

**Escuela Superior Politécnica del Litoral**

**Facultad de Ciencias de la Vida**

Diseño de un sistema biológico que detecte la presencia de microcistina en  
cuerpos de agua

VIDA-329

**Proyecto Integrador**

Previo la obtención del Título de:

**Biólogo**

Presentado por:

Andrés Reinoso Sánchez

Carlos Baquerizo Macancela

Guayaquil - Ecuador

Año: 2023

## Dedicatoria

---

El presente proyecto lo dedicamos a Dios y a la Santísima Virgen María por cuidarnos siempre durante el desarrollo de este proyecto, también a todas las personas que estuvieron con nosotros a lo largo de nuestra vida académica.

## Agradecimientos

---

Nuestro más sincero agradecimiento a nuestro docente tutor Ph.D Julio Bonilla por sus enseñanzas, guía y acompañamiento. A nuestra unidad educativa Escuela Superior Politécnica del Litoral por brindarnos las herramientas y el espacio adecuado para la elaboración de nuestro proyecto. Así mismo, a nuestra familia y amigos por ser nuestro apoyo emocional.

## Declaración Expresa

---

Andrés Alberto Reinoso Sánchez y Carlos Eric Baquerizo Macancela acordamos y reconocemos que:

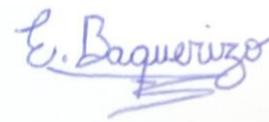
La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor o autores, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor o autores. La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por mí/nosotros durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que me/nos corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi/nuestra innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique a los autores que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 31 de enero del 2023.



Andrés Reinoso



Carlos Baquerizo

## Evaluadores



Firmado electrónicamente por:  
**JULIO ANDRES  
BONILLA JAIME**

---

**Diego Gallardo**

Profesor de Materia

---

**Julio Bonilla**

Tutor de proyecto

## Resumen

Las malas prácticas durante la actividad agrícola ocasionan que se acumule nutrientes en la superficie del agua, generando floraciones de algas nocivas causadas por cianobacterias. Esto afecta gravemente a la salud de las comunidades cercanas a cuerpos de agua dulce. Las cianobacterias que más producen floraciones de algas nocivas son las del género *Microcystis*, estas producen una hepatotoxina conocida como microcistina, las cuales son degradadas por la enzima microcistinasa (*mlr*). En base a esto, es posible diseñar un biosensor que detecte la presencia de microcistina en muestras de agua mediante la expresión de genes reporteros. Para esto se realizó alineamientos múltiples de secuencias (MSA) de los segmentos de ADN de la enzima microcistinasa, y a su vez el modelamiento de proteínas del gen *mlrA* de la misma, para el posterior diseño de primers en Benchling. Por lo que, se pudo concluir que el gen *mlrA* de la microcistinasa es capaz de ser inducido por la microcistina, además de que los primers diseñados poseen regiones altamente conservadas.

**Palabras Clave:** Cianobacterias, Floraciones, Microcistina, Microcistinasa, Biosensor.

### ***Abstract***

Poor practices during agricultural activity cause nutrients to accumulate on the water surface, generating harmful algal blooms caused by cyanobacteria. This seriously affects the health of communities near bodies of fresh water. The cyanobacteria that most produce harmful algal blooms are those of the *Microcystis* genus. These produce a hepatotoxin known as microcystin, which is degraded by the enzyme microcystinase (*mlr*). Based on this, it is possible to design a biosensor that detects the presence of microcystin in water samples through the expression of reporter genes. For this, multiple sequence alignments (MSA) of the DNA segments of the microcystinase enzyme were carried out, and in turn the protein modeling of the *mlrA* gene of the same, for the subsequent design of primers in Benchling. Therefore, it was possible to conclude that the microcystinase *mlrA* gene is capable of being induced by microcystin, in addition to the fact that the designed primers have highly conserved regions.

**Keywords:** Cyanobacteria, Blooms, Microcystin, Microcystinase, Biosensor.

## Índice general

Resumen .....	I
<i>Abstract</i> .....	II
Índice general .....	III
Índice de figuras .....	V
Índice de tablas .....	V
Capítulo 1 .....	2
1.1 Introducción.....	3
1.2 Descripción del Problema.....	3
1.3 Justificación del Problema.....	4
1.4 Objetivos.....	4
<i>1.4.1 Objetivo general</i> .....	4
<i>1.4.2 Objetivos específicos</i> .....	4
1.5 Marco teórico.....	4
1.5.1 Cianobacterias y Cianotoxinas .....	4
1.5.2 Microcistina .....	5
1.5.3 Microcistinasa ( <i>mlr</i> ) .....	6
1.5.4 Factores de transcripción .....	8
1.5.5 Biosensores.....	9
Capítulo 2 .....	
2. Metodología.....	12
2.1 Estructura del biosensor: fase bioinformática .....	12
2.2 Selección de organismos mediante NCBI .....	12
<i>2.2.1 Genome viewer y Benchling</i> .....	13
2.3 Detección de regiones codificantes y promotoras .....	14

2.4 Alineación múltiple de secuencias (MSA) .....	14
2.4.1 Weblogo.....	14
2.5 Diseño de primers.....	14
2.6 Modelamiento de proteínas .....	15
2.7 Estructura del biosensor: diseño completo del biosensor.....	15
Capítulo 3 .....	
3. Resultados y análisis.....	17
3.1 Selección de organismos mediante NCBI .....	17
Capítulo 4 .....	
4.1 Conclusiones y recomendaciones.....	26
4.1.1 Conclusiones.....	26
4.1.2 Recomendaciones .....	26
Referencias .....	

## Índice de figuras

Figura 1 .....	7
Figura 2 .....	8
Figura 3 .....	12
Figura 4 .....	15
Figura 5 .....	17
Figura 6 .....	17
Figura 7 .....	18
Figura 8 .....	19
Figura 9 .....	19
Figura 10 .....	20
Figura 11 .....	21
Figura 12 .....	21
Figura 13 .....	22
Figura 14 .....	22
Figura 15 .....	23
Figura 16 .....	23
Figura 17 .....	24

## Índice de tablas

Tabla 1 .....	13
Tabla 2 .....	15

## **Abreviaturas**

FAN Floraciones Algales Nocivas

GFP Green Fluorescent Protein

CADS Centro de Agua y Desarrollo Sostenible

MC Microcistina

WCB Whole Cell Biosensors

NCBI National Center for Biotechnology Information

BPROM Bacterial Promotor Prediction Program

BDGP Neural Network Promotor Prediction

MSA Multiple Sequence Alignment

PCR Polymerase chain reaction

# Capítulo 1

## 1.1 Introducción

Ecuador es un país agrícola, y exporta diversos productos como cacao o banano, sin embargo, estas actividades pueden traer efectos colaterales como la contaminación por nutrientes a los cuerpos de agua, este exceso de nutrientes como nitrógeno y fósforo promueve la proliferación de cianobacterias, las cuales pueden causar daño a la salud humana (Gómez et al., 2020).

Las cianobacterias han persistido a lo largo de los años debido a su alta capacidad adaptativa, tales como la presencia de mucílago para cuidarse de depredadores y de estructuras múltiples que les permiten flotar, estas estructuras son conocidas como aerotopos. Así mismo, las cianobacterias son capaces de resistir la escasez de nutrientes y soportar altas temperaturas (entre 70° y 73°C); no obstante, un ambiente óptimo, buena disponibilidad de nutrientes, alta radiación solar y un clima entre 25° y 30°C son favorables para su proliferación masiva. Cuando existe una excesiva cantidad de cianobacterias se produce un fenómeno llamado bloom, el cual germina cuando hay floraciones algales nocivas (FAN), que se caracterizan por un cambio de color en la superficie del agua, y se pueden producir tanto en aguas estancadas como en ríos y arroyos (Echenique, 2022). Ciertas especies de cianobacterias pueden producir toxinas llamadas cianotoxinas, que se pueden acumular fácilmente en cuerpos de agua. Dentro de estas cianotoxinas, se destaca a la microcistina, producida por cianobacterias del género *Microcystis*, donde el consumo de agua contaminada por esta toxina conlleva al desarrollo de cáncer hepático (Moreno, 2023).

Existen bacterias que sintetizan una enzima conocida como microcistinasa compuesta por un complejo o clúster de genes (*mtrABCD*) (Dexter et al., 2021), los cuales son capaces de degradar a la microcistina. Estudios sugieren que la expresión de esta enzima no es constitutiva,

lo que quiere decir que solo se expresa si es inducida por la presencia de microcistina (Lezcano et al., 2018). Con base a lo anterior, se puede diseñar un biosensor que use como material biológico la enzima de la microcistinasa, de esta forma, por medio de ingeniería genética se puede combinar el gen de la microcistinasa con el de una proteína fluorescente como GFP. De esta manera, si se produce una reacción colorimétrica se puede deducir que la microcistinasa reconoció la microcistina.

## **1.2 Descripción del Problema**

Este proyecto está realizado en conjunto con el Centro de Aguas y Desarrollo Sostenible (CADS) y tiene como objetivo una mejora en el saneamiento de muestras de agua, debido a que se ven en algunos casos afectados por toxinas producidas por cianobacterias, lo que conlleva a enfermedades gastrointestinales, hepáticas, entre otras. Se busca elaborar un sistema biológico mediante el uso de plásmidos que detecte la presencia de microcistina. La presencia de la cianotoxina se detectará mediante un gen reportero. Para ello, se emplearán las herramientas bioinformáticas necesarias que permitan localizar la presencia de la microcistina, junto al diseño de primers para la clonación de las regiones promotoras usadas posteriormente en los plásmidos, para la elaboración del biosensor.

## **1.3 Justificación del Problema**

Unos de los grandes problemas que han afectado a la salud humana a lo largo de los años es la calidad del agua. Existen varios parámetros que determinan si el agua se encuentra en las condiciones adecuadas para el consumo humano; sin embargo, se desconoce mucho acerca de la detección de microcistinas en cuerpos de agua, las cuales causan graves afectaciones al organismo que van desde enfermedades hepáticas hasta casos extremos como el desarrollo de

cáncer hepático y colon. Ante esta situación, es necesario crear un sistema biológico que ayude en la detección de estas toxinas.

## **1.4 Objetivos**

### ***1.4.1 Objetivo general***

Diseñar un biosensor que detecte la presencia de microcistina en muestras de agua mediante la expresión de genes reporteros.

### ***1.4.2 Objetivos específicos***

1. Identificar regiones promotoras de los genes involucrados mediante el uso de herramientas bioinformáticas en la síntesis de microcistinasa.
2. Determinar regiones conservadas de los genes involucrados mediante la alineación de alineamientos múltiples.
3. Generar modelamientos de las proteínas de la microcistinasa para observar los sitios de anclaje.

## **1.5 Marco teórico**

### **1.5.1 Cianobacterias y Cianotoxinas**

Las cianobacterias son microorganismos fotosintéticos con una gran capacidad de adaptación que les permite colonizar distintos ecosistemas. Estos microorganismos habitan ríos, estanques, lagos, arroyos y océanos, forman parte del fitoplancton y pueden formar simbiosis con plantas acuáticas o líquenes (Palacio Gómez et al., 2019), prefieren lugares con mayor intensidad lumínica y nutrientes como nitrógeno y fósforo; sin embargo, también son capaces de sobrevivir en ambientes con condiciones extremas gracias a su habilidad de fijar nutrientes. Algunos géneros de cianobacterias producen metabolitos tóxicos denominados cianotoxinas, lo que provoca cambios en la apariencia y composición de los cuerpos de agua, como un aumento

de pH, transparencia, color, entre otros. Las cianotoxinas se pueden clasificar en hepatotoxinas, que son aquellas que afectan el sistema gastrointestinal y las neurotoxinas que afectan el sistema neuromuscular (Salomón et al., 2020).

### 1.5.2 Microcistina

El exceso de cianobacterias en cuerpos de agua es perjudicial debido principalmente a que son capaces de producir microcistinas, las cuales son hepatotoxinas capaces de afectar la calidad del agua dulce. Uno de los grupos de cianobacterias capaces de producir microcistinas son las del género *Microcystis*, estas tienen la habilidad de soportar altas temperaturas, así como grandes cantidades de intensidad lumínica, se acumulan en la superficie de los cuerpos de agua y habitan a niveles bajos debido a su función regulatoria y migratoria.

En Ecuador se conocen especies como: *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis wesenbergii*, *Microcystis viridis*, además, otras como: *Planktothrix agardhii*, *Anabaena flos-aquae*, y algunas del género *Nodularia* (Moreno, 2023). La toxicidad de estas cianobacterias depende de variables como su concentración en la muestra a analizar y de su estructura química. Según la estructura de la cianotoxina se pueden determinar seis variantes de microcistina (MC), las cuales son:

- MC-LR: Microcystin-Leucine-Arginine
- MC-RR: Microcystin-Arginine-Arginine
- MC-YR: Microcystin-Tyrosine-Arginine
- MC-LY: Microcystin-Leucine-Tyrosine
- MC-LW: Microcystin-Leucine-Tryptophan
- MC-LF: Microcystin-Leucine-Phenylalanine

Diversos estudios señalan a MC-LR como la más perjudicial debido a que afecta gravemente al hígado, así mismo puede ser precursora de un cáncer hepático y de colon (Gajer Wasersztein et al., 2020).

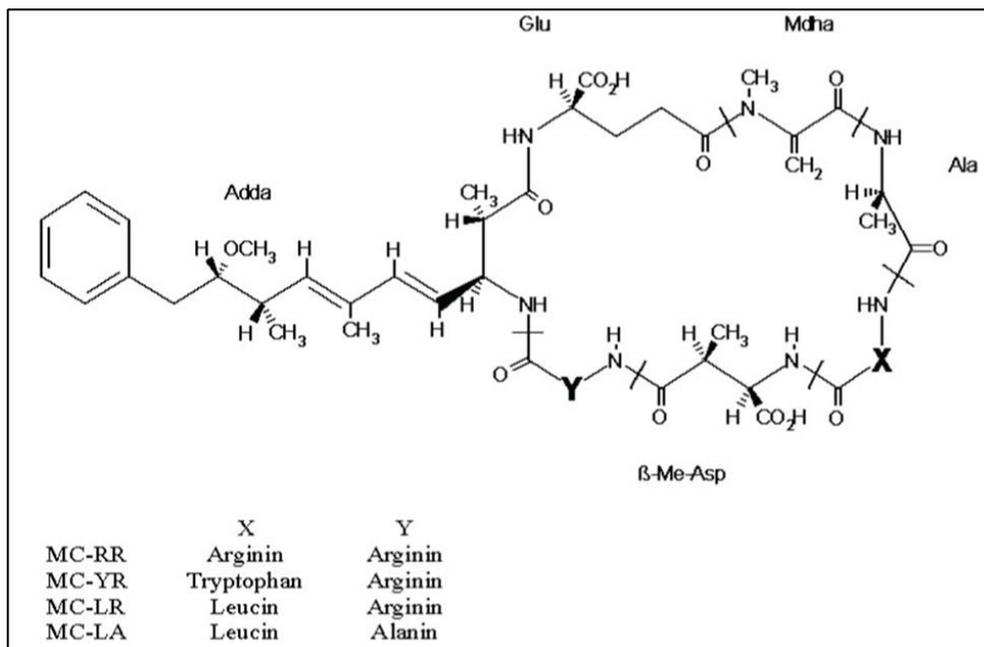
### 1.5.3 Microcistinasa (*mlr*)

Antes de entrar en lo que son las microcistininas, es necesario tener en cuenta que las microcistininas hepatotóxicas tienen una estructura cíclica como se puede ver en la Figura 1, que les permite resistir diversos agentes químicos y enzimáticos para evitar su degradación por proteasas; no obstante, en 1996, fue identificada la bacteria *Sphingomonas sp* (ACM-3962) capaz de degradar microcistina, esta realiza un proceso de degradación en 3 partes, por medio de enzimas que se denominan microcistininasas (Sun et al., 2021).

Una de ellas es la enzima *mlrA* que se encarga del rompimiento del anillo molécula, seguida por *mlrB* responsable de la elaboración del tetrapéptido y, por último, la *mlrC* que le corresponde la hidrólisis de los productos. Estas enzimas conforman el clúster *mlr* formado por 4 genes (A, B, C y D), siendo el último el *mlrD*, que se sugiere cumple una función transportadora de la microcistina a través de la membrana (Dziga et al., 2012). La enzima *mlrA* es clave en todo este proceso de catálisis, y es candidata para ser usada como material biológico para empezar el procedimiento de detección de microcistininas. Este método de detección se puede considerar como un proceso económico, dado que, experimentalmente se pueden obtener células enteras que codifiquen para el gen *mlrA* mediante la clonación de ADN (Sun et al., 2021).

## Figura 1

### Estructura de la microcistina

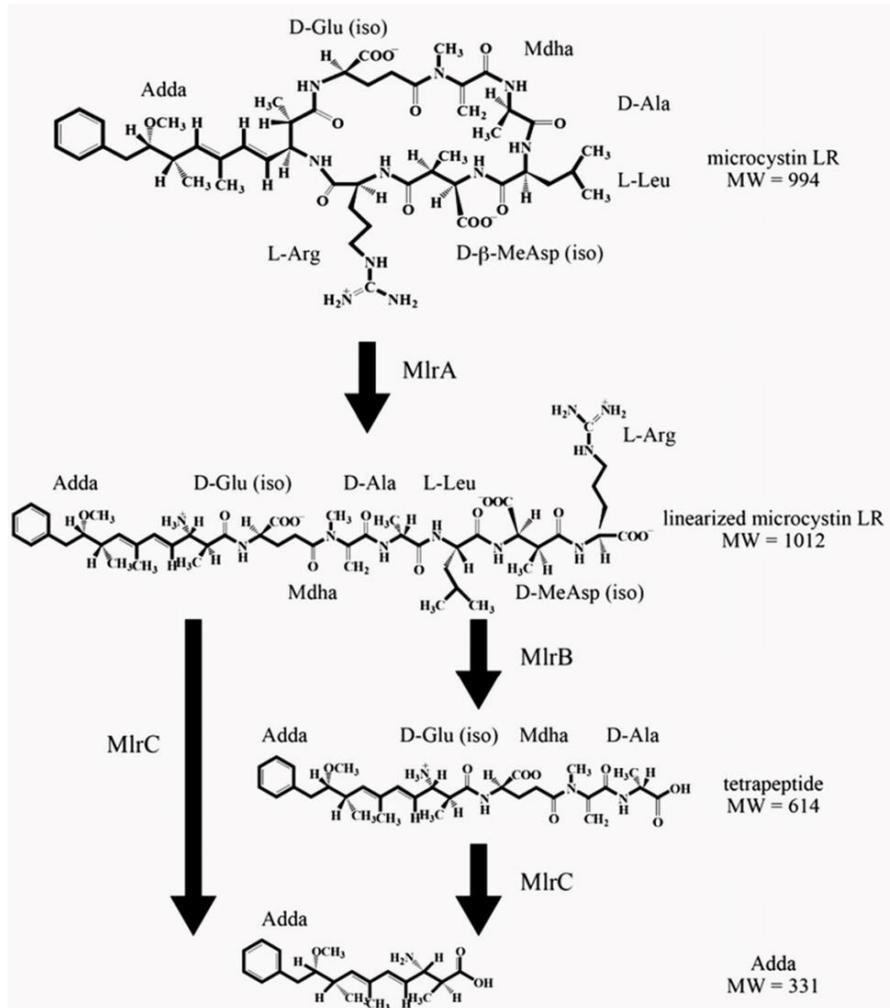


*Nota.* Figura obtenida de la Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria (2023).

En un estudio realizado en Japón en el 2011, se investigó acerca de los factores que inducen a la expresión del gen y se concluyó que el clúster *mlrABC* se expresa en presencia de microcystin-LR (MC-LR), la que es una variante de la microcistina (Shimizu et al., 2011). Se analizó también la estructura de MC-LR, como se observa en la Figura 2, la cual es ciclo-(D-Ala-L-Leu-D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha), donde se observó que Adda (ácido amino-3-metil-2,6-epiranodien-1-il) está involucrada en la comunicación célula-célula (Pellicer et al., 2007).

## Figura 2

Estructura y metabolismo de la Microcistina LR mediante la acción enzimática de MlrA, MlrB y MlrC



Nota. Figura obtenida de Researchgate (2019).

### 1.5.4 Factores de transcripción

Los factores de transcripción son proteínas que se unen al ADN, con el fin de modificar la expresión génica, mediante la unión a regiones promotoras que permite activar o desactivar la expresión de genes, esto para cumplir funciones como controlar las rutas metabólicas, así como

el crecimiento y respuestas a situaciones de estrés como la falta de nutrientes (Merino et al., 2020).

Dentro de las cianobacterias se encuentran distintos factores de transcripción tales como:

- Factor de transcripción NtcA: Participa en la regulación de genes del metabolismo del nitrógeno, además ayuda en la adaptación en caso de escases del nutriente.
- Factor de transcripción PhoB: Este factor está encargado de regular el metabolismo del fósforo, así como la adaptación en caso de escasez.
- Factor de transcripción LexA: Este factor ayuda en la fotosíntesis y procesos que dependan de la intensidad lumínica.
- Factor de transcripción sigma: Este factor regulatorio es específico para cianobacterias y pueden regular la expresión de genes relacionados al crecimiento, cambios de temperatura y respuesta al estrés (Jose et al., 2009).

### **1.5.5 Biosensores**

Los biosensores son herramientas biotecnológicas capaces de transformar la información del material biológico en señales fáciles de interpretar, ya sea un cambio de color, una emisión de luz, entre otras cosas. En la actualidad, los biosensores son usados en diversas áreas como el control de calidad de los alimentos, en análisis médicos, ya que pueden realizar un monitoreo continuo. Entre los componentes del biosensor se tienen electrodos para la conductividad eléctrica; bioreceptores que interactúan con el material biológico a analizar, los que pueden ser enzimas, anticuerpos entre otros; transductores que convierten la señal química en una señal cuantificable, hay de tipo óptico, eléctrico, entre otros. Los biosensores pueden tener 3 clasificaciones: por los receptores, si se usan enzimas son biosensores catalíticos, por

anticuerpos son biosensores inmunológicos y biosensores de ácidos nucleicos si se usa ADN. También se clasifican según los transductores en biosensores ópticos, piezoeléctricos, térmicos o calorimétricos; y por último según su área de aplicación, se tienen biosensores médicos, clínicos, ambientales y comerciales (Song et al., 2021).

Actualmente se están desarrollando biosensores que utilizan las células completas en lugar de enzimas, estos se conocen como Whole Cell Biosensors (WCB). Estos pueden ser modificados genéticamente para producir una señal detectable, por ejemplo, una señal colorimétrica. Entre las principales ventajas de su uso está que pueden ser diseñados específicamente para un compuesto (Ahmed et al., 2014).

## **Capítulo 2**

## 2. Metodología

### 2.1 Estructura del biosensor: fase bioinformática

Para lograr diseñar el biosensor fue necesario definir los pasos bioinformáticos que se realizaron, antes de pasar a la fase experimental (Figura 3)

**Figura 3**

*Fase bioinformática del biosensor*



### 2.2 Selección de organismos mediante NCBI

El primer paso que se siguió para diseñar el biosensor fue buscar los organismos que tienen presente el gen *mlrA*, para lograr esto se utilizó el código de acceso de este gen, el cual es “AF411068” (Bourne, 2001), en la base de datos del Centro de Información Nacional de Biotecnología (NCBI). Se seleccionó 4 organismos, descritos en la Tabla 1. Los criterios de selección de los organismos fue presentar el genoma completo en la base de datos NCBI, y tener un alto valor de similitud con la secuencia base.

**Tabla 1**

*Cepas de interés cuyos genomas se usaron en el análisis bioinformático*

<b>Cepas de interés</b>	<b>Códigos de acceso</b>
<i>Sphingosinicella microcystinivorans</i> B9 DNA, complete genome	AP018711.1
<i>Novosphingobium sp.</i> THN1 chromosome, complete genome	CP028347.1
<i>Sphingopyxis sp.</i> YF1 chromosome, complete genome	CP033204.1
<i>Sphingopyxis sp.</i> USTB-05 chromosome, complete genome	CP084712.1

### **2.2.1 Genome viewer y Benchling**

Se seleccionó únicamente a los organismos con genomas completos, puesto que si se consideraban los genomas parciales no se iba a obtener la secuencia completa y al momento de buscar los factores de transcripción o regiones promotoras se podría estar dejando fuera alguno de ellos. La idea fue indagar los genomas completos con el clúster entero por cada organismo. Las secuencias fueron obtenidas gracias a un Blast de nucleótidos dentro del Gen Bank del NCBI. Dentro de cada opción de los genomas de los organismos, con ayuda de la herramienta de Genome Viewer se visualizó el fragmento donde estaba presente el gen *mlrA*, el cual fue la referencia principal para tomar una longitud de 2,000 pares de base (pb) antes de que empiece la región del gen A junto con todo el fragmento de este (aproximadamente 1,000 pb) tomando en total 3,000 pb en sentido de 5' a '3. Esto se realizó para cada uno de los 4 organismos mediante Benchling versión 2.0, el cual es útil para editar secuencias.

### **2.3 Detección de regiones codificantes y promotoras**

Para detectar las regiones codificantes (CDS) y promotoras, se utilizaron los softwares bioinformáticos: Bacterial Promotor Prediction Program (BPROM) y Neural Network Promoter Prediction (BDGP) (Avila, 2022). Para las regiones codificantes se tomó en cuenta la longitud más larga de la región codificante empezando con el codón de iniciación (ATG) y finalizando con algún codón de terminación (UAA, UAG, UGA) de cada organismo. Posteriormente, utilizando los softwares antes mencionados, se colocó toda la secuencia completa otorgando las posibles regiones promotoras dentro del fragmento de ADN seleccionado.

### **2.4 Alineación múltiple de secuencias (MSA)**

Dentro del software bioinformático de Benchling, se procedió a realizar 2 alineamientos múltiples entre todas las secuencias: uno con todas las regiones codificantes de las cepas y otra con todas las regiones promotoras de los organismos. Así mismo, se realizaron otros alineamientos múltiples usando el software bioinformático de T-Coffee versión 9.03 para ello, las secuencias de los organismos se tradujeron a proteínas y se convirtieron a formato FASTA para así poderlas cargar en este software. Además, para corroborar los alineamientos obtenidos, se utilizó también el software bioinformático de ClustalW versión 2.0.6.

#### ***2.4.1 Weblogo***

Se elaboraron 2 weblogos con las secuencias de aminoácidos de los alineamientos múltiples: uno con todas las regiones codificantes y otro con las regiones promotoras posibles.

### **2.5 Diseño de primers**

Una vez realizados los alineamientos múltiples, se procedió a diseñar los primers en sentido forward y reverse para las secuencias que se utilizaron usando Benchling, enfocando el

diseño en los resultados de las alineaciones realizadas y en las condiciones óptimas que se describen en la Tabla 2.

**Tabla 2**

*Condiciones de los primers*

Temperatura	Longitud
61.7 °C – 62.4 °C	18-25 nucleótidos

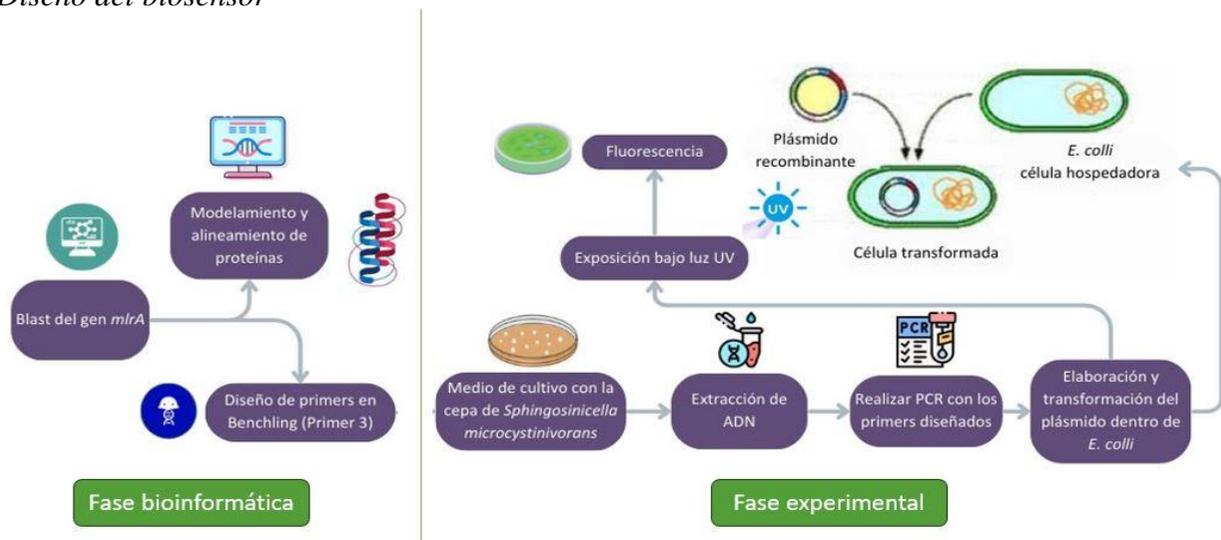
## 2.6 Modelamiento de proteínas

Se utilizó el software bioinformático Swiss-Model versión 2.9, colocando la secuencia del organismo traducida en formato FASTA. De esta manera, se pudo construir un modelamiento de la estructura tridimensional de la proteína para determinar los sitios de anclaje y las funciones de esta. Para el modelo no se consideró la opción del AlphaFold, sino aquellas que mejor describían a cada proteína.

## 2.7 Estructura del biosensor: diseño completo del biosensor

**Figura 4**

*Diseño del biosensor*



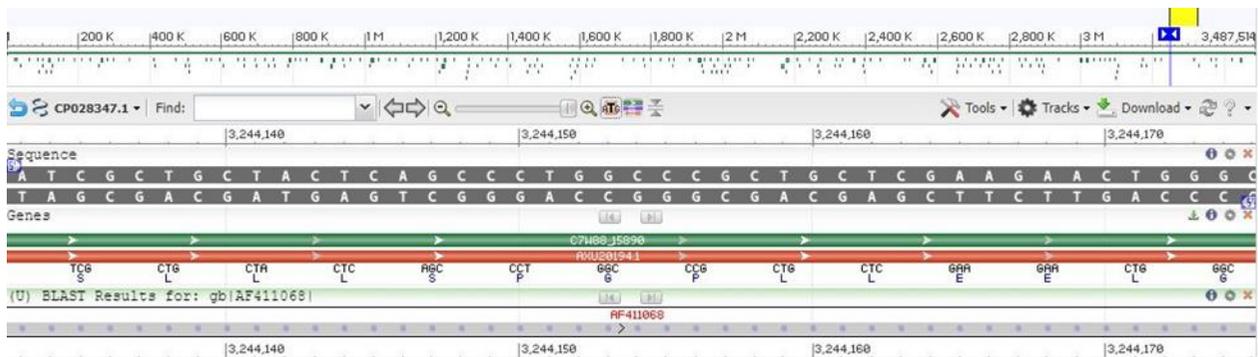
## **Capítulo 3**

### 3. Resultados y análisis

Dentro del genoma completo de cada organismo se tomó en cuenta la porción del gen *mlrA* (barra roja), se pudo determinar que los demás genes presentes del complejo (B, C y D) se encontraban cerca de la región seleccionada, por lo que se tuvo cuidado con los sentidos de orientación al tomar cada secuencia.

**Figura 5**

*Novoshpingobium sp. THN1 chromosome, complete genome*



Una vez que se obtuvo las porciones del genoma completo de cada cepa, fueron trasladadas a Benchling. Se procedió a determinar las posibles regiones promotoras de cada cepa, para ello, se colocó cada genoma en los programas Neural Network Promoter Prediction y BPROM) con la opción de Prokaryotic model y los demás parámetros por defecto. Los resultados se podrán visualizar en las Figuras 6 y 7.

**Figura 6**

*Determinación de posibles promotores de Shingosinicella microcystinivorans B9*

*DNA utilizando Neural Network Promoter Prediction*

Promoter predictions for 1 prokaryotic sequence with score cutoff 0.80 (transcription start shown in larger font):

Promoter predictions for seq0 :

Start	End	Score	Promoter Sequence
119	164	0.87	TTCTTGTGACCCCTTTCAGAGTCATCTGGAAATGTTCCGSC <b>T</b> GAGGSTATGG
140	185	0.96	TCATCTGGAATGTTCCGCTGAGGGTATGGGAGAATCGAAC <b>A</b> ATGCGGGAG
188	233	0.86	AGTTTGTGACGGCAGCGGCCCTTATAGTAAGCTTTTATGTGCT <b>G</b> CGATCCTG
329	374	0.99	ACATTGTGACGGCCATCAGGTCCAGTTCGATTATCCAA <b>C</b> ASCCTATACG
529	574	0.82	TGCTTCCTTGTCTTCTTCGGCTCACGGGATGATG <b>T</b> GGGTCAGACCTA

En base a los resultados de las posibles regiones promotoras obtenidas, se seleccionó las 2 primeras puesto que su posición de longitud iba de acuerdo con la región codificante de la cepa de *Sphingosinella microcystinivorans B9 DNA*, las demás no se tomó en cuenta porque sobrepasaban la región codificante y las regiones promotoras no estarían presentes en ese rango.

### Figura 7

*Determinación de posibles promotores de Sphingosinella microcystinivorans B9 DNA utilizando BPROM*

```
> test sequence
Length of sequence-      1193
Threshold for promoters - 0.20
Number of predicted promoters -      3
Promoter Pos:      224 LDF- 2.90
-10 box at pos.      209 TAGTAAGCT Score      47
-35 box at pos.      191 TTGTCA Score      53
Promoter Pos:      570 LDF- 1.70
-10 box at pos.      555 CGGGATGAT Score      38
-35 box at pos.      536 TTGTCT Score      48
Promoter Pos:      906 LDF- 0.24
-10 box at pos.      891 CAGTACGAT Score      44
-35 box at pos.      869 TTATCG Score      24

Oligonucleotides from known TF binding sites:

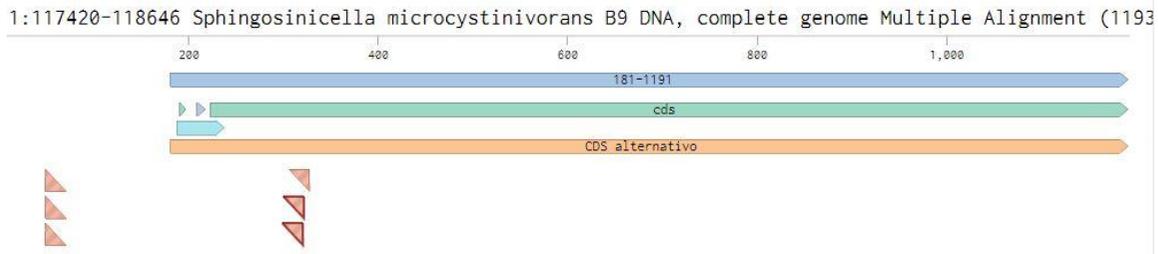
No such sites for promoter at      224
No such sites for promoter at      570
No such sites for promoter at      906
```

La figura 7 muestra la posición de algunos fragmentos de posibles regiones promotoras, es importante verificar la posición de la longitud y que concuerde con la región codificante de la cepa con la que se trabajó, además de que cuando hay un alto score quiere decir que aquel fragmento es más confiable de seleccionar.

BPROM (Figura 7) indicó las posiciones -10 y -35, las cuales dan indicios de los posibles promotores ubicados dentro de la secuencia analizada. Además, otorga las posibles posiciones de los factores de transcripción. Todo lo anterior indicado se lo visualiza de mejor forma en la Figura 8.

## Figura 8

*Sphingosinicella microcystinivorans* B9 DNA, complete genome con su región codificante y promotor marcados



Una vez identificadas las regiones promotoras, codificantes y los factores de transcripción se procedió a realizar dos alineamientos múltiples entre todas las regiones codificantes de las cepas y entre todas las regiones promotoras de las mismas para observar las regiones más conservadas; en este caso se hizo de 2 maneras, por el mismo Benchling y por ClustalW (en este último método se debe primero transformar a proteínas para poder alinearlas), como se puede observar en las Figuras 9, 10 y 11.

## Figura 9

Alineación múltiple de todas las cepas dentro del software bioinformático Benchling



En esta figura se puede apreciar varias partes del alineamiento con una alta región de conservación de sus nucleótidos respectivos, lo que indica que el gen *mlrA* presente en estos organismos cumple una función biológica similar.

**Figura 10**

*Alineación múltiple de las regiones codificantes por medio de ClustalW (regiones altamente conservadas por el asterisco que es el indicador)*

```

AP018711.1_117420-118646 -----VLAITLIALAANVLRANDPTPLGPMFKMLQETHAHLN
CP028347.1_3243500-3244454 MREFVQRPLLCFYVLAITLIALAANHALRAMSPTPLDPMFKMLQETHAHLN
CP033204.1_4084891-4085986 MREFVQRPLLCFYVLAITLIALAANHALRAMSPTPLDPMFKMLQETHAHLN
CP084712.1_3895416-3896529 MREFVQRPLLCFYVLAITLIALAANHALRAMSPTPLDPMFKMLQETHAHLN
*****;****;****;*****

AP018711.1_117420-118646 IVTAIRSTFDYPTAYTLLFPAAPMLAALIVTGIYGRAGFRELLSRCAP
CP028347.1_3243500-3244454 IITAVRSTFEYPGAYTLLFPAAPMFAALITATGIVYQAGFRELLSRCAP
CP033204.1_4084891-4085986 IITAVRSTFEYPGAYTLLFPAAPMFAALIVTGIYGRAGFRELLSRCAP
CP084712.1_3895416-3896529 IITAVRSTFEYPGAYTLLFPAAPMFAALIVTGIYGRAGFRELLSRCAP
*;*;*****;****;*****;*****;*****

AP018711.1_117420-118646 NRDPVSHRQGVTVIACVLFVFFALTGMVWQTYLYAPSGTLDRAFLRYGS
CP028347.1_3243500-3244454 NRSVPVSHRQGVTVIACVLAFFALTGMVWQTYLYAPPGLDRTFLRYGS
CP033204.1_4084891-4085986 NRSVPVSHRQGVTVIACVLAFFALTGMVWQTYLYAPPGLDRTFLRYGS
CP084712.1_3895416-3896529 NRSVPVSHRQGVTVIACVLAFFALTGMVWQTYLYAPPGLDRTFLRYGS
**;*****;*****;*****;****;*****;*****

AP018711.1_117420-118646 DPLSIYAMLAASLLISGPPLLEELGHRGFALPQLKKFDPPLAAVILGTM
CP028347.1_3243500-3244454 DPVAIYVMLAASLLISGPPLLEELGHRGFALPQLKKFDPPLAAVILGIM
CP033204.1_4084891-4085986 DPLAIYAMLAASLLISGPPLLEELGHRGFALPQLKKFDPPLAAVILGIM
CP084712.1_3895416-3896529 DPLAIYAMLAASLLISGPPLLEELGHRGFALPQLKKFDPPLAAVILGLM
**;*;*****;*****;*****;*****;*****

AP018711.1_117420-118646 MNAIHLPRDLPANFSGEPGALNGVIVKQFVIAPGMIASTIIAVFVCKNLG
CP028347.1_3243500-3244454 MNAIHLPRDLPFLSGAPGAANSVIVKQVVIAPGFIASTIIAVFVCKNLG
CP033204.1_4084891-4085986 MNAIHLPRDLPFLSGEPGAANGVIVKQFVIIPGFIAGTIIAVFVCKNLG
CP084712.1_3895416-3896529 MNAIHLPRDLPFLSGEPGAANGVIVKQFVIIPGFIAGTIIAVFVCKNLG
*****;****;****;*****;****;*****

AP018711.1_117420-118646 GSLNGGLLT-HAIHNELGVMVMAENSPAAGLGNRPHDFIEFAVAIGLVL
CP028347.1_3243500-3244454 GSNAGCSLTPSIT-----
CP033204.1_4084891-4085986 GSNMGVLI-HAIHNELGVMVTAENAPTAVAGLGNRPHDLVEFAVAIGLVL
CP084712.1_3895416-3896529 GSNMGVLI-HAIHNELGVMVTAENAPTAVAGLGNRPHDLVEFAVAIGLVL
**;*;*****;*****

AP018711.1_117420-118646 ICGRSLGAASPDNARLANGNVPPKLPGGATDKSGANA
CP028347.1_3243500-3244454 -----SHE-----
CP033204.1_4084891-4085986 ICGRSLGAASPDNARLANGNVPPKLPGVATDKSGANA
CP084712.1_3895416-3896529 ICGRSLGAASPDNARLANGNVPPKLPGVATDKSGANA
*****;*****;*****

```

En este alineamiento múltiple se observa que gran parte de región traducida de los organismos presenta un nivel muy elevado de conservación, en donde se pueden encontrar los sitios activos de las enzimas y los lugares de acoplamiento de los receptores proteicos.

## Figura 11

*Alineación múltiple de los promotores por medio de ClustalW*

```
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

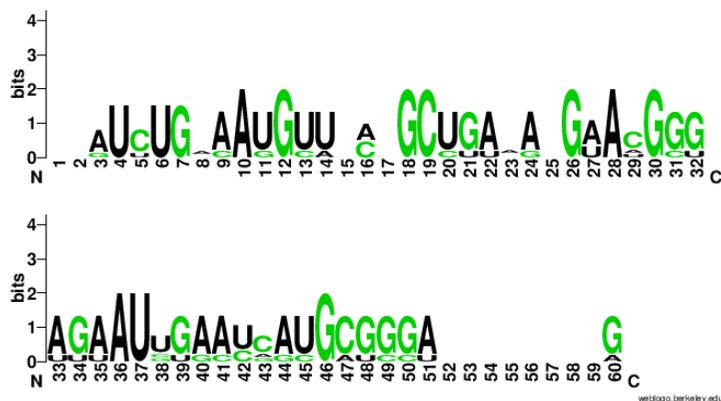
AP018711.1_117420-118646   -AGUUUGUCAGGCAGCGGCCUUUAG-UAAGCUUUUAUGUGCUGGCGAUCC
CP028347.1_3243500-3244454 CUAUCUGAAAUGUU-CUGCUGACAG-AACGGGAGAAUUGAACCAUGCGGG
CP033204.1_4084891-4085986 -----AAUGUU--AGCUGAAAGGAACGGGAGAAUUGAAUCAUGCGGG
CP084712.1_3895416-3896529 CGAUCUGAAAUGUU--AGCUGAAAGGAACGGGAGAAUUGAAUCAUGCGGG
                        * *      **      ** * *      **      *

AP018711.1_117420-118646   U-----G
CP028347.1_3243500-3244454 A-----G
CP033204.1_4084891-4085986 AGUUUGUCAA
CP084712.1_3895416-3896529 A-----G
```

Para una mayor apreciación se realizó weblogs, los cuales permitieron visualizar en mayor tamaño las regiones conservadas (véase Figuras 12, 13 y 14) de los promotores (en este caso se debe mantener la secuencia de ADN y no transformarla a proteína) y de las regiones codificantes de todas las cepas respectivamente.

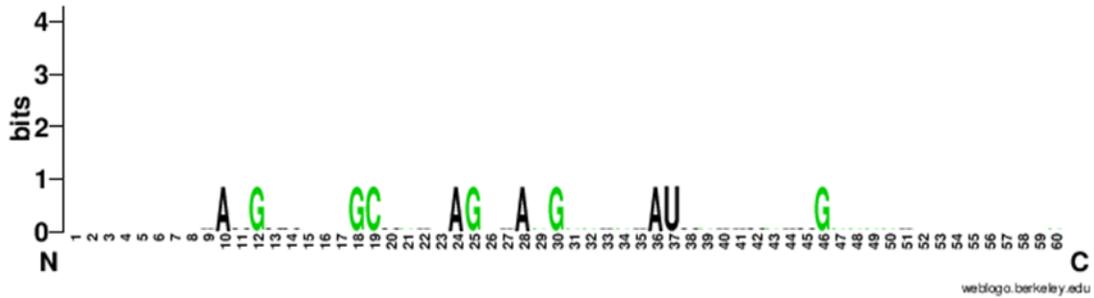
## Figura 12

*Weblogo de los promotores de las cepas*



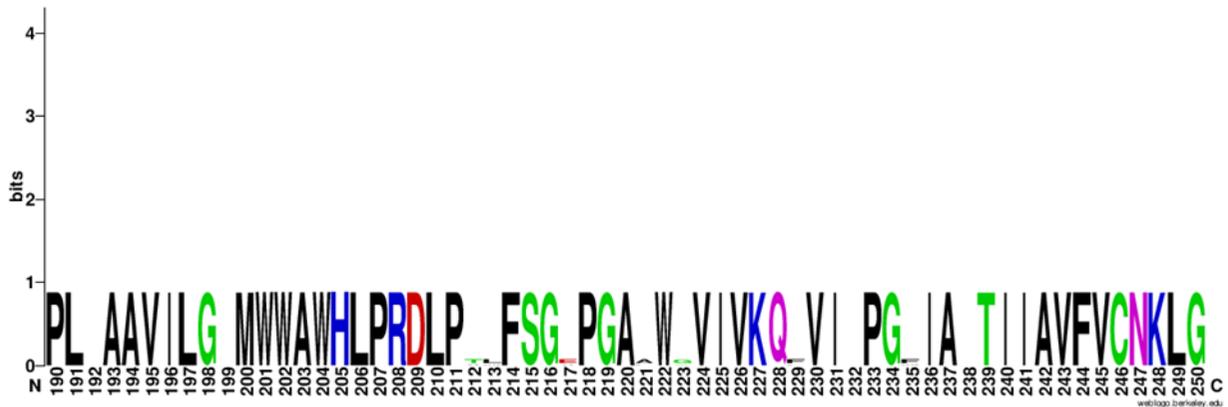
**Figura 13**

*Weblogo de los promotores de las 4 cepas*



**Figura 14**

*Weblogo de las regiones codificantes de las 4 cepas*



En el weblogo obtenido se visualiza una alta conservación, mientras más grande es la letra de aminoácidos, mayor región de conservación tendrá. Por lo que, el weblogo es altamente conservado para las regiones codificantes de las 4 cepas.

Los primers que se diseñaron específicamente cerca de las regiones promotoras, de los factores de transcripción, y cerca de la región codificante tuvieron una longitud de 25 nucleótidos, en sentido tanto de 5' a 3' como de 3' a 5' (Figura 15).

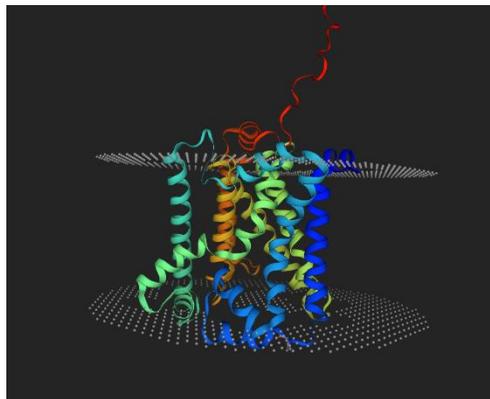
## Figura 15

### *Diseño de primers en Benchling*

<input type="checkbox"/>	Penalty	Direction	% GC	T <sub>m</sub> °C	Location	Length	Product BP	Primer
<input checked="" type="checkbox"/>	0.562	<input checked="" type="checkbox"/> FWD	54.5%	61.7°	49-70	22	311	5' <b>ttcggtttgcgttgttcgcgc</b> 3'
		<input checked="" type="checkbox"/> REV	63.6%	61.8°	338-359	22		5' <b>ctcgaacgtggaccctgacagcg</b> 3'
<input checked="" type="checkbox"/>	0.606	<input checked="" type="checkbox"/> FWD	54.5%	61.6°	52-73	22	308	5' <b>ggtttgctgttgttcgcgcaa</b> 3'
		<input checked="" type="checkbox"/> REV	63.6%	61.8°	338-359	22		5' <b>ctcgaacgtggaccctgacagcg</b> 3'
<input checked="" type="checkbox"/>	0.684	<input checked="" type="checkbox"/> FWD	54.5%	61.7°	49-70	22	278	5' <b>ttcggtttgcgttgttcgcgc</b> 3'
		<input checked="" type="checkbox"/> REV	63.6%	62.3°	305-326	22		5' <b>gagtgagcgtgcctctcttgc</b> 3'
<input checked="" type="checkbox"/>	0.700	<input checked="" type="checkbox"/> FWD	54.5%	61.7°	49-70	22	271	5' <b>ttcggtttgcgttgttcgcgc</b> 3'
		<input checked="" type="checkbox"/> REV	59.1%	62.4°	298-319	22		5' <b>gctgcgtctcttgcagcatct</b> 3'
<input checked="" type="checkbox"/>	0.700	<input checked="" type="checkbox"/> FWD	54.5%	61.7°	49-70	22	272	5' <b>ttcggtttgcgttgttcgcgc</b> 3'
		<input checked="" type="checkbox"/> REV	59.1%	62.4°	299-320	22		5' <b>agcgtgcgtctcttgcagcatt</b> 3'

## Figura 16

### *Modelamiento de la proteína A del organismo *Spingosinicella microcystinivorans**



Se logró modelar la proteína A (Figura 16) utilizando el Swiss-Model de los organismos antes mencionados, en donde se observa la estructura proteica tridimensional apreciando los sitios de anclaje, y el cómo las hebras traspasan las paredes membranales. Además, los alineamientos múltiples de la misma proteína (Figura 17) A presenta regiones sumamente conservadas.



## Capítulo 4

## 4.1 Conclusiones y recomendaciones

### 4.1.1 Conclusiones

- Los alineamientos múltiples tanto de las regiones codificantes como de las posibles regiones de los promotores tuvieron regiones altamente conservadas.
- Se diseñaron primers para clonar las regiones promotoras conservadas, para ser clonadas en un plásmido delante de la proteína marcadora GFP y evaluar la expresión por medio de fluorescencia.
- Es importante reconocer las posibles regiones promotoras constitutivas ya que sólo se deben activar en ciertas condiciones, como por ejemplo cuando se lo exponga a microcistina, junto a los factores de transcripción que ayudan en este proceso.
- El modelamiento de la proteína mlrA de la cepa *Sphingosinicella microcystinivorans* tuvo varios sitios de anclaje, y también se observa que parte de su estructura atraviesa las paredes celulares, lo que indica su potencial función al momento de actuar en la degradación.

### 4.1.2 Recomendaciones

Es recomendable modelar las otras proteínas del gen B y C de la microcistinasa para poder analizar de mejor forma la función de degradación de la microcistina.

Se debería realizar más alineamientos múltiples con más herramientas bioinformáticas entre los generados para comprender más a profundidad sus funciones en base a su estructura.

Se recomienda continuar con la fase experimental del diseño del biosensor (Figura 4) puesto que se cumplió en este trabajo la parte bioinformática (Figura 3). El trabajo de laboratorio se realizará con la cepa *Sphingosinicella microcystinivorans*.

## Referencias

- Ahmed, A., Rushworth, J. V., Hirst, N. A., & Millner, P. A. (2014). Biosensors for whole-cell bacterial detection. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3), 631–646.  
<https://doi.org/10.1128/CMR.00120-13>
- Andrés Alejandro Arévalo Moreno. (2023). *ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD DE MICROALGAS Y CIANOBACTERIAS EN ECOSISTEMAS ACUÁTICOS CONTINENTALES DEL ECUADOR, PARA ESTABLECER LA CALIDAD DEL AGUA.*
- Dexter, J., McCormick, A. J., Fu, P., & Dziga, D. (2021). Microcystinase – a review of the natural occurrence, heterologous expression, and biotechnological application of MlrA. In *Water Research* (Vol. 189). Elsevier Ltd.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116646>
- Dziga, D., Wladyka, B., Zielińska, G., Meriluoto, J., & Wasylewski, M. (2012). Heterologous expression and characterisation of microcystinase. *Toxicon*, 59(5), 578–586.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.01.001>
- Echenique, R. O. (2022). *Las cianobacterias: el invento más revolucionario.*  
<https://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/146755>
- Gajer Wasersztein, I., Pereira Zorrilla de San Martín, P., & Skuras Larravide, F. (2020). *Desarrollo de un sistema integrado de detección de Microcystis aeruginosa y microcistina-LR en muestras de agua mediante qPCR y UHPLC.*  
<https://dspace.ort.edu.uy/handle/20.500.11968/4442>
- GENCAT. (26 de 06 de 2023). *acsa.gencat.cat*. Obtenido de *acsa.gencat.cat*:  
<https://acsa.gencat.cat/es/actualitat/butlletins/acsa-brief/cianobacteris/>

- Jose, A. :, Aguilera, M., Tutor, P., Leonor, U. :, & Carrasco, P. (n.d.). *Fases preliminares para el estudio de la activación de la transcripción dependiente del factor de transcripción cianobacteriano NtcA*.
- Lezcano, M. Á., Quesada, A., & El-Shehawy, R. (2018). Seasonal dynamics of microcystin-degrading bacteria and toxic cyanobacterial blooms: Interaction and influence of abiotic factors. *Harmful Algae*, 71, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.11.002>
- Manuel Domínguez Gómez, M., Jesús, C., González, R., Carmen, D. C., Pérez, G., José, C., & Perales Vargas-Machuca, A. (2020). *Revista Científica ECOCIENCIA FICORREMEDIACIÓN DE AGUAS RESIDUALES URBANAS DE PEQUEÑOS MUNICIPIOS CON MICROALGAS PHYTOREMEDIATION OF URBAN WASTEWATER OF SMALL MUNICIPALITIES WITH MICROALGAE*. 7(2).
- Merino, G., Trejo Téllez, L., & Tiessen, A. (n.d.). *Conceptos básicos y metodologías innovadoras de mejoramiento genético de maíz*. Retrieved January 9, 2024, from [https://www.researchgate.net/profile/Fernando-Gomez-Merino/publication/240585743\\_Factores\\_de\\_transcripcion/links/0c96051c64649a643900000/Factores-de-transcripcion.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Fernando-Gomez-Merino/publication/240585743_Factores_de_transcripcion/links/0c96051c64649a643900000/Factores-de-transcripcion.pdf)
- Palacio Gómez, K., Hernández Atilano, E., Peñuela Mesa, G., Aguirre Ramírez, N., Vélez Macías, F., Palacio Gómez, K., Hernández Atilano, E., Peñuela Mesa, G., Aguirre Ramírez, N., & Vélez Macías, F. (2019). Características morfológicas de las cianobacterias y fitoplancton dominante en embalses de Antioquia: un enfoque basado en el biovolumen. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 22(2). <https://doi.org/10.31910/RUDCA.V22.N2.2019.1306>

- Pellicer, S., Vela, L., & Sevilla, E. (2007). *Las Microcistinas*.  
<https://www.researchgate.net/publication/28300534>
- Researchgate. (01 de 2019). *www.researchgate.net*. Obtenido de *www.researchgate.net*:  
[https://www.researchgate.net/figure/Biodegradation-pathway-of-MC-LR-by-Sphingomonas-sp-Source-Adapted-and-modified-from-Li\\_fig2\\_328810524](https://www.researchgate.net/figure/Biodegradation-pathway-of-MC-LR-by-Sphingomonas-sp-Source-Adapted-and-modified-from-Li_fig2_328810524)
- Salomón, S., Rivera-Rondón, C. A., & Zapata, Á. M. (2020). Cyanobacterial blooms in Colombia: State of knowledge and research needs in the context of climate global change. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 44(171), 376–391. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.1050>
- Shimizu, K., Maseda, H., Okano, K., Itayama, T., Kawauchi, Y., Chen, R., Utsumi, M., Zhang, Z., & Sugiura, N. (2011). How microcystin-degrading bacteria express microcystin degradation activity. *Lakes and Reservoirs: Science, Policy and Management for Sustainable Use*, 16(3), 169–178. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1770.2011.00480.x>
- Song, M., Lin, X., Peng, Z., Xu, S., Jin, L., Zheng, X., & Luo, H. (2021). Materials and Methods of Biosensor Interfaces With Stability. In *Frontiers in Materials* (Vol. 7). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmats.2020.583739>
- Sun, H., Wang, H., Zhan, H., Fan, C., Liu, Z., Yan, H., & Pan, Y. (2021). Bioinformatic analyses and enzymatic properties of microcystinase. *Algal Research*, 55. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102244>