infirieron que si el crecimiento de *E. coli* podría ser limitado por un nutriente en el medio de cultivo, este podría ser la fuente de carbono, (Gurunathan *et al.*, 2009), refieren que posiblemente la reducción de los iones metálicos es facilitado por la reducción de azúcares, por lo que al agregar lactosa se cubren ambos aspectos. Gurunathan *et al.*, (2009) señalan que Herrero *et al.*, reportaron que el medio nitrato es utilizado para la síntesis de la enzima nitrato reductasa, sin embargo este medio de cultivo no es funcional para preservar la viabilidad de las células durante y posterior a la biosíntesis de AgNPs, por lo que de este medio de cultivo se tomó al KNO_3 , que actúa como un inductor para la síntesis de nitrato reductasa/nitritoreductasa. Adicionalmente, Herrero y Guerrero (1986), refieren que cuando se utiliza NO_3^- como única fuente de nitrógeno conduce a un aumento drástico en la velocidad de la nitrato reductasa. Finalmente, Garboza *et al.*, (2011), describen que el medio Luria-Bertani (LB), es uno de los más utilizados para el cultivo de *Escherichia coli* y de otras especies bacterianas, debido a que es rico en nutrientes, de fácil elaboración y permite el crecimiento de una gran variedad de cepas. Está constituido por tres componentes, de los cuales uno es mineral, el NaCl, y dos son orgánicos: la triptona (o peptona) y el extracto de levadura, (Garboza *et al.*, 2011), originalmente también contenía glucosa al 0.1% (Bertani, 1951). Con lo descrito

anteriormente, los componentes seleccionados para el medio de cultivo fueron: triptona 1%, lactosa 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5% y KNO₃ 0.1%.

Cepas: En la biosíntesis de AgNPs se observó que las cuatro cepas (EC-PC, Ec GFP, Ec-MC y Ec-TS) tenían la capacidad de reducir y favorecer la síntesis de AgNPs. Sin embargo, se excluyen las cepas Ec-PC y Ec-GFP por presentar un tiempo mayor de crecimiento. Ec-TS y Ec-MC presentan la coloración amarilla y un mejor espectro de absorción en espectrofotometría UV-vis con el medio de cultivo LBE, ya que presenta una mayor capacidad reductora para la formación de nanopartículas.

La caracterización se realizó por espectrofotometría UV-vis; se obtuvieron picos de absorción para las AgNPs de 260 a 280nm. El desplazamiento hipsocrómico de estos espectros de absorción podrían atribuirse a varios factores, entre ellos: i) los picos 260-280 nm se puede atribuir a los residuos de triptófano y tirosina presente en las proteínas (Saifuddin *et al.*, 2009; Rupiasih *et al.*, 2013; Mishra *et al.*, 2012); ii) presencia de otros compuestos -OH y/o -C=O en los biocomponentes del medio de cultivo/extracto (Amaladash *et al.*, 2012); iii) bajo rendimiento en la síntesis de AgNPs (Sifontes *et al.*, 2010); iv) el tamaño y forma de AgNPs (Noguez, 2007; Cruz *et al.*, 2012; Vasireddy *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2010; Jasuja *et al.*, 2014). El pico obtenido en los espectros se atribuye al tamaño de AgNPs, la confirmación de la biosíntesis de AgNPs fue dada por el cambio de coloración del medio a amarillo, la presencia de Ag en los espectros de EDX, el tamaño y forma de las NPs observadas en las micrografías obtenidas por SEM. Sin embargo, para obtener una mayor reducción y un espectro de absorción en longitudes de onda mayores, se fortifica

al medio de cultivo, actualmente se obtienen picos de λ 310 a 380 nm; Lu *et al.*, (2006) refieren que una banda situada a 368 nm es probablemente debido a la existencia de pequeñas AgNPs esféricas, Salkar *et al.*, (1999), obtuvieron un pico de absorción de 370 nm de AgNPs por sonicación; Quang y Chau (2013), infirieron que un pico de absorción a 370 nm corresponde a la vibración transversal de plasmón en las nanopartículas de plata sintetizadas por quitosano.

Se realizó SEM con algunas muestras, se reportan AgNPs de un tamaño de 48.6 nm, lo cual es muy aproximado a lo reportado por Nath *et al.*, (2013) el cual es de 50 nm en *E. coli*, anteriormente Klaus *et al.*, (1999) refieren que en resultados anteriores de Slawson *et al.*, reportaron que la biosíntesis de AgNPs por *Pseudomonas stutzeri* AG259 (1992) son de un rango de 35 a 46 nm, Hemath *et al.*, 2010 reportaron que al utilizar *Penicillium* sp. se obtienen AgNPs con un rango de tamaño de 52-104nm, Bar *et al.*, (2009), obtuvieron AgNPs de un rango 15-50nm utilizando el extracto de *Jatropha curcas*, Muhsin y Hachim (2014) sintetizaron AgNPs con el hongo *Curvularia tuberculata* de tamaño de 10 a 50nm.

En el espectro EDX se detectó un pico de absorción de 3 keV, el cual es característico y reportado para la presencia de Ag (Ganesan *et al.*, 2013, Arunachalam *et al.*, 2012), el cual aumenta de acuerdo a la concentración que fue agregada a la muestra.

Dentro de la metodología para determinar los factores que favorecen la actividad del termosensor y la expresión de la proteína mcherry, se decidió añadir arabinosa 0.02% ya que favorece la expresión de *mcherry* (Hebisch *et al.*, 2013). Se

incrementa la agitación ya que la presencia o ausencia de oxígeno molecular afecta a la maduración de las proteínas fluorescentes en los organismos vivos (Shaner *et al.*, 2005; Verkhusha *et al.*, 2004; Gross *et al.*, 2000), en fluoroproteínas de *Discosoma sp* rojas (DsR) maduran en dos pasos subsecuentes de oxidación (Verkhusha *et al.*, 2004; Gross *et al.*, 2000; Shu *et al.*, 2006). Se puede observar en la figura 5.9, que se obtuvo un mayor crecimiento a 30°C; sin embargo la expresión de la proteína *mcherry* es mayor a 37°C debido a que el cromóforo de DsR madura eficientemente a esta temperatura (Miyawaki *et al.*, 2003), como puede observarse en la figura 5.10; el espectro de emisión de fluorescencia (gráfica 5.9) también muestra la presencia de esta proteína y muestra una emisión de acuerdo a lo reportado en la literatura λ_{\max} 620nm (Shu *et al.*, 2006).

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

Se realizaron satisfactoriamente las transformaciones de *Escherichia coli* k12DH5 α para la expresión de la proteína quelante y *Escherichia coli Top 10* para la expresión del termosensor de acuerdo con los reportes de secuenciación y los resultados obtenidos.

En la biosíntesis de AgNPs se observó que las cuatro cepas (Ec-PC, Ec-GFP, Ec-MC y Ec-TS) tenían la capacidad de reducir y favorecer la síntesis de AgNPs, el sobrenadante representa el mejor medio reductor ya que este puede ser manipulado con factores como temperatura y pH, se obtienen buenos resultados con la cepa *Ec-PC* en medio de cultivo completo, las concentraciones de AgNO₃ con mejores resultados fueron 1mM y 10mM, se detectó Ag⁰ por medio de espectros EDX y la presencias AgNPs de un tamaño de 48.6nm por medio SEM, con espectros de absorción Uv-Vis de 260 a 280nm. Las cepas Ec-PC y Ec-GFP se excluyen por presentar un tiempo mayor de crecimiento.

Las condiciones que favorecieron la biosíntesis de AgNPs y viabilidad en las cepas Ec-TS y Ec-MC fueron: fase *log*, cultivo completo, medio de cultivo enriquecido, en cuanto a las concentraciones de AgNO₃ se obtienen un buen crecimiento hasta 240 μ M de esta sal. Se obtuvieron espectros de absorción en Uv-

vis de 330 a 390nm, por lo estrecho del rango podría determinarse AgNPs homogéneas.

La oxigenación y la presencia de arabinosa en el medio de cultivo favorecen la expresión macroscópica de la proteína mcherry, respondiendo a estos factores a la temperatura deseada la cual es a 37°C.

Escherichia coli Top 10 recombinante (Ec-TS) presenta la capacidad de regulación de la expresión genética, tanto para la biosíntesis de nanopartículas; así como la respuesta a estímulos de temperatura por lo que representen un precedente para el diseño de nuevos agentes terapéuticos.

Perspectivas a futuro

El sobrenadante de las cuatro cepas utilizadas de *Escherichia coli* representan un buen medio para la síntesis verde de AgNPs, variando factores como pH, la presencia de un estabilizante y temperatura, en poco tiempo (\approx 2hr)

Desarrollar la metodología para la manipulación de la expresión del termosensor con apoyo de la proteína reportera *mcherry* a estímulos externos con luz.

Bibliografía

Abou El-Nour K.M.M., Eftaiha A., Al-Warthan A., Ammar R.A.A., (2010), 'Synthesis and applications of silver nanoparticles', *Arabian Journal of Chemistry*, 3, 135–140

Aguilar-Salvador D, Angeles-Santander I, Trujillo-Roldán MA, Valdez-Cruz NA, (2012), 'Biología Sintética: Diseñando Sistemas Biológicos con Piezas Genéticas', *Biotecnología*, 16(1)11-20

Alomar, M.J., (2013), 'Factors affecting the development of adverse drug reaction', *Saudi pharmaceutical journal*, 1-12.

Amaladhas T.P., Sivagami S., Devi T.A., Ananthi N., Velammal P., (2012), 'Biogenic synthesis of silver nanoparticles by leaf extract of *Cassia angustifolia*', *Advances in natural sciences: nanoscience and nanotechnology*, 3:1-7

Arunachalama R., Dhanasingha S., Kalimuthua B., Uthirappana M., Rosea C., Asit Baran Mandal a.B., (2012), 'Phytosynthesis of silver nanoparticles using *Coccinia grandis* leaf extract and its application in the photocatalytic degradation', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 94:226–230

Baharara J., Namvar F., Ramezani T., Hosseini N., Mohamad R., (2014), 'Green Synthesis of Silver Nanoparticles using *Achillea biebersteinii* Flower Extract and Its Anti-Angiogenic Propertie in the Rat Aortic Ring Model', *Molecules*, 19:4624-4634

Baker A.S. and Deiters A., (2014), 'Optical Control of Protein Function through Unnatural Amino Acid Mutagenesis and Other Optogenetic Approaches', *American Chemical Society*, 9:1398–1407

Bar H., Bhui D.K., Sahoo G.P., Sarkar P., De S.P., Misra A., (2009). 'Green synthesis of silver nanoparticles using latex of *Jatropha curcas*', *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 339(1):134–139

Bawarski W.E, Chidlowsky E., Bharali D.J., Mousa S.A., (2008), 'Emerging nanopharmaceuticals', *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 4:273–282

Benner SA and Sismour AM, (2005), 'Synthetic biology', *Nature*, 6:533-543

Bertani G., (1951), 'Studies on lysogenesis i. The mode of phage liberation by lysogenic escherichia coli', *Journal Bacteriology*. 62:292-300

Bhattacharyya A., Bhaumik A., Rani P.u., Mandal S., Epiidi T.T., (2010), 'Nanoparticles - A recent approach to insect pest control', *African Journal of Biotechnology*, 9(24):3489-3493

Bregadze V.G., Melikishvili Z.G., Giorgadze T.G., (2013), 'Photo-induced DNA-dependent conformational changes in silver nanoparticles' *Advances in Nanoparticles*, 2:176-181

Cameron D.E., Bashor C.J., Collins J.J., (2014), 'A brief history of synthetic biology', *Nature Reviews/Microbiology*, 12:381-390

Chan L.W., Wang X., Wei H., Pozzo L.D., White N.J., Pun S.H., (2015), 'A synthetic fibrin cross-linking polymer for modulating clot properties and inducing hemostasis', *Bioengineering*, 27:1-12

Chen P.C., Mwakwari S.C, Oyelere A.K, (2008), Gold nanoparticles: from nanomedicine to nanosensing, *Nanotechnology, Science and Applications*, 1:45-66

Cheung C., Lee J., Lee J., Shevchuk O., (2009), 'The Effect of Ionic (NaCl) and Non-ionic (Sucrose) Osmotic Stress on the Expression of β -galactosidase in Wild Type *E.coli* BW25993 and in the Isogenic BW25993 Δ lacl Mutant', *Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)*, 13:1-6

Cho I., Blaser M.J., (2012), 'The human microbiome: at the interface of health and disease', *Nature Review Genetic*, 13:260-270

Chou D.H-C., Webber M.J., Tang B.C., Lin A.B., Thapa L.S., Deng D., Truong J.V., Cortina A.B., Langer R., Anderson D.G., (2014), 'Glucose-responsive insulin activity by covalent modification with aliphatic phenylboronic acid conjugates', *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 1-6

Chowdhury S., Regaz C., Kreuger, Narberhaus F., (2003), 'Temperature-controlled Structural Alterations of an RNA Thermometer', *The Journal Of Biological Chemistry*, 278:48:47915–47921

Chowdhury S, Maris C, Allain F, Narberhaus F, (2006), 'Molecular basis for temperature sensing by an RNA thermometer', *European Molecular Biology Organization*, 25:2487–2497

Chung H.J., Bang W., Drake M.A., (2006), 'Stress Response of *Escherichia coli*', *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*, 5:52-64

Cruz D.A., Rodríguez M.C., López J.M., Herrera V.M., Orive A.G., Creus A.H., (2012), 'Metallic nanoparticles and surface plasmons: a deep relationship', *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 3(2):67-78

De M., Ghosh P.S, Rotello V.M., (2008), 'Applications of Nanoparticles in Biology', *Advanced Material*, 20:4225–4241

Deisseroth K., (2011), 'Optogenetics', *Nature Methods*, 8(1):26-29

Dimitrijevića R., Cvetkovićb O., Miodragović Z., Simićd M., Manojlović D., Jović V., (2013), 'SEM/EDX and XRD characterization of silver nanocrystalline thin film prepared from organometallic solution precursor', *Journal of Mining and Metallurgy, Section B: Metallurgy*, 49(1):91 – 95

Devoy A., Bunton-Stasyshyn R.K.A., Tybulewicz V.L.J., Smith A.J.H., Fisher E.M.C., (2011), 'Genomically humanized mice: technologies and promises', *Nature Review Genetic*, 13:14-20

Dubey, S.P., Lahtinen M., Sillanpää M., (2010), 'Green synthesis and characterizations of silver and gold nanoparticles using leaf extract of *Rosa rugosa*', *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 364:34–41

Durán N., Marcato P.D., Oswaldo L Alves O.L., De Souza G.IH., Esposito E., (2005), 'Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains', *Journal of Nanobiotechnology*, 3(8):1-7

Durán N, Marato P.D, Durán M, Yadav A, Gade A, Rai M (2011), 'Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi and plants', *Applications Biotechnology*, 90:1609-1624

Edwards I.R and Aronson J.K. (2000), 'Adverse drug reactions: definitions, diagnosis, and management', *The Lancet*, 356:1255-1259

Fan J-Y., Cui Z-Q., Wei H-P., Zhang Z-P., Zhou Y-F., Wang Y-P., Zhang X-E., (2008), 'Split mCherry as a new red bimolecular fluorescence complementation system for visualizing protein–protein interactions in living cells', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 367: 47–53

Garboza F., Frontado R., Noguera N., Ávila H., Ojeda L., Ramírez N, Triana J., Triana F., (2011), 'Uso de medios alternativos a base de hidrolizado de caseína y extracto de *Aspergillus niger* su efecto sobre la expresión genética de una cepa de *Escherichia coli*', *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 31(2):138-143

Ganesan V., Astalakshmi A., Nima P., Arunkumar C., (2013), 'Synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Merremia tridentata* Hall. f.', *Current Science Journal*, 6:87-93

Gavade N.L., Kadam A.N., Suwarnkar M.B, Ghodake V.P., Garadkar K.M., (2015), 'Biogenic synthesis of multi-applicative silver nanoparticles by using *Ziziphus Jujuba* leaf extract', *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 136:953–960

Gill S.R., Pop M., DeBoy R.T., Eckburg P.B., Turnbaugh P.J., Samuel B.S., Gordon J.I., Relman D.A., Fraser-Liggett C.M., Nelson K.E., (2011), 'Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome', *Science*, 2; 312(5778): 1355–1359

Goldberg M., Langer R., Jia X., (2007), 'Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering', *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 18(3): 241–268.

Govorov A.O., Richardson H.H., (2007), 'Generating heat with metal nanoparticles', *Nanotoday*, 2(1): 30–38

Gross L.A., Baird G.S., Hoffman R.C., Baldrige K.K., Tsien R.Y., (2000), 'The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(22): 11990–11995

Guranathan S., Kalishwaralal K., Vaidyanathan R., Venkataraman D., kumar Padian S.R., Muniyandi J., Hariharan N., Hyun Eom S., (2009), 'Biosynthesis, purification and characterization of silver nanoparticles using *Escherichia coli*', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 74:328–335

Harekrishna Bar H., Bhui D.Kr., Sahoo G.P., Sarkar P., Sankar P.D., Misra A., (2009), 'Green synthesis of silver nanoparticles using latex of *Jatropha curcas*', *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 339:134–139

He S., Guo Z., Zhang Y., Zhang S., Wang J., Gu N., (2007). 'Biosynthesis of gold nanoparticles using bacteria *Rhodopseudomonas capsulata*'. *Materials Letters*, 61:3984–3987

Hebisch E, Knebel J, Landsberg J, Frey E, Leisner M, (2013), 'High Variation of Fluorescence Protein Maturation Times in Closely Related *Escherichia coli* Strains', *PLOS ONE* 8(10)1-9

Hemath Naveen K.S., Gaurav Kumar, Karthik L., Bhaskara Rao K.V. (2010), 'Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the filamentous fungus *Penicillium sp.*', *Archives of Applied Science Research*, 2(6): 161-167

Hooper L.V., Littman D.R., Macpherson A.J., (2012), 'Interactions Between the Microbiota and the Immune System', *Science*, 336: 1268- 1273

Huang T., and X-HN. Xu., (2010), 'Synthesis and characterization of tunable rainbow colored colloidal silver nanoparticles using single-nanoparticle plasmonic microscopy and spectroscopy', *Journal of Materials Chemistry*, 20:9867–9876

Huh A.J., Kwon Y.J., (2011), "Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era', *Journal of Controlled Release* 156:128–145

Hulkoti NI, Taranath TC, (2014), 'Biosynthesis of nanoparticles using microbes— A review', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 121 (2014) 474–483

Iravani S, Korbekandi H., Mirmohammadi S.V., Zolfaghari B., (2014), 'Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods', *Research in Pharmaceutical Sciences*, December, 9(6): 385-406

Jasuja N.D., Gupta D.K., Reza M., Joshi S.C., (2014), 'Green Synthesis of AgNPs Stabilized with biowaste and their antimicrobial activities', *Brazilian. Journal Microbiology*, 45(4):1325-1332

Jeevan P., Ramya K., Rena E., (2011), 'Extracellular biosynthesis of silver by culture supernatant of *Pseudomonas aeruginosa*' *Indian Journal of Biotechnology*, 11:72-76

Jungmann,R., Renner, S., Friedrich C. Simmel, F., (2008), 'From DNA nanotechnology to synthetic biology', *HFSP Journal*, 2(2):99–109

Karcher D.J, Bock R., (2008), 'Design of simple synthetic RNA thermometers for temperature-controlled gene expression in *Escherichia coli*', *Nucleic Acids Research*, 36(19):1-9

Khalil AS and Collins JJ, (2010), 'Synthetic biology: applications come of age', *Nature*, 11:367-379

Kim, B.Y.S., Rutka, J.T., Chan, C.W.W., (2010), 'Current Concepts Nanomedicine', *The new England journal of medicine*, 363(25):2434-2443

Klar T., Perner M., GrosseS., Plessen G.V., Spirkl W., Feldmann J., (1998), 'Surface-Plasmon Resonances in Single Metallic Nanoparticles', *Physical Review Letters*, 80(19): 4249- 4252

Klaus-Joerger.T., Joerger, R., Olsson, E., Granqvist, C-G, (2001), 'Bacteria as workers in the living factory: metal-accumulating bacteria and their potential for materials science', *Trends in Biotechnology*, 19(1):15-20

Korbekandi H., Iravani S., Abbasi S., (2009), 'Production of nanoparticles using organisms', *Critical Reviews in Biotechnology*, 29(4): 279–306

Kortmann J, Narberhaus F, (2012), 'Bacterial RNA thermometers: molecular zippers and switches', *Nature*, 10:255-265

Lamprecht, B., Schider, G., Lechner, R.T., Ditzbacher, H., Krenn, J.R., A. Leitner, A., and Aussenegg, F.R., (2000), 'Metal Nanoparticle Gratings: Influence of Dipolar Particle Interaction on the Plasmon Resonance', *Physical review letters*, 84(20):4721-4724

Lazarou, J., Bruce, H., Corey, P.N., (1998), 'Adverse drug reactions in hospitalized patients. A meta-analysis of prospective studies', *Journal American Medical Association (JAMA)*, 279(15):1200-1205

Leela A., and Vivekanandan M., (2008), 'Tapping the unexploited plant resources for the synthesis of silver nanoparticles', *African Journal of Biotechnology*, 7 (17):3162-3165

Lemon K.P., Armitage G.C., Relman D.A., Fischbach M.A., (2012), 'Microbiota-Targeted Therapies: An Ecological Perspective', *Science Translational Medicine*, 4(137):1-8

Li G., He D., Qian Y., Guan B., Gao S., Cui Y., Yokoyama K., Wang L., (2012), 'Fungus-Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Aspergillus terreus*', *InteRNAtional JouRNAl of Molecular Sciences*, 13:466-476

Li, X., Xu, H., Chen, Z-S., Guofang Chen, G., (2011), 'biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications', *Journal of Nanomaterials*, 1:1-16

Liu W.T., (2006), 'Nanoparticles and Their Biological and Environmental Applications', *Journal Of Bioscience And Bioengineering*, 102(1):1–7

Liu Y., Miyoshi H., Nakamura M., (2007), 'Nanomedicine for drug delivery and imaging: A promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles', *InteRNAtional Journal Cancer*, 120, 2527–2537

Logeswari P, Silambarasan S, Abraham J., (2012), 'Synthesis of silver nanoparticles using plants extract and analysis of their antimicrobial property', *Journal of Saudi Chemical Society*, 1-7

Lu L., Kobayashi A., Tawa K., Ozaki Y., (2006), 'Silver Nanoplates with Special Shapes: Controlled Synthesis and Their Surface Plasmon Resonance and Surface-Enhanced Raman Scattering Properties', *Chemical. Material*, 18:4894-4901

Malik P., Shankar R., Malik V., Sharma N., Mukherjee T.K., (2014), 'Green Chemistry Based Benign Routes for Nanoparticle Synthesis', *Journal of Nanoparticles*, 1-14

Mathur A., Kushwaha A., Dalakoti V., Dalakoti G., Shikha DS., (2014), 'Green synthesis of silver nanoparticles using medicinal plant and its characterization', *Der Pharmacia Sinica*, 5(5):118-122

Merlos M.A., Michálek P., Kryštofová O., Zítka O., Adam V., Kizek R., (2014), 'The role of phytochelatins in plant and animals: A review', *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*, 4, 22—27

Miranda-Ríos J, (2006), 'El gran mundo de los RNAs pequeños', *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48 (2):73-78

Mishra A., Mehdi S.J., Irshad Md., Ali A., Sardar M., Rizvi M.M. A., (2013). 'Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on human cancer cells'. *Science of Advanced Materials*, 4:1–7

Miyawaki A., Nagai T., Mizuno H., (2003), 'Mechanisms of protein fluorophore formation and engineering', *Current Opinion in Chemical Biology*, 7:557–562

Moghimi S.M., Hunter A.C., Murray J.C., (2005), 'Nanomedicine: current status and future prospects', *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology (The FASEB Journal)*, 19:311-330

Mohandass, C., Vijayaraj, A.S., Rajasabapathy, R., Satheeshbabu, S., Rao, S.V., Shiva, C., De-Mello, I., (2013), 'Biosynthesis of Silver Nanoparticles from Marine Seaweed *Sargassum cinereum* and their Antibacterial Activity', *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(5):606–610.

Mohanpuria, P., Rana, N.K., Yadav, S.K., (2008), Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications ", *Journal Nanoparticles Research*, 10:507–517

Morones-Ramírez, J.R., (2013), 'Bioinspired synthesis of optically and thermally responsive nanoporous membranes', *NPG Asia Materials*, 5(23):1-9

Morones, J.R., Wolfgang Frey, W., (2010), 'Room temperature synthesis of an optically and thermally responsive hybrid PNIPAM–gold nanoparticle', *Journal Nanoparticles Reserarch*, 12:1401–1414

Mulfinger L., Solomon S.D., Bahadory M., Jeyarajasingam A.V., Rutkowsky S.A., Boritz C., (2007), 'Synthesis and Study of Silver Nanoparticles', *Journal of Chemical Education*, 84(2):322-325

Müller-Taubenberger A y Anderson K.I., (2007), 'Recent advances using green and red fluorescent protein variants', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77:1–12

Muhsin T.M., Hachim A.K., (2014), 'Characterization and antibacterial efficacy of silver nanoparticles biosynthesized by the soil fungus *Curvularia tuberculata*', *NanoScience Tech Open Library*, 1(1): 5-11.

Nandagopal N and Elowitz MB, (2011), 'Synthetic Biology: Integrated Gene Circuits', *Science*, 333:1244-1248

Narayanan, K.B., Sakthivel, N., (2010), 'Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes', *Advances in Colloid and Interface Science*, 1-13

Nath D, Banerjee P (2013), 'Green nanotechnology – A new hope for medical biology', *Environmental toxicology and pharmacology*, 36:997–1014

Narberhaus, F., Waldminghaus, T., Chowdhury, S., (2005), 'RNA thermometers', *Federation of European Microbiological Societies*, 30:3–16

Navarro-Aviñó J.P., Aguilar-Alonso I., López-Moya J.R., (2007), 'Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas', *Ecosistemas*, 16(2):10-25

Neupert J., Karcher, D., Bock, R., (2008), 'Design of simple synthetic RNA thermometers for temperature-controlled gene expression in *Escherichia coli*', *Nucleic Acids Research*, 36(19)1-9

Nikapitiya, Ch., (2012), 'Bioactive secondary metabolites from marine microbes for drug discovery', *Advances in Food and Nutrition Research*, 65:363-387

Noguez C., (2007), 'Surface plasmons on metal nanoparticles: the influence of shape and physical environment', *Journal Physical. Chemistry*, 111(10):3806-3819

Nossal N.G. y Heppel L.A., (1966), 'The release of enzymes by osmotic shock from *Escherichia coli* in exponential phase', *The Journal Of Biological Chemistry* 241(13):3055-3062

Oropesa-Nuñez R., y Jáuregui-Haza U.J., (2012), 'Las nanopartículas como portadores de fármacos: características y perspectivas', *Revista Centro Nacional de Investigaciones Científicas Cuba (CENIC) Ciencias Biológicas*, 43:1-20

Pagán R., Mackey B., (2000), 'Relationship between Membrane Damage and Cell Death in Pressure-Treated *Escherichia coli* Cells: Differences between Exponential- and Stationary-Phase Cells and Variation among Strains', *Applied And Environmental Microbiology*, 66(7): 2829–2834

Pan D., Lanzaa G.M., Wicklinea S.A, Caruthers S.D., (2009), 'Nanomedicine: Perspective and promises with ligand-directed molecular imaging', *European Journal of Radiology* 70:274–285

Park T.J., Lee,S.Y., Heo, N.S., Seo, T.S., (2010), 'In vivo synthesis of diverse metal nanoparticles by recombinant *Escherichia coli*', *Angewandte Chemie International Edition*, 49:7019 –7024

Pavani K.V.,Gayathamma K., Banerjee A. , SureshS., (2013), 'Phyto-synthesis of Silver Nanoparticles Using Extracts of *Ipomoea indica* Flowers', *American Journal of Nanomaterials*, 1(1): 5-8

Peloquin J.M., Nguyen D.D., (2013), 'The Microbiota and Inflammatory Bowel Disease: Insights', *Anaerobe*, 24:102–106

Phillips K.A., L. Veenstra D.L., Oren E., Lee J.K., Sadee W., (2001), 'Potential role of pharmacogenomics in reducing Adverse Drug Reaction', *The Journal of the American Medical Association*, 286 (18): 2270-227

Praetorius N.P., and Mandal T.K., (2007), 'Engineered Nanoparticles in Cancer Therapy', *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, Bentham Science Publishers Ltd. 1: 37-51

Quang D.V y Chau N.H., (2013), 'The Effect of Hydrothermal Treatment on Silver Nanoparticles Stabilized by Chitosan and Its Possible Application to Produce Mesoporous Silver Powder', *Journal of Powder Technology*, 1-6

RajendranS., Sribarathy V., Nithya devi P., Thangakani J.A., KennedyZ.R., Banu N.N., Satyabama P., Brindha G., (2012), 'Nanoparticles dispersed in water based nanofluids', *Elixir Nanotechnology* 50:10552-10555

Ramírez J., Contreras G., Gómez M.C., (2005), 'La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*', *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47 (3-4): 92-101

Rodríguez-León E., Iñiguez-Palomares R, Navarro R.E., Herrera-Urbina R., Tánori J., Iñiguez-Palomares C., Maldonado A., (2013) 'Synthesis of silver nanoparticles using reducing agents obtained from natural sources (Rumex hymenosepalus extracts)', *Nanoscale Research Letters*, 8(318):1-9

Rolfe M.D., Rice C.J., Lucchini S., Pin C., Thompson A., Cameron A.D.S., Alston M., Stringer M.F., Betts R.P., Baranyi J., Peck M.W., Hinton J.C.D., (2011), 'Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation', *Journal of Bacteriology*, 686–701

Rupiasih N.N., Aher A., Gosavi S., Vidyasagar P.B., (2013), 'Green synthesis of silver nanoparticles using latex extract of *Thevetia peruviana*: a novel approach towards poisonous plant utilization', *Journal of Physics: Conference*, 423:1-8

Safekordi A.A., Attar H., Ghorbani H.R., (2011), 'Optimization of Silver Nanoparticles Production by *E.coli* and the study of reaction kinetics', *International Conference on Chemical, Ecology and Environmental Sciences*, 346-350

Saifuddin N., Wong C.W., Yasumira A.A.N., (2009), 'Rapid biosynthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of bacteria with microwave irradiation', *E-Journal of Chemistry*, 6(1):61-70

Salkar R.A., Jeevanandam P., Aruna T.T., Kolytyn Y., Gedanken A., (1999), 'The sonochemical preparation of amorphous silver nanoparticles', *Journal Material Chemistry*, 9:1333–1335

Sathishkumar, M., Sneha, K., Won, S.W., Cho, C-W., Kim, S., Yun, Y-S., (2009), 'Cinnamon zeylanicum bark extract and powder mediated green synthesis of nano-crystalline silver particles and its bactericidal activity', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 73:332–338

Sezonov G., Joseleau-Petit D., D'Ari R., (2007), '*Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth', *Journal of Bacteriology*, 189(23):8746–8749

Schröfel A, Kratošová G, Šafarik I, Šafaříková M, Raška I, Šor. L.M., (2014), Applications of biosynthesized metallic nanoparticles – A review, *Acta Biomaterialia* 1-20

Schmidt C.W., (2010), 'La biología sintética Las implicaciones de un nuevo campo para la salud ambiental', *Salud Pública de México*, 52:277-283

Shaner N.C., Campbell R.E., Steinbach P.A., Giepsman BNG., Palmer A.E., Tsien R.Y., (2004), 'Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma sp* red fluorescent protein', *Nature Biotechnology*, 22(12):1567-1572

Shaner N.C., Steinbach P.A., Tsien R.Y., (2005), 'A guide to choosing fluorescent proteins', *Nature Methods*, 2 (12):905-909

Shu X., Shaner N.C., Yarbrough C.A., Tsien R.Y., James Remington S.J., (2006), 'Novel Chromophores and Buried Charges Control Color in mFruits'. *Biochemistry American Chemical Society*, 45(32):9639-9647

Sifontes A.B., Melo L., Maza C., Mendes J.J., Mediavilla M., (2010), 'Preparación de nanopartículas de plata en ausencia de polímeros estabilizantes', *Química Nova*, 33(6):1266-1269

Solomon S.D., Bahadory M., Jeyarajasingam A.V., Rutkowsky S.A., Boritz Ch., (2007), 'Synthesis and Study of Silver Nanoparticles', *Journal of Chemical Education*, 84(2)322-325

Sudarsan, N., Barrick, J.E., Breaker, R.R., (2003), 'Metabolite-binding RNA domains are present in the genes of eukaryotes', *RNA Publication of the RNA society*, 9: 644-647

Sujatha S., Tamilselvi S., Subha K., Panneerselvam A., (2013), 'Studies on biosynthesis of silver nanoparticles using mushroom and its antibacterial activities', *InterNational JouRNAI of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2(12): 605-614

Thakkar, K.N., Mhatre, S.S., Parikh, R.Y., (2009), 'Biological synthesis of metallic nanoparticles', *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*, 1:1

Umoren S.A., Obot I.B., Gasem Z.M., (2014), 'Green Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Using Red Apple (*Malus domestica*) Fruit Extract at Room Temperature', *Journal of Materials and Environmental Science*, 5(3):907-914

Vasireddy R., Paul R., Mitra A.K., (2012), 'Green Synthesis of Silver Nanoparticles and the Study of Optical Properties'. *Nanomaterials and Nanotechnology*, 2(8):1-6

Verkhusha V.V., Chudakov D.M., Gurskaya N.G., Lukyanov S., Lukyanov K.A., (2004), 'Common Pathway for the Red Chromophore Formation in Fluorescent Proteins and Chromoproteins', *Chemistry y Biology*, 11:845–854

Wang C., Marta Luconi M., Masi A., FeRNandez L., (2010). 'Silver Nanoparticles as Optical Sensors, Silver Nanoparticles', David Pozo Perez (Ed.), ISBN: 978-953-307-028-5, *InTech* 12: 225-256 [online, enero 2015]

Wei X., Luo M., Wei Li., Yang L., Liang X., Xu L., Kong P., Liu H., (2012), 'Synthesis of silver nanoparticles by solar irradiation of cell-free *Bacillus amyloliquefaciens* extracts and AgNO₃', *Bioresource Technology* 103:273–278

Wexler H. M., (2007), 'Bacteroides: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty', *Clinical Microbiology Reviews*, 4(20):593–621

APÉNDICE I

Reportes de secuenciación de bacterias recombinantes.

Escherichia coli k12DH5α (Ec-PC)

Secuenciación detallada del plásmido con la secuencia sintética de proteína punto 5.1.1

Total 2847pb

Ligación: pUC57 [2631 nt] : (HindIII[471] / EcoRI[396])

pCons_PC_T7ter [208 nt] : (EcoRI[1] / HindII [213])

ORIGIN

1 TCGCGCGTTT CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT
GCAGCTCCCG GAGACGGTCA

61 CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG
TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG

121 TTGGCGGGTG TCGGGGCTGG CTTAACTATG CGGCATCAGA
GCAGATTGTA CTGAGAGTGC

181 ACCATATGCG GTGTGAAATA CCGCACAGAT GCGTAAGGAG
AAAATACCGC ATCAGGCGCC

241 ATTCGCCATT CAGGCTGCGC AACTGTTGGG AAGGGCGATC
GGTGCGGGCC TCTTCGCTAT

301 TACGCCAGCT GGCGAAAGGG GGATGTGCTG CAAGGCGATT
AAGTTGGGTA ACGCCAGGGT

361 TTTCCAGTC ACGACGTTGT AAAACGACGG CCAGT Gaatt
CGCGGCCGCT TCTAGAGttg

421 acagctagct cagtcctagg tataatgcta gcAAAAAAT AAGGAGGTAA
ACCATGGAAT

481 GTGAATGTGA AGAATGTGAA TGTGAATGTG AATGTGAATG
TGAATGTGAA TGTGAATGTT

541 AATACTAGTA GCGGCCGCTG CAGCATAACC CCTTGGGGCC
TCTAAACGGG TCTTGAGGGG

601 TTTTTTGAag ctTGGCGTAA TCATGGTCAT AGCTGTTTCC
TGTGTGAAAT TGTTATCCGC

661 TCACAATTCC ACACAACATA CGAGCCGGAA GCATAAAGTG
TAAAGCCTGG GGTGCCTAAT

721 GAGTGAGCTA ACTCACATTA ATTGCGTTGC GCTCACTGCC
CGCTTTCCAG TCGGGAAACC

781 TGTCGTGCCA GCTGCATTAA TGAATCGGCC AACGCGCGGG
GAGAGGCGGT TTGCGTATTG

841 GGCGCTCTTC CGCTTCCTCG CTCACTGACT CGCTGCGCTC
GGTCGTTCCG CTGCGGCGAG

901 CGGTATCAGC TCACTCAAAG GCGGTAATAC GGTTATCCAC
AGAATCAGGG GATAACGCAG

961 GAAAGAACAT GTGAGCAAAA GGCCAGCAAA AGGCCAGGAA
CCGTAAAAG GCCGCGTTGC

1021 TGGCGTTTTT CCATAGGCTC CGCCCCCTG ACGAGCATCA
CAAAAATCGA CGCTCAAGTC

1081 AGAGGTGGCG AAACCCGACA GGA CTATAAA GATACCAGGC
GTTTCCCCT GGAAGCTCCC

1141 TCGTGCGCTC TCCTGTTCCG ACCCTGCCGC TTACCGGATA
CCTGTCCGCC TTTCTCCCTT

1201 CGGGAAGCGT GGCGCTTTCT CATAGCTCAC GCTGTAGGTA
TCTCAGTTCG GTGTAGGTCG

1261 TTCGCTCCAA GCTGGGCTGT GTGCACGAAC CCCCCGTTCA
GCCCGACCGC TGC GCCTTAT

1321 CCGGTA ACTA TCGTCTTGAG TCCAACCCGG TAAGACACGA
CTTATCGCCA CTGGCAGCAG

1381 CCACTGGTAA CAGGATTAGC AGAGCGAGGT ATGTAGGCGG
TGCTACAGAG TTCTTGAAGT

1441 GGTGGCCTAA CTACGGCTAC ACTAGAAGAA CAGTATTTGG
TATCTGCGCT CTGCTGAAGC

1501 CAGTTACCTT CGGAAAAGA GTTGGTAGCT CTTGATCCGG
CAAACAAACC ACCGCTGGTA

1561 GCGGTGGTTT TTTTGTTCG AAGCAGCAGA TTACGCGCAG
AAAAAAGGA TCTCAAGAAG

1621 ATCCTTTGAT CTTTTCTACG GGGTCTGACG CTCAGTGGAA
CGAAA ACTCA CGTTAAGGGA

1681 TTTTGGTCAT GAGATTATCA AAAAGGATCT TCACCTAGAT
CCTTTTAAAT TAAAAATGAA

1741 GTTTTAAATC AATCTAAAGT ATATATGAGT AACTTGGTC
TGACAGTTAC CAATGCTTAA

1801 TCAGTGAGGC ACCTATCTCA GCGATCTGTC TATTTGTTT
ATCCATAGTT GCCTGACTCC

1861 CCGTCGTGTA GATAACTACG ATACGGGAGG GCTTACCATC
TGGCCCCAGT GCTGCAATGA

1921 TACCGCGAGA CCCACGCTCA CCGGCTCCAG ATTTATCAGC
ATAAACCAG CCAGCCGGAA

1981 GGGCCGAGCG CAGAAGTGGT CCTGCAACTT TATCCGCCTC
CATCCAGTCT ATTAATTGTT

2041 GCCGGGAAGC TAGAGTAAGT AGTTCGCCAG TTAATAGTTT
GCGCAACGTT GTTGCCATTG

2101 CTACAGGCAT CGTGGTGTCA CGCTCGTCGT TTGGTATGGC
TTCATTCAGC TCCGGTTCCC

2161 AACGATCAAG GCGAGTTACA TGATCCCCCA TGTTGTGCAA
AAAAGCGGTT AGCTCCTTCG

2221 GTCCTCCGAT CGTTGTCAGA AGTAAGTTGG CCGCAGTGTT
ATCACTCATG GTTATGGCAG

2281 CACTGCATAA TTCTCTTACT GTCATGCCAT CCGTAAGATG
CTTTTCTGTG ACTGGTGAGT

2341 ACTCAACCAA GTCATTCTGA GAATAGTGTA TGCGGCGACC
GAGTTGCTCT TGCCCGGCGT

2401 CAATACGGGA TAATACCGCG CCACATAGCA GAACTTTAAA
AGTGCTCATC ATTGGAAAAC

2461 GTTCTTCGGG GCGAAAACCTC TCAAGGATCT TACCGCTGTT
GAGATCCAGT TCGATGTAAC

2521 CCACTCGTGC ACCCAACTGA TCTTCAGCAT CTTTTACTTT
CACCAGCGTT TCTGGGTGAG

2581 CAAAAACAGG AAGGCAAAT GCCGCAAAA AGGGAATAAG
GGCGACACGG AAATGTTGAA

2641 TACTCATACT CTTCTTTTT CAATATTATT GAAGCATTTA
TCAGGGTTAT TGTCTCATGA

2701 GCGGATACAT ATTTGAATGT ATTTAGAAAA ATAAACAAAT
AGGGGTTCCG CGCACATTTT

2761 CCCGAAAAGT GCCACCTGAC GTCTAAGAAA CCATTATTAT
CATGACATTA ACCTATAAAA

2821 ATAGGCGTAT CACGAGGCC TTTTCGTC

***Escherichia coli* Top 10**

Secuenciación completa del plásmido Ec-TS mencionada en el punto 5.1.2

pUC57Kan_pCons_U6_mCherry_bb 3404 bp

Ligación: pUC75-Kan [2500 nt] : (HindIII[471] / EcoRI[396]) to
Genscript_pCons_U6_mCherry_bb [896 nt] : (EcoRI[1] / HindIII[901])

Genscript_pCons_U6_mCherry_bb [896 nt] : (EcoRI[1] / HindIII[901])
ORIGIN

```
1 tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca
61 cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg
121 ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc
181 accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcagggcgc
241 attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggccc tcttcgctat
301 tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caagggcgatt aagtgggta acgccagggt
361 ttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt CGCGGCCGCT
TCTAGAGttg
421 acagctagct cagtcctagg tataatgcta gcggatccTC TCCTTCaaaa
aaAAAAAAAAA
481 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAAG GAGATATACC CATGGTTAGC
AAAGGTGAAG AAGATAATAT
541 GGCAATTATT AAAGAATTTA TGCGTTTTAA AGTTCATATG
GAAGGTAGCG TTAATGGTCA
```

601 TGAATTTGAA ATTGAAGGTG AAGGTGAAGG TCGTCCGTAT
GAAGGTACCC AGACCGCAAA

661 ACTGAAAGTT ACCAAAGGTG GTCCGCTGCC GTTTGCATGG
GATATTCTGA GCCCGCAGTT

721 TATGTATGGT AGCAAAGCAT ATGTTAAACA TCCGGCAGAT
ATTCCGGATT ATCTGAAACT

781 GAGCTTTCCG GAAGGTTTTA AATGGGAACG TGTTATGAAT
TTTGAAGATG GTGGTGTGTG

841 TACCGTTACC CAGGATAGCA GCTTACAGGA TGGTGAATTT
ATTTATAAAG TTAAACTGCG

901 TGGTACCAAT TTTCCGAGCG ATGGTCCGGT TATGCAGAAA
AAAACAATGG GTTGGGAAGC

961 AAGCAGCGAA CGTATGTATC CGGAAGATGG TGC ACTGAAA
GGTGAAATTA AACAGCGTCT

1021 GAAACTGAAA GATGGTGGTC ATTATGATGC AGAAGTTAAA
ACCACCTATA AAGCAAAAAA

1081 ACCGGTTCAG CTGCCGGGTG CATATAATGT TAATATTTAA
CTGGATATTA CCAGCCATAA

1141 TGAAGATTAT ACCATTGTTG AACAGTATGA ACGTGCAGAA
GGTCGTCATA GCACCGGTGG

1201 TATGGATGAA CTGTATAAAC TGGTTGCATA AACTAGTAGC
GGCCGCTGCA GCATAACCCC

1261 TTGGGGCCTC TAAACGGGTC TTGAGGGGTT TTTTGAagct tggcgtaatc
atggtcatag

1321 ctgtttcctg tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac acaacatacg agccggaagc

1381 ataaagtga aagcctgggg tgccaatga gtgagctaac tcacattaat tgcgttgccg
1441 tcaactgccc cttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg aatcggccaa
1501 cgcgcgggga gaggcgggtt gcgtattggg cgctcttccg cttcctcgct cactgactcg
1561 ctgctgctcg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg
1621 ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaaagg ccagcaaaaag
1681 gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgttttcc ataggctccg cccccctgac
1741 gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga
1801 taccaggcgt tccccctgg aagctccctc gtgctctc ctgttccgac cctgccgtt
1861 accggatacc tgtccgcctt tctccctcg ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc
1921 ttaggtatc tcagttcggg ttaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaacc
1981 cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta
2041 agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggtat
2101 gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaagaaca
2161 gtatttgga tctgcgctc gctgaagcca gttacctcg gaaaaagagt tgtagctct
2221 tgatccggca aacaaccac cgctggtagc ggtggtttt ttgttgcaa gcagcagatt
2281 acgcgagaa aaaaaggatc tcaagaagat ctttgatct ttctacggg gtctgacgt
2341 cagtggaacg aaaactcacg ttaagggtt ttggtcatga gattatcaa aaggatctc
2401 acctagatc ttttaatta aaaatgaagt tttaatcaa gcccaatctg aataatgta

2461 caaccaatta accaattctg attagaaaaa ctcatcgagc atcaaatgaa actgcaattt
2521 attcatatca ggattatcaa taccatattt ttgaaaaagc cgtttctgta atgaaggaga
2581 aaactcaccg aggcagttcc ataggatggc aagatcctgg tatcggctcg cgattccgac
2641 tcgtccaaca tcaatacaac ctattaattt cccctcgtca aaaataaggt tatcaagtga
2701 gaaatcacca tgagtgacga ctgaatccgg tgagaatggc aaaagtttat gcatttcttt
2761 ccagacttgt tcaacaggcc agccattacg ctcgatca aaatcactcg catcaaccaa
2821 accgttattc attcgtgatt ggcctgagc gagacgaaat acgcatcgc tgtaaaagg
2881 acaattacaa acaggaatcg aatgcaaccg ggcgaggaac actgccagcg catcaacaat
2941 atttcacct gaatcaggat attcttctaa tacctggaat gctgttttc cgggatcgc
3001 agtggtgagt aaccatgcat catcaggagt acggataaaa tgcttgatgg tcggaagagg
3061 cataaattcc gtcagccagt ttagtctgac catctcatct gtaacatcat tggcaacgct
3121 accttgcca tgtttcagaa acaactctgg cgcacgggc ttccataca agcगतगत
3181 tctgcacct gattgcccga cattatcgcg agcccattta tacccatata aatcagcatc
3241 catgttgaa ttaatcgcg gctcgcagt ttccggtga atatggctca taacaccct
3301 tctattactg tttatgtaag cagacagttt tattgttcat gatgatata tttatcttg
3361 tgcaatgtaa catcagagat ttgagacac gggccagagc tgca

Tablas de resultados de viabilidad del punto 5.4

Se utilizó el método de gota en superficie, para obtener el número de UFC se calculó con la siguiente fórmula:

UFC/ml= promedio UFC muestra original (alícuota) x 50 x factor de dilución

Ec-MC

0 Ag			
tiempo	Prom 20µl UFC	prom x ml	log
0	104	52000000	12.8160041
2	113.3333333	56666666.7	12.8779985
4	123.3333333	61666666.7	12.9389938
6	250	125000000	13.4486764
15 µM Ag			
0	107.5	53750000	12.8398807
2	99	49500000	12.7804626
4	88.5	44250000	12.6995871
6	38	19000000	12.089748
30µM Ag			
0	101	50500000	12.79489
2	85.33333333	42666666.7	12.673303
4	54	27000000	12.343228
6	27.66666667	13833333.3	11.8608227
60 µM Ag			
0	93	46500000	12.7353637
2	77.33333333	38666666.7	12.6022935
4	39.33333333	19666666.7	12.1146246
6	22.33333333	11166666.7	11.7063476
120µM Ag			
0	87	43500000	12.687256
2	71	35500000	12.5406578
4	32	16000000	11.9657843
6	17	8500000	11.5095157
240µM Ag			
0	80	40000000	12.6267483
2	69	34500000	12.5200465
4	27	13500000	11.843228
6	15.33333333	7666666.67	11.435084

Ec-TS

0			
tiempo h	Prom	Prom ml	log
0	119.666667	59800000	12.9168211
2	124.666667	62333333.33	12.9467503
4	152.333333	76166666.67	13.0913282
6	250	125000000	13.4486764
15µM Ag			
0	99.666667	49833333.33	12.7853039
2	73.333333	36666666.67	12.5639829
4	33.666667	16833333.33	12.0024088
6	21.333333	10666666.67	11.673303
30µM Ag			
0	100	50000000	12.7877124
2	65.666667	32833333.33	12.4843289
4	36.666667	18333333.33	12.0639829
6	13.333333	6666666.67	11.3342671
60µM Ag			
0	92.666667	46333333.33	12.7327736
2	54.333333	27166666.67	12.3476671
4	25.666667	12833333.33	11.8066963
6	12.333333	6166666.67	11.2780297
120µM Ag			
0	91.666667	45833333.33	12.7249469
2	43.666667	21833333.33	12.1900145
4	22.333333	11166666.67	11.7063476
6	11.333333	5666666.67	11.2170345
240 µM Ag			
0	87	43500000	12.687256
2	37.666667	18833333.33	12.0833925
4	15.333333	7666666.67	11.435084
6	10.333333	5166666.67	11.1504012