

Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas



“Papel del metabolismo de Taurina en la tolerancia de *Escherichia coli* a Cd^{2+} y en la biosíntesis de nanopartículas fluorescentes de Cd y S”

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica Ambiental y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:

Vicente María Durán Toro

Director de Tesis: Dr. José Manuel Pérez Donoso

Co-Director de Tesis: Dr. Ricardo Cabrera Paucar

Santiago-CHILE

Mayo 2015

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

Vicente María Durán Toro

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica Ambiental y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día

Director de Tesis:

Dr. José Manuel Pérez Donoso

Co-director de Tesis:

Dr. Ricardo Cabrera Paucar

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Sergio Álvarez Armijo

Dr. Marcelo Kogan Bocian

Dr. Claudio Vásquez Gusmán

AGRADECIMIENTOS

A mi madre y a mi padre por sus fuerzas, a mi hermana por su ternura, a mi hermano y su bella familia por ser ejemplo, a las amistades primeras y últimas por haber vivido mucho, a los buenos y a los malos profesores, por ser trampolín y pozo. A las oportunidades, porque creo haberlas vivido como se merecían. Al sur, por ser siempre la dirección correcta, a las ganas de cambiar, por meterme en tanto problema, entre ellos, el de escribir una tesis en bioquímica.

FINANCIAMIENTO

Esta Tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Bionanotecnología y Microbiología del Centro de Bioinformática y Biología Integrativa (CBIB) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Andrés Bello, en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile y en el laboratorio de Química Ambiental de la Sam Houston State University. Este proyecto fue financiado por FONDECYT 11110077 y ANILLO ACT 1107 y becas para estancias cortas en el extranjero del Departamento de Postgrado y Postítulo de la Universidad de Chile.

Índice de contenidos

FINANCIAMIENTO	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS	v
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	vii
ABREVIATURAS	viii
Resúmen	vii
Abstract	viii
INTRODUCCIÓN	1
Nanopartículas	2
Quantum Dots	3
Tecnología basada en Quantum Dots	5
Síntesis de Quantum Dots	6
Rutas de Asimilación del Azufre	9
HIPÓTESIS	16
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
Materiales	18
Reactivos	18
Cepas Bacterianas	19
Métodos	20
Métodos De Microbiología	20
Métodos De Biosíntesis de Quantum Dots	23
Métodos De Detección y Cuantificación	25
Métodos De Análisis de Tendencias de Cambios de Flujos Metabólicos con “Markov Chain Monte Carlo” (MCMC)	30
Métodos De Purificación de Quantum Dots	35
Métodos De Caracterización de Quantum Dots	35
RESULTADOS	38
Objetivo 1.- Evaluación de la biosíntesis de Quantum Dots de CdS durante el crecimiento exponencial de <i>E. Coli</i> en medio mínimo	38
Objetivo 2.- Efecto de Cd⁺² en el metabolismo central De <i>E. Coli</i> usando taurina como fuente de azufre	40
2.1 Efecto de taurina como fuente de azufre sobre la tolerancia de <i>E. Coli</i> a Cd ⁺²	40
2.2 Modelamiento del efecto de la síntesis de QDs de CdS sobre los flujos metabólicos usando sulfato como fuente de azufre.	43
Objetivo 3.- Evaluación de la biosíntesis de Quantum Dots de Cds en <i>E. Coli</i> utilizando taurina como fuente de azufre	55
3.1.- Evaluación del efecto de taurina como fuente de azufre en la biosíntesis de Quantum Dots de CdS en <i>E. Coli</i>	55
3.2.- Evaluación del rol del H ₂ S y COSV en la biosíntesis de Quantum Dots de CdS en cultivos de <i>E. Coli</i> utilizando taurina como fuente de azufre	57
Objetivo 4.- Purificación y caracterización de Quantum Dots de CdS sintetizados en <i>E. Coli</i> usando taurina como fuente de azufre	62
DISCUSIÓN	65

CONCLUSIÓN
REFERENCIAS

74
75

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Escala de comparación de tamaños	1
Figura 2. Imagen representativa de estructuras de NPs metálicas	3
Figura 3. Efecto del confinamiento cuántico sobre un material semiconductor	4
Figura 4. Ruta de asimilación del sulfato en <i>Escherichia coli</i>	11
Figura 5. Estructuras químicas de H ₂ S y COSV	12
Figura 6. Estructura química de la taurina	14
Figura 7. Ruta de asimilación de taurina en <i>Escherichia coli</i>	15
Figura 8. Phenotype phase plane para la determinación de consumo de sulfato en condiciones de biosíntesis de QDs	32
Figura 9. Análisis de robustez para la predicción del consumo de cadmio	33
Figura 10. Biosíntesis de NPs fluorescentes durante la fase de crecimiento exponencial de <i>E. coli</i> en medio mínimo	40
Figura 11. Efecto de la taurina sobre la toxicidad del Cd ²⁺ en cultivos de <i>E. coli</i>	41
Figura 12. Efecto del cadmio sobre la tasa de crecimiento de <i>E. coli</i> en condiciones de biosíntesis de QDs	44
Figura 13. Determinación de parámetros fisiológicos para el MCMC	45
Figura 14. Histogramas de tendencia de flujos metabólicos en condiciones de biosíntesis de QDs de CdS mediante análisis de MCMC	51
Figura 15. Efecto del cadmio en flujos metabólicos y condiciones de síntesis de QDs de CdS en <i>E. coli</i>	52
Figura 16. Biosíntesis de QDs de CdS	56
Figura 17. Detección de H ₂ S generado en cultivos de <i>E. coli</i> por el método de acetato de plomo	57
Figura 18. Generación de compuestos organosulfurados volátiles (COSV) en condiciones de biosíntesis de QDs de CdS en <i>E. coli</i>	59
Figura 19. Análisis de headspace de cultivos de <i>E. coli</i> crecidos en medio LB en condiciones de biosíntesis de QDs de CdS	61
Figura 20. Caracterización espectroscópica y determinación de tamaño de NPs biosintetizadas en cultivos de <i>E. coli</i> utilizando taurina como fuente de S	63
Figura 21. Microscopía confocal multiespectral	64
Figura 22. Biosíntesis de QDs de CdS utilizando taurina como fuentes de S	73

Abreviaturas.

3'- fosfoadenosina-5'-fosfosulfato glutatión	PAPS
Adenosina fosfo-sulfato	APS
ATP-binding cassette	ABC
Compuestos organo-sulfurados volatiles	COSV
Concentración inhibitoria mínima	CIM
Di-metil sulfuro	DMS
Di-metil di-sulfuro	DMDS
Densidad óptica	DO ₆₀₀
Markov Chain Monte Carlo	MCMC
Metanotiol	MeSH
Nanopartículas	NPs
Partes por billón	PPB
Óxido de tri-octil fosfina	TOPO
Quantum Dots	QDs
Transmisión de energía de resonancia Föster	FRET
Ultra violeta	UV
Unidades formadoras de colonia	UFC

Resumen.

La búsqueda de nuevos métodos de síntesis de *quantum dots* que permitan generar nanopartículas con nuevas o mejores propiedades o métodos de síntesis más eficientes a los utilizados actualmente, representa un desafío en materia de investigación. En los últimos años, la síntesis de este tipo de nanopartículas a través del uso de microorganismos ha tomado gran fuerza, lo que se debe principalmente a su alta escalabilidad, a sus bajos costos de producción y a la obtención de nanopartículas con novedosas propiedades. Uno de los modelos más estudiados, es la síntesis de *quantum dots* de CdS utilizando *Escherichia coli*. No obstante, poco se sabe respecto a los procesos metabólicos implicados en la generación de estos nanocristales. Uno de los aspectos claves en estudio, es el rol del metabolismo del azufre en la generación de compuestos sulfurados como componentes de las nanopartículas, siendo la cisteína y el Na₂S las fuentes de S más estudiadas. Basados en esto, el uso de fuentes de azufre alternativas abre la puerta a procesos metabólicos distintos, lo que supone la generación de compuestos sulfurados diferentes o una generación más eficiente de los mismos compuestos generados a partir de cisteína o Na₂S durante la síntesis de *quantum dots*. Finalmente, en los últimos años, se ha relacionado el uso de taurina, una fuente no convencional de S, con la respuesta al estrés por cadmio en cultivos de *E. coli* (Helbig y cols. 2008).

En este contexto, la presente Tesis se centró en el estudio del papel del metabolismo de la taurina en la tolerancia de *E. coli* a Cd²⁺ y en la biosíntesis de nanopartículas fluorescentes de CdS. Para ello, se evaluó la capacidad de *E. coli* de sintetizar *quantum dots* al ser expuesta a una sal de cadmio y utilizando taurina como única fuente de S. Bajo estas condiciones, se analizó la respuesta de la bacteria ante el metal mediante curvas de crecimiento y distribución de flujos metabólicos. Se identificó la generación de compuestos sulfurados (H₂S y distintos COSVs) y finalmente se purificó y caracterizó las nanopartículas. Los resultados permitieron concluir que *E. coli* es capaz de sintetizar nanopartículas fluorescentes, las que en tamaño y características espectroscópicas se relacionan con *quantum dots* de CdS. La síntesis aparentemente, al utilizar taurina, no depende de H₂S, otorgándole un rol no descrito en literatura a los COSVs, específicamente al MeSH, durante la síntesis de *quantum dots* de CdS y en la respuesta de *E. coli* a cadmio.

Abstract.

The search for novel or more efficient methods for quantum dots synthesis allowing the generation of nanoparticles with new or better properties, represent a great challenge in nanotechnology research. In the last years, the synthesis of quantum dots by microorganisms has generated big expectations, mainly due of the high scalability, low production costs and the generation of nanoparticles with novel properties.

The biosynthesis of CdS quantum dots using *Escherichia coli* is one of the most studied models. Nevertheless, little is known about the metabolic process implicated in nanocrystals generation. A relevant aspect which is currently under study, is the role of S metabolism in the generation of sulfured compounds as key components of nanoparticles structure, being cysteine and Na₂S the most studied S sources. Based on this, the use of non-conventional S sources leads to unknown metabolic processes, which implicates the generation of different sulfured compounds or more efficient process for the generation of the same quantum dots production using cysteine or Na₂S. Helbig et al. 2008 related a non-conventional S source such as taurine with the response of *E. coli* to cadmium stress.

In this context, the present thesis focuses on the role of taurine metabolism in the tolerance of *E. coli* to Cd²⁺ and the role of taurine metabolism in the biosynthesis of fluorescent CdS nanoparticles. In order to achieve this, the synthesis of quantum dots by *E. coli* cultures exposed to a cadmium salt and using taurine as the main sulfur source was evaluated. Under the same conditions, the bacterial response to the metal measured through growth curves and metabolic flux distributions was analyzed. Finally, the identification of sulfur compounds (H₂S and different COSVs) and the purification with the respective characterization of produced nanoparticles was carried out. The results obtained allow to conclude that *E. coli* is able to synthesize fluorescent nanoparticles, related in size and spectroscopic characteristic to CdS quantum dots. Apparently, the synthesis using taurine, does not depend on H₂S generation by a non-described role of COSVs, specifically MeSH, in the synthesis of CdS quantum dots and also in the *E. coli* response to cadmium.

Introducción.

La nanotecnología es un área de las ciencias que estudia los fenómenos físicos, químicos y biológicos asociados con la escala nanométrica, una billonésima de metro (10^{-9} m = 1 nm) [1]. A esta escala, la materia adquiere una serie de propiedades de valioso interés para el desarrollo de nuevo conocimiento científico, así como para la industria tecnológica. La generación de nanopartículas (NPs), entre ellas los *Quantum Dots* (QDs), es una de las aplicaciones más recientes. En los últimos años, se han desarrollado diferentes métodos de síntesis de NPs mediante procesos químicos, biomiméticos y en algunos casos, utilizando organismos vivos. Cada uno de estos métodos permite un control diferente de las propiedades ópticas, químicas y biológicas de las partículas [2,3]. Específicamente, la biosíntesis resalta como una opción eco-amigable, de bajo costo de producción y alta biocompatibilidad, por lo que el uso de microorganismos y el entendimiento de los mecanismos celulares asociados al control del proceso de biosíntesis de QDs han cobrado importancia en los últimos años [3,4].

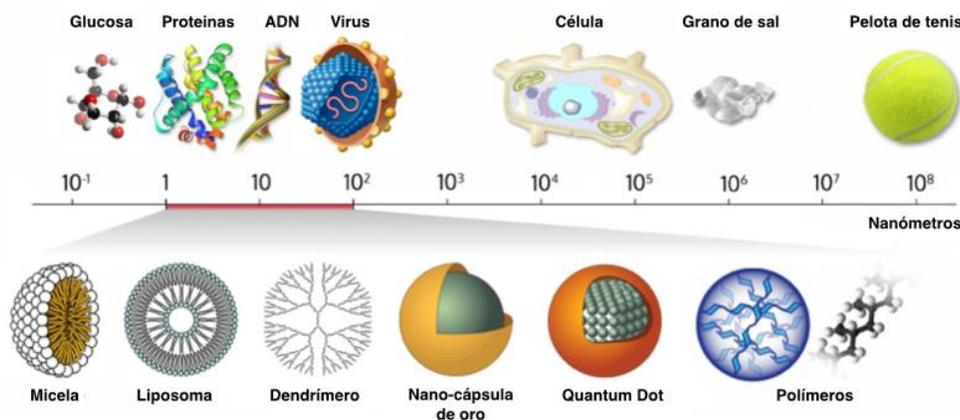


Figura 1. Escala de comparación de tamaños. Las NPs se ubican entre los 1 y los 100 nm, independiente de su naturaleza orgánica como micelas, liposomas, dendrímeros y polímeros o sean estas de naturaleza inorgánica como nano-cápsulas de oro o quantum dots. Imagen modificada de wichlab.com/research, Dr. Peter R. Wich, 2014.

Nanopartículas.

Se denomina nanopartícula a cualquier estructura material que posea al menos una dimensión en la escala nanométrica [1,2]. En general, el tamaño de una NP se encuentra en el rango de 1 a 100 nm, por lo que a nivel dimensional hablamos de estructuras miles de veces más pequeñas que una célula, comparables con proteínas, el ADN o un virus (Figura 1) [1,5]. Producto de su reducido tamaño, las NPs presentan propiedades físicas únicas de valioso interés [1]. El cadmio sulfuro (CdS) por ejemplo, cambia su primera energía de transición desde 2,5 eV en su estado sólido como cristal a 4,5 eV como NP [2]. Esto es típico de NPs de naturaleza metálica como el CdS, pudiendo presentar cambios en otras propiedades físicas y químicas (características ópticas, magnéticas o catalíticas, entre otras).

Las propiedades de una NP metálica pueden ser modificadas dependiendo de su estructura y composición. Si la NP está compuesta por dos metales, pueden subdividirse en tres tipos de estructuras generales: (i) aleaciones, con repeticiones de los metales a lo largo del cristal en forma azarosa, (ii) núcleo-cobertura, donde el metal del centro difiere del metal alojado en la periferia o (iii) hemisferios-gemelos, donde dos hemisferios metálicos distintos se encuentran unidos [1]. No obstante, nuevos antecedentes han demostrado la formación de estructuras más complejas donde la NP presenta fenómenos de recubrimiento o “capping” por moléculas de naturaleza orgánica, cambiando su solubilidad y/o toxicidad (Figura 2) [1,6].

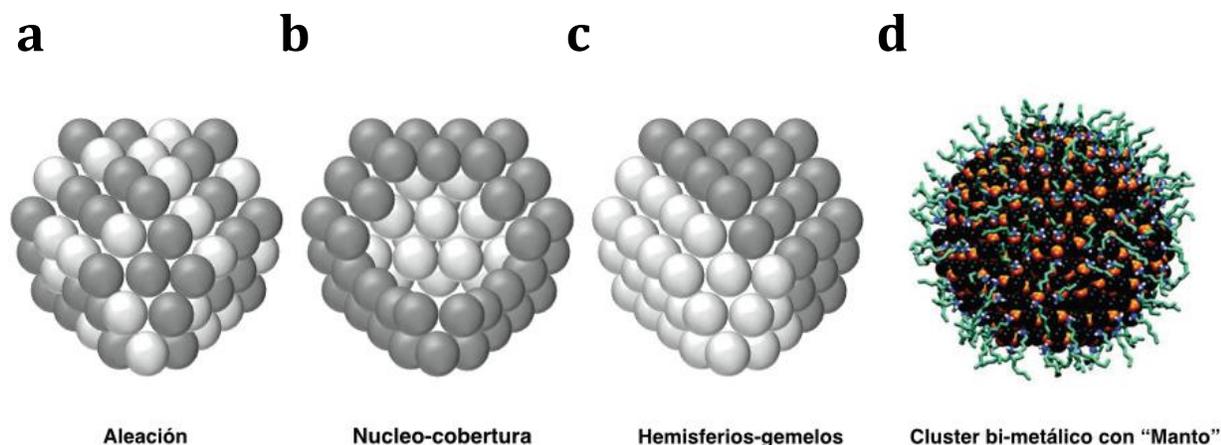


Figura 2. Imagen representativa de estructuras de NPs metálicas. **a**, NPs de estructura de tipo aleación, donde ambos metales se distribuyen en una red cristalina en forma azarosa. **b**, estructura de tipo núcleo y cobertura, un metal se dispone en el centro del arreglo cristalino mientras el segundo lo recubre. **c**, estructura tipo hemisferios gemelos, existe una disposición simétrica respecto a los hemisferios en la NP conformados solo por cada uno de los metales. **d**, cluster bi-metálico con manto, cualquiera de las tres estructuras antes mencionadas (a, b, c) constituyen un cluster bi-metálico el que puede ser recubierto por un agente de "capping" de naturaleza orgánica formando una superficie o manto sobre la NP, lo que permite modificar sus propiedades físicas, entre ellas solubilidad, fluorescencia, toxicidad, entre otros. Este tipo de estructura es típica para NPs semiconductoras fluorescentes o QDs. Imagen modificada de Horikoshi y Serpone (2013) y de Mello Donegá y cols. (2011).

Quantum Dots.

Un QDs es una NP, un nanocrystal semiconductor fluorescente entre 2 a 20 nm [2,7]. Los QDs pueden cosechar fotones en un amplio rango de longitudes de onda (λ) y emitir fluorescencia a λ específicas. A medida que el tamaño de la NP aumenta se produce un corrimiento en la λ de emisión hacia el rojo, lo que implica que QDs de menor tamaño emiten luz verde y los de mayor tamaño luz roja [6,7].

En un material semiconductor se encuentra una serie de niveles energéticos totalmente ocupados por electrones en estados de mínima energía, lo que se denomina banda de valencia. Estos electrones al ser excitados saltan a un nivel energético mayor, dejando un hueco en la banda de valencia y pasando a formar parte de una serie de niveles energéticos desocupados o banda de conducción. Este estado es altamente inestable por lo que el nivel energético del electron decae, liberando energía hasta alcanzar el hueco desocupado en la capa de valencia. Ahora bien, cuando existe un confinamiento de estos materiales a la escala nanométrica, la distancia entre la banda de valencia y la banda de

conducción es mínima, producto de la limitación espacial de los electrones, lo que favorece el decaimiento energético haciendo más eficiente el proceso y permitiendo sintonizar, de acuerdo a la distancia entre ambas bandas, el color o λ de emisión de la energía disipada [1,6]. Como se observa en la Figura 3, a medida que un QD va creciendo en tamaño, la distancia entre sus bandas de conducción y de valencia disminuye y al excitar dicha NP mayor es la λ de emisión durante el decaimiento energético, lo que explica el cambio en el color de emisión de la NP [6].

Al igual que en otras NPs, la estructura y composición de un QD es fundamental para entender sus propiedades. En la literatura se describen distintos tipos de arreglos, pero generalmente se reconocen dos partes: el núcleo y el manto (Figura 2). El núcleo puede estar constituido por dos metales o metaloides comúnmente pertenecientes a los grupos III-V y II-VI A, que constituyen el “cluster” bi-metálico. Entre los elementos más comunes que componen el núcleo se encuentran CdS, PbS, CdSe, CdTe, InP y AsGa, entre otros [2,7]. Por otro lado, el manto está constituido por agentes estabilizantes que recubren el núcleo,

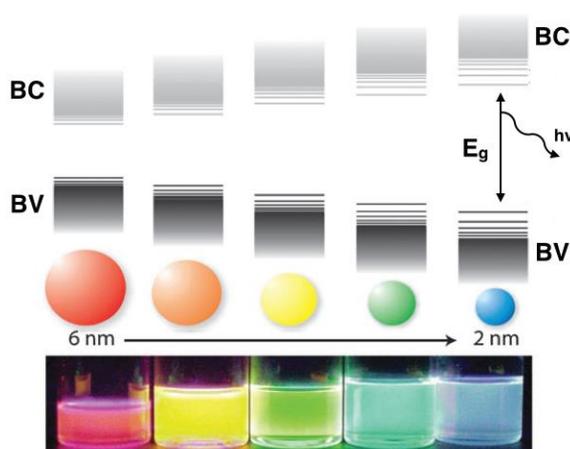


Figura 3. Efecto del confinamiento cuántico sobre un material semiconductor. Un electrón de la banda de valencia (BV) salta desde su estado de mínima energía hasta un estado energético inestable en la banda de conducción (BC) producto de una estimulación externa. Como el estado energético es inestable retorna hasta su estado basal liberando la energía sobrante, que en el caso de los QDs es disipada en forma de emisión de fluorescencia. Entre más pequeño el QD, mayor es la brecha energética (E_g) entre la BV y la BC, por lo que mayor será la energía a disipar y menor la longitud de onda asociada, obteniéndose colores cercanos al azul. Si el QD crece, E_g disminuye así como la energía liberada, aumentando la longitud de onda de emisión y obteniendo colores hacia el rojo. Imagen modificada de de Mello Donegá y cols. (2011).

muchas veces funcionando como centros de nucleación para la formación de la NP [6,7]. La superficie de las NPs resulta de sumo interés, pues su composición puede alterar su fluorescencia y solubilidad, lo que es un parámetro a considerar en los diferentes tipos de síntesis de NPs y su eventual aplicación en biotecnología. Entre los agentes de “capping” más utilizados destacan el glutatión (GSH), cisteína y el óxido de tri-octil fosfina (TOPO), los cuales cuentan con un grupo funcional que puede unirse fuertemente al núcleo metálico [2,7].

Tecnología basada en quantum dots.

Los QDs presentan una serie de aplicaciones, ya sea por su capacidad como semiconductor en dispositivos opto-electrónicos, como fluoróforos en diversas técnicas de imagenología o como sensores/sonda de cuantificación para diferentes analitos [8-11]. Como semiconductor destaca su uso en la sensibilización de foto-electrodos de celdas solares [8]. En los últimos años, se han publicado una serie de artículos científicos demostrando la alta eficiencia energética lograda al utilizar QDs para sensibilizar paneles solares [8]. Básicamente, los QDs son depositados sobre un material semiconductor y dada la alta eficiencia para cosechar fotones en un amplio rango de longitudes de ondas en el espectro de radiación UV, son excelentes para captar la energía proveniente de la luz del sol [7,8]. Entre los distintos tipos de QDs utilizados para esta función destacan los de CdS [8].

Por otra parte, al ser un material fluorescente se han desarrollado distintas investigaciones asociadas a biología como herramientas de imagenología de fluorescencia. En este sentido, los QDs exhiben distintas ventajas por sobre fluoróforos orgánicos: i) su tamaño variable permite abarcar un amplio rango de emisión de fluorescencia, por lo que se puede analizar varios parámetros en una misma muestra a la vez y ii) presentan una mejor foto-estabilidad, lo que permite el análisis repetido de muestras sin un efecto de foto-degradación [9,12]. Estas características hacen de los QDs una herramienta poderosa para ser usada en marcas fluorescentes, resaltando el uso de QDs de CdS en transmisión de energía de resonancia Föster (FRET) o “tracking” molecular. Se ha visto que imágenes de

FRET en células vivas son más rápidas, brillantes y permiten una mejor cuantificación de la molécula marcada [12,13].

Finalmente, el uso de QDs como sondas de cuantificación está basado en el fenómeno de apagamiento de su fluorescencia, lo que permite generar distintos sistemas de cuantificación [10,14]. Entre los ejemplos más recientes, nuestro grupo de investigación desarrolló un protocolo de cuantificación de Cu^{2+} en distintas matrices (desde agua de mar a medio de cultivo para bacterias), alcanzando a detectar concentraciones nM del metal. De similar manera se han desarrollado sistemas indirectos de cuantificación de glucosa, antibióticos, hormonas, etc [14]. De este modo, los QDs y en particular, QDs de CdS constituyen una de las NPs con más aplicaciones descritas a la fecha, por lo que el estudio de los distintos mecanismos de síntesis se ha vuelto de vital interés para los científicos y la industria.

Síntesis de quantum dots.

A la fecha se han publicado diferentes tipos de síntesis de QDs, los que se pueden agrupar en dos principios. En el primero, denominado “Top-down”, en que el material es sometido a una fuerza y fragmentado hasta una escala nanométrica [1]. El segundo se conoce como “Bottom-up” y consiste en la generación de NPs a partir de átomos en estados gaseosos, líquidos o sólidos, los que son sometidos a procesos de modificaciones químicas o físicas. Entre las más estudiadas, se encuentra la síntesis química de fase líquida, cuyo protocolo básico desarrollado por Murray y cols. (1993), utiliza compuestos organometálicos como precursores y el uso de agentes estabilizantes como el TOPO [15]. El problema de este método es que requiere de altas temperaturas (350 °C) y el uso de alquilos metálicos altamente tóxicos lo que deriva en la generación de QDs con una baja bio-compatibilidad [16]. Defus y cols. (2003) estudiaron la citotoxicidad asociada a QDs de CdSe sintetizados mediante este tipo de metodologías en líneas celulares de hepatocitos y determinaron que existía un grado de toxicidad relevante que dependía de la cobertura de la NP [16]. Con el propósito de disminuir estos inconvenientes, durante los últimos años se ha propuesto el desarrollo de protocolos de síntesis biomiméticas. En términos simples,

estos métodos buscan emular condiciones fisiológicas de síntesis utilizando moléculas que desempeñen un rol conocido dentro de organismos vivos como por ejemplo agentes antioxidantes (GSH, cisteína u otros tioles), intentando así subsanar el efecto nocivo de la naturaleza metálica de estas NPs. Pérez-Donoso y cols. (2012), desarrollaron un método basado en GSH (abundante tiol intracelular) como agente capaz de reducir el Te^{+4} a Te^{-2} , a pH cercano al fisiológico, lo que permitió formar QDs de CdTe recubiertos con GSH. De esta manera se logró eliminar el uso de reductores fuertes como el NaBH_4 , disminuir considerablemente la temperatura de síntesis ($90\text{ }^\circ\text{C}$), mantener un alto rendimiento de producción y una alta biocompatibilidad [17,18].

En los últimos años, este tipo de protocolos (biomiméticos) han abierto la puerta a metodologías basadas en el uso de microorganismos como fábricas de QDs. Dadas las condiciones fisiológicas de síntesis conseguidas *in vitro*, la posibilidad de llevar a cabo la síntesis de QDs al interior de una célula se ha vuelto una realidad. Como ventajas de este tipo de síntesis resaltan su fácil escalabilidad, la disminución en los costos de producción, la simplicidad de la técnica y la posibilidad de generar NPs con mayor grado de biocompatibilidad [3,4], por lo que sus proyecciones a nivel industrial resultan sumamente interesantes.

Entre los modelos de biosíntesis estudiados a la fecha, la mayoría de los artículos se refieren al uso de bacterias como fábricas de QDs de CdS. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Rhodospseudomonas palustris* etc. son algunos de los modelos más estudiados [19-22]. En la mayoría de los casos, el cultivo es expuesto a una sal de CdCl_2 en presencia de una fuente de azufre como cisteína o Na_2S ; no obstante, los modelos presentan diferencias en el mecanismo y lugar de síntesis. Mia y cols. (2010) propusieron un modelo de síntesis intracelular de CdS en *E. coli*, donde la fuente de S^{-2} para la NP era administrada directamente en forma de Na_2S [19]. Por otro lado, en *R. palustris* Bai y cols. (2008) sugirieron una síntesis extracelular de QDs de CdS, donde la fuente de S^{-2} dependía de la generación de H_2S a partir de la actividad enzimática cisteína desulfhidrasa [22]. Por lo que un punto interesante a considerar a la hora de escoger un modelo de estudio para síntesis de QDs de CdS en bacterias, es el grado de injerencia sobre los procesos que están ocurriendo al interior de la célula y que podrían estar regulando las propiedades de las NP (tamaño, estructura, composición, fluorescencia, etc). En éste sentido, *E. coli* presenta una

serie de ventajas pues es uno de los microorganismos genéticamente más estudiados, lo que permitiría entender y manipular los procesos moleculares y metabólicos que estén ocurriendo durante la biosíntesis.

Sweeney y cols. (2004) demostraron la síntesis de cristales de CdS de estructura definida tipo "wurdzite", utilizando un cultivo de *E. coli* en distintas fases de crecimiento. Las células fueron colectadas y expuestas al metal en presencia de Na₂S como fuente de S²⁻. Interesantemente, luego de 2 h de incubación con el metal se logró generar NPs con alto grado de monodispersión y de un tamaño promedio de 4 nm [23]. Los autores discuten el amplio grado de control sobre el proceso, en particular la relación de la eficiencia de síntesis y la fase de crecimiento del cultivo, encontrando en fases de crecimiento estacionaria un aumento en la síntesis de QDs. Este comportamiento lo asocian a la acumulación de tioles u otras moléculas que pudiesen ser utilizadas como agentes de "capping" y que potencialmente pudiesen manipularse en virtud de regular el tipo de QD que se desee producir. Mi y col. (2010) adoptaron un protocolo similar, basado en CdCl₂ y Na₂S, pero en este caso sobre-expresando un péptido de bajo peso molecular, denominado CDS 7 (N-GDVHHHGRHGAEHADI-C), el que había sido comunicado por su alto grado de afinidad a CdS [19]. Este péptido poseía la capacidad de estabilizar sistemas cristalinos durante la síntesis química de QDs, por lo que representaba un candidato ideal para el control del proceso de nucleación. Interesantemente, se obtuvieron cristales fluorescentes de tamaño cercano a 6 nm, de estructura cúbica, con un recubrimiento orgánico correspondiente al péptido sobre-expresado. Además, se determinó la importancia de la fase de crecimiento en el rendimiento de la reacción, siendo la fase estacionaria la idónea para el proceso de formación de las NPs [19]. Esto resulta controversial pues si se desea entender los mecanismos celulares como regulación de vías metabólicas asociados a la síntesis de QDs lo óptimo es estudiarlo durante la fase de crecimiento exponencial, por lo que nuevos modelos de síntesis que permitan el crecimiento del cultivo en paralelo con la síntesis de QDs serán sumamente valiosos.

En el caso de la síntesis de QDs de CdS, existen distintas maneras de abordar el problema. En primer lugar ya que la mayoría de los modelos en *E. coli* plantean un mecanismo de síntesis intracelular, la capacidad de la célula de incorporar el metal juega

un papel fundamental. Muchos de los procesos metabólicos implicados en la tolerancia que poseen las bacterias están relacionados con bombas de flujo, regulando así la entrada y salida del metal, lo que supondría un nivel de control sobre la cantidad de cadmio disponible para llevar a cabo la síntesis de NPs. Nuestro grupo ha estudiado el rol de distintos transportadores de cadmio durante el proceso de biosíntesis de QDs de CdS en *E. coli*, encontrando una relación entre el contenido celular del metal y el color de la NP generada [24]. Otro factor interesante asociado a la tolerancia a metales son las defensas antioxidantes que poseen las bacterias. Por ejemplo, *E. coli* posee una serie de moléculas antioxidantes que regulan el potencial redox al interior de la célula, siendo la principal molécula el GSH. El GSH ha sido ampliamente descrito como agente reductor y estabilizante en la síntesis de QDs, por lo que en el 2012, nuestro grupo logró sobre-expresar los genes de biosíntesis de GSH en *E. coli* y favorecer la síntesis de QDs recubiertos con GSH [25].

Finalmente, uno de los factores más importantes pero poco estudiados en la síntesis de QDs de CdS, es la importancia del metabolismo del azufre en la disponibilidad de S^{-2} para la formación de la NP. Como se mencionó anteriormente en *E. coli* se ha demostrado el uso de Na_2S con este propósito, pero las bacterias por sí solas generan S^{-2} en una serie de procesos enzimáticos de reducción del azufre [19, 26]. Así, según la fuente de azufre utilizada variaría la generación de especies de azufre reducidas (S^{-2}), las que por su alta afinidad podrían interactuar con el metal y pasar a formar parte de la NP. De esta manera, el estudio del metabolismo del azufre en la síntesis de QDs de CdS resulta de suma importancia para entender que intermediario de azufre reducido puede generar la bacteria durante la biosíntesis y cuales de estos desempeñarían un rol preponderante.

Rutas de asimilación del azufre.

E. coli puede utilizar una serie de moléculas como fuentes de azufre. La mayoría de ellas derivan en la generación de H_2S como fuente de S^{-2} , el que es incorporado posteriormente como biomasa durante la formación de aminoácidos [26]. Este proceso es llevado a cabo a través de la reducción enzimática de átomos de azufre desde fuentes oxidadas como sulfato (SO_4), sulfito (SO_3) y tiosulfato (S_2O_3), entre otras. No obstante, también es factible generar

H₂S desde moléculas ya reducidas como cisteína [27,28]. Generalmente, este tipo de metabolismo ha sido asociado a la falta de fuentes de carbono o a procesos de reciclaje interno que han desarrollado las bacterias para aprovechar al máximo los nutrientes disponibles, por lo que la producción de H₂S es un evento colateral. Una de las vías canónicas de generación de H₂S en *E. coli* es la reducción del sulfato (SO₄²⁻) (Figura 4). En primera instancia, el SO₄²⁻ entra a la célula a través de un transportador tipo ABC (“ATP-binding cassette”), por lo que por cada molécula de sulfato que ingresa a la célula una molécula de ATP debe ser hidrolizada en ADP y fosfato inorgánico (Pi) [26]. Una vez adentro, el sulfato es sustrato de la enzima ATP sulfurilasa la que genera el intermediario adenosina fosfosulfato o APS. La generación de APS implica la hidrólisis de otra molécula de ATP y la consecuente generación de pirofosfato el que es reciclado posteriormente como Pi [26]. El APS recién formado es fosforilado a partir de otra molécula de ATP, para generar 3'- fosfoadenosina-5'-fosfosulfato o PAPS a través de la enzima APS-kinasa [26]. A continuación, la enzima PAPS reductasa genera sulfito y 3'-fosfoadenosina-5'-fosfato (PAP) a partir de PAPS [26,29]. Finalmente, PAP es reciclado como AMP en la síntesis de ATP o ADP, mientras que el sulfito generado a partir de este mecanismo es transformado a H₂S en presencia de NADPH por la enzima sulfito reductasa [26,30].

Por otra parte, la cisteína también es utilizada como fuente de H₂S. Para ello, la bacteria elimina el azufre del esqueleto carbonado, el que es incorporado como piruvato al ciclo de Krebs [27,28]. Awano y cols. (2003 y 2005) demostraron en *E. coli* la actividad L-cisteína desulfhidrasa de diferentes enzimas, todas capaces de generar piruvato, NH₃ y H₂S como productos de reacción [27,28]. Así, en determinadas circunstancias *E. coli* posee más de una ruta para la generación de H₂S que podría estar implicada en la síntesis de QDs de CdS.

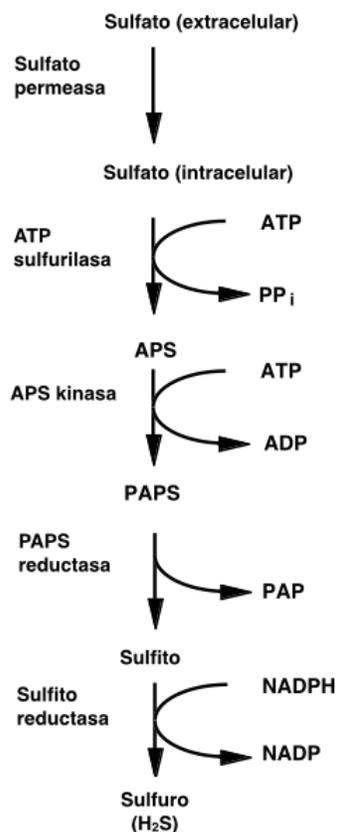


Figura 4. Ruta de asimilación del sulfato en *Escherichia coli*. Secuencia de reacciones enzimáticas de reducción del sulfato, desde S^{+4} hasta S^{-2} . PP_i , pirofosfato, APS, adenosina fosfo sulfato, PAPS, 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato, PAP, 3'-fosfoadenosina-5'-fosfato. El sulfuro generado es incorporado al proceso de biosíntesis de cisteína, donde finalmente pasará a formar parte de proteínas o tioles de bajo peso molecular. Imagen modificada de Sekowska y cols. (2000).

Si bien el H_2S es la fuente de S^{-2} más estudiada a la fecha en *E. coli*, se ha demostrado la generación de otras formas reducidas del azufre que pudiesen desempeñar un rol interesante en la síntesis de NPs de CdS. Dichos compuestos se denominan compuestos organo-sulfurados volátiles o COSV y entre ellos se encuentran el metano-tiol o MeSH, el di-metil sulfuro o DMS y el di-metil di-sulfuro o DMDS (Figura 5) [31]. Essa y cols. (2006), publicaron la precipitación de CdS por medio de la liberación de gases sulfurados de un cultivo de *K. pneumoniae* [32]. En dicho trabajo se analizó mediante cromatografía de gases (GC) acoplada a espectrometría de masa (MS) el cabeza espacio o “*headspace*” de los cultivos, encontrando DMDS como el potencial agente de precipitación sulfurado.

Básicamente, los gases que emanaban del cultivo eran bombeados a una solución de cadmio la que luego de 2 h de tratamiento presentó un precipitado amarillo característico de CdS “bulk”. Dicho precipitado fue analizado mediante dispersión de energía de rayos X (EDX), lo que permitió determinar la presencia de Cd, S y una cubierta de carbono, demostrando que el metal podría interactuar con el “headspace” bacteriano y formar macro-cristales de CdS a partir de DMDS [32]. A la fecha, nuestro grupo de investigación en colaboración con el Profesor Thomas. G. Chasteen, del Departamento de Química de la Sam Houston State University ha estudiado la generación de distintos COSV en cultivos de *E. coli* utilizando Luria-Bertani (LB) como medio de cultivo [33].

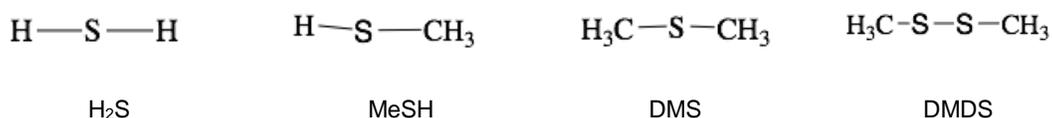


Figura 5. Estructuras químicas de H₂S y COSV. De izquierda a derecha, sulfuro de hidrógeno, H₂S, metanotiol, MeSH, di-metil sulfuro, DMS y di-metil di-sulfuro, DMDS.

Tanto la generación de H₂S como la de COSV resultan sumamente interesantes para el control del proceso de biosíntesis de QD, por lo que un punto a considerar es qué ocurre con el metabolismo del azufre en condiciones de estrés por cadmio durante la biosíntesis de NPs. A la fecha, el cadmio no posee función biológica conocida, por esto es un elemento de gran preocupación pues es un contaminante medioambiental de alta génotoxicidad, cuya presencia en el ambiente está asociada a procesos industriales, entre ellos la explotación minera [34]. Helbig y cols. (2008) analizaron la expresión diferencial de genes en cultivos de *E. coli* expuestos a cadmio a través de estudios de transcriptómica global y qRT-PCR. Interesantemente, encontraron un aumento en la expresión de las vías del metabolismo del azufre, principalmente en la ruta del uso de taurina como fuente de éste, lo que no había sido comunicado a la fecha [35].

La taurina es un derivado del aminoácido cisteína, el cual carece del grupo tiol (-SH) y su grupo carboxilo terminal es reemplazado por un grupo sulfónico (SO₃⁻), por lo que es

considerado un alcano sulfonato (Figura 6). La taurina se encuentra en forma ubicua en el ambiente pues su síntesis está asociada a organismos pluricelulares como mamíferos, algas y crustáceos, los que pueden liberarla al medio externo [36]. Además, la taurina es utilizada como osmolito por diferentes bacterias frente a estrés osmótico, presentando mecanismos de transporte específicos para su incorporación al interior de la célula [36, 37]. Se han propuesto diferentes modelos para la asimilación de taurina en bacterias. En particular, *E. coli* puede utilizar taurina como fuente de azufre en condiciones de ausencia de otras fuentes como cisteína o sulfato, ingresando mediante el transportador TauABC, que requiere ATP para su funcionamiento [36,38]. Este transportador está compuesto por 3 proteínas donde TauA corresponde a una proteína de unión a la membrana interna, TauB corresponde a una ATPasa, y TauC a una permeasa [38]. Además, existen otras formas en que la taurina entra a *E. coli*, como los transportadores ProU y ProP del sistema de transporte del aminoácido prolina, los que en condiciones de alta osmolaridad permiten incorporar taurina [37]. Una vez en el citoplasma, la taurina es sustrato para la enzima Taurina di-oxigenasa (TauD), la que consume equimolarmente taurina, O₂ y α -cetoglutarato, generando un amino acetaldehído, sulfito, succinato y CO₂ como productos de la reacción (Figura 7) [36, 39]. Finalmente, el sulfito generado es transformado a H₂S e incorporado a la ruta de síntesis de aminoácidos. Interesantemente, en cultivos de *E. coli* en presencia de taurina como fuente de azufre no se ha logrado pesquisar la generación de H₂S [40]. Sin bien existen pocos estudios al respecto, es posible pensar que los niveles generados son muy pequeños o que el H₂S es consumido rápidamente. Por lo que se puede suponer que durante el proceso de biosíntesis de QDs de CdS otras especies de azufre reducido, como los COSV, podrían estar participando del proceso.

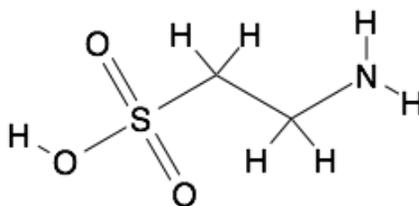


Figura 6. Estructura química de la taurina. En la estructura se visualiza la falta del grupo carboxilo terminal por la sustitución de un grupo sulfónico o SO_3^- , el que puede ser utilizado por *E. coli* durante la asimilación de azufre desde taurina.

A la fecha no se ha estudiado la generación de COSV a partir de taurina como fuente de azufre en *E. coli*, por tanto se desconocen las especies que se pudiesen estar generando y de existir dicho tipo de metabolismo se desconoce el efecto que el cadmio tendría sobre estas y otras rutas metabólicas.

Una manera de poder estudiar efectos sobre el metabolismo bacteriano producto de la exposición a cadmio, es el análisis de distribución de flujos metabólicos. Dicho método, corresponde a un estudio *in silico* capaz de modelar la velocidad de las reacciones que ocurren al interior de una célula [41]. En el caso de *E. coli*, se utiliza un modelo de la red metabólica de la cepa *E. coli* MG1655, el que es representado matemáticamente mediante una matriz estequiométrica [41]. Para hacer más preciso los análisis de modelación, se utilizan parámetros experimentales, como la tasa de crecimiento, el consumo de glucosa y la generación de acetato. En este caso, el modelo debiese representar estequiométricamente como el cadmio interactúa o reacciona con compuestos de las distintas vías metabólicas y por lo tanto sería necesario estimar o predecir una velocidad de incorporación del metal para así acotar las simulaciones [41]. Este tipo de estudios modelan el aumento o descenso de flujos metabólicos de interés, como por ejemplo, metabolismos asociados al consumo de fuentes de azufre y respuestas generales a nivel de metabolismo central en *E. coli*, pudiendo entender el efecto sobre el metabolismo del azufre en condiciones de síntesis de QDs de CdS.

Finalmente, el aumento en la expresión del operón *tauABCD* inducido por cadmio en cultivos de *E. coli* implica una respuesta específica al estrés producido por el metal. Posiblemente el uso de taurina como fuente de azufre durante el estrés por cadmio resulta

más eficiente frente a otras rutas tradicionales. Esto resulta interesante pues cuando Helbig y cols. (2008) realizaron estudios de la expresión del operón *tauABCD* inducido por cadmio utilizando cepas que no producen GSH, sus resultados mostraron un aumento de 10 veces en la expresión de los genes relacionados con taurina respecto a la vía de asimilación del sulfato. Esto sugeriría la preferencia de *E. coli* por taurina como fuente de azufre frente a un alto grado de estrés producido por el metal.

Esta respuesta específica podría verse reflejada en una mejor capacidad del cultivo de lidiar con el metal y posiblemente en la mejora de parámetros de síntesis de QDs de CdS, producto de un aumento en la generación de H₂S o COSV implicados en el proceso. De este modo, el estudio de taurina como fuente de azufre durante el estrés producido por cadmio en la síntesis de QDs de CdS en cultivos de *E. coli* permitiría entender los mecanismos de tolerancia a iones de metales pesados asociados a fuentes de azufre específicos, así como la importancia del metabolismo del azufre en la síntesis de NPs sulfuradas, lo que ha la fecha no ha sido considerado.

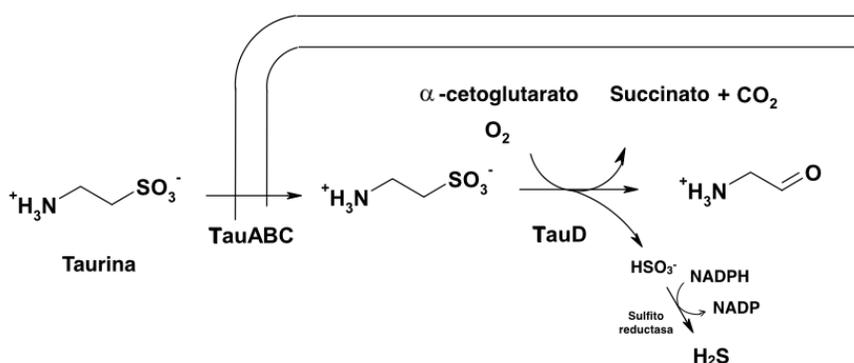


Figura 7. Ruta de asimilación de taurina en *E. coli*. El transporte de taurina a través de Tau ABC, requiere del gasto de una molécula de ATP; una vez a dentro de la célula, el azufre presente en la molécula es escindido del esqueleto carbonatado en forma de sulfato (HSO_3^-), el que posteriormente será transformado a H_2S por la sulfito reductasa. Imagen modificada de Cook y cols. (2006).

Hipótesis

El uso de taurina como fuente de azufre durante el estrés por cadmio favorece la síntesis de “quantum dots” de CdS en cultivos de *Escherichia coli*.

Objetivo General

Estudiar el metabolismo de taurina como fuente de azufre durante el estrés por cadmio en la síntesis de quantum dots de CdS en cultivos de *Escherichia coli*.

Objetivos Específicos

1.- Evaluar la biosíntesis de “quantum dots” de CdS durante el crecimiento exponencial de cultivos de *E. coli* en medio mínimo.

2.- Determinar el efecto del cadmio en el metabolismo central de *E. coli* usando taurina como única fuente de azufre.

2.1.- Evaluar el efecto de taurina como fuente de azufre sobre la tolerancia de *E. coli* a cadmio.

2.2.- Determinar cambios en los flujos metabólicos de *E. coli* mediados por cadmio usando taurina como fuente de azufre.

3.- Evaluar la biosíntesis de “quantum dots” de CdS en cultivos de *E. coli* utilizando taurina como fuente de azufre.

3.1.- Evaluar el efecto de taurina como fuente de azufre en la biosíntesis de “quantum dots” de CdS en cultivos de *E. coli*.

3.2.- Evaluar el rol del H₂S y COSV en la biosíntesis de “quantum dots” de CdS en cultivos de *E. coli* utilizando taurina como fuente de azufre.

4.- Purificar y caracterizar “quantum dots” de CdS sintetizados en cultivos de *E. coli* usando taurina como fuente de azufre.

Materiales y Métodos.

Materiales.

Reactivos

Tabla 1. Reactivos.

Nombre	Proveedor
Na_2HPO_4 (Anhidro)	ISN
KH_2PO_4	Merck S.A. Chile
NH_4Cl	Merck S.A. Chile
NaCl	Quimex
FeCl_2	Merck S.A. Chile
D-Glucosa	ISN
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Merck S.A. Chile
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck S.A. Chile
Tiamina hidrociorada	Calbiochem
Taurina	Merck S.A. Chile
CdCl_2	Sigma-Aldrich Chile
KCl	Merck S.A. Chile
KOH	Calbiochem
HCl	Merck S.A. Chile
Extracto de Levadura	DIFCO
Triptona	DIFCO
H_2SO_4	Winkler
Etanol	Merck S.A. Chile

L-cisteína	Sigma-Aldrich Chile
L-metionina	Calbiochem
Acetato de Plomo	Calbiochem
DMS	Sigma-Aldrich Chile
DMDS	Sigma-Aldrich Chile
Tris-HCl	Calbiochem
NaOH	Winkler
SDS	J.T. Baker
Agarosa (de bajo punto de fusión)	Calbiochem
Aceite de inmersión	Leika
Moviol	Leika

Se utilizó agua miliQ con una resistencia entre 17,8 y 18,2 Ohm.

Cepas bacterianas.

Durante el desarrollo del presente trabajo se utilizaron dos cepas de *E. coli* silvestre. La primera y con la que se desarrolló la mayoría de las metodologías fue *E. coli* BW25113, mientras que para los experimentos de análisis de tendencias de flujos metabólicos se utilizó *E. coli* MG1655 para replicar el modelo de Palsson, con el cual se realizó el modelo bioinformático del metabolismo de *E. coli* [41]. Ambas cepas derivan de *E. coli* K-12 y presentan diferencias mínimas, correspondientes a la ausencia del operon *araBAD* para el catabolismo de arabinosa en el caso de *E. coli* BW25113, lo que no guarda relación con la respuesta a cadmio o con el uso de taurina como fuente de azufre. [42].

Métodos.

Métodos de Microbiología.

Cultivos bacterianos.

Inóculos de *E. coli* BW25113 o MG1655 en medio Luria-Bertani (LB) fueron utilizados para llevar a cabo cultivos en medio mínimo. El medio LB fue preparado utilizando 5 g de extracto de levadura, 10 g de triptona y 10 g de NaCl para un volumen final de 1 L [43]. Los inóculos fueron crecidos hasta alcanzar saturación y luego fueron utilizados. Para evitar la transferencia de nutrientes en concentraciones traza desde el medio LB al medio mínimo, los inóculos fueron tratados como se describe a continuación. Para la determinación de parámetros fisiológicos utilizados en el análisis de tendencia de flujos metabólicos por Markov Chain Monte Carlo (MCMC) durante la biosíntesis de quantum dots de CdS (Obj. 2.2), el inóculo fue centrifugado y suspendido en 1 mL del medio de cultivo, alcanzando una densidad óptica 600 (DO_{600}) inicial entre 0,1 y 0,2. Para todo el resto de los experimentos, una vez que el inóculo alcanzó saturación fue diluido 1:1000 en el volumen final del cultivo.

Los medios mínimos M9 y M63 fueron utilizados para evaluar el rol de taurina y sulfato como únicas fuentes de azufre. El medio M9 fue preparado según lo descrito en literatura [44]. Para 1L de medio M9 se utilizó 100 mL de sales M9 10X autoclavadas (60 g de Na_2HPO_4 anhidro, 30 g de KH_2PO_4 , 5 g de NaCl, 10 g de NH_4Cl en un 1L de agua nanopura pH 7,2), 894 mL de H_2O nanopura estéril, 4 mL de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ o taurina 0,25 M, 0,1 mL de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1 M, 10 mL de glucosa 20 % y 3 mL de tiamina hidroclicada 0,1 M. Tanto el $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, el $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, la glucosa a demás de la tiamina hidroclicada fueron previamente esterilizados mediante filtros de 0,2 μm bajo campanas de flujo laminar. Para el medio M63 se utilizó una variación descrita por Van der Ploeg y cols. (1996) libre de fuentes de azufre traza [38]. Para 1 L de medio M63 se utilizó 100 mL de sales M63 10X autoclavadas (87,1 g de KH_2PO_4 y 17,6 g de NH_4Cl en 1L de agua nanopura, pH 7,2), 881 mL de H_2O nanopura estéril, 1 mL de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1 M, 3 mL de tiamina hidroclicada 0,1M, 10 mL glucosa 20 %, 4 mL de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ o taurina 0,25 M y 1 mL de $FeCl_3 \cdot 4H_2O$ 1,8 mM.

Al igual que en el medio M9, los suplementos fueron esterilizados bajo campana de flujo laminar a través de un filtro de 0,2 μm .

Para los experimentos de viabilidad celular, se realizó el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) utilizando el protocolo que se detalla más abajo. El medio LB fue preparado como se describió previamente y bacto-agar fue adicionado a una concentración final de 2 %.

Todos los cultivos de *E. coli* desarrollados en este trabajo fueron incubados a 37 °C y 200 rpm en un Shaker Zhcheng Zhwi-10b o en una incubadora a igual temperatura, según correspondiese.

Curvas de crecimiento.

Para evaluar el crecimiento bacteriano en el tiempo se siguió la DO_{600} de los cultivos en un espectrofotómetro Optizen-3020 UV. Alícuotas de cultivos fueron tomadas en condiciones de esterilidad para evitar eventos de contaminación. La determinación de la DO_{600} fue realizada directamente para los cultivos de *E. coli* BW25113. No obstante, durante la determinación de parámetros fisiológicos para el análisis de tendencia de los flujos metabólicos por MCMC en cultivos de *E. coli* MG1655 (Obj. 2.2), la lectura de la DO_{600} se llevó a cabo diluyendo la alícuota hasta valores menores a 0,5, rango en que se mantiene la linealidad entre la cantidad de biomasa y la densidad óptica y las unidades de absorbancia [45]. De esta manera, el cálculo de la tasa de crecimiento fue realizado correctamente durante la fase de crecimiento exponencial, corrigiendo la saturación de la señal a DO_{600} mayores e incorporando los valores en los análisis *in silico* realizados posteriormente.

Recuento de Unidades Formadoras de Colonia (UFC).

Para evaluar el efecto de taurina sobre la toxicidad asociada a cadmio, se realizó el conteo de UFCs de cultivos de *E. coli* BW25113 expuestos al metal. *E. coli* fue crecida en M63 hasta fase exponencial de crecimiento (DO_{600} 0,4-0,5) usando taurina o sulfato como fuentes de azufre. A continuación se adicionó el metal hasta una concentración de 5 o 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Cd^{2+} y se tomó alícuotas del cultivo en el tiempo para el recuento de colonias. Para esto, las alícuotas fueron centrifugadas a 5000 rcf por 10 min en una centrifuga HETTICH Mikro 200R; el sedimento del cultivo fue suspendido en buffer PBS 1X estéril (para 1 L de buffer 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na_2HPO_4 y 0,24 g de KH_2PO_4 fueron disueltos en agua nanopura, pH 7,4) y se realizó diluciones seriadas de las alícuotas desde 10^0 a 10^{-8} en el mismo buffer. Finalmente 5 μL de cada dilución fueron dispuestos como gotas en placas de LB agar, se esperó hasta que las gotas secan y las placas se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Finalmente se contó el número UFCs por gota .

Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (CIM).

Un preinóculo de *E. coli* BW25113 incubado a 37 °C y 200 rpm en medio M63 (con 1 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) fue crecido hasta saturación y luego utilizado para los ensayos de CIM. La DO_{600} del inóculo fue determinada y se calculó el volumen necesario para que en 200 μL de cultivo final la DO_{600} inicial del cultivo fuese entre 0,03 a 0,05. En paralelo, en una placa de 96 pocillos, se agregó 286 μL de medio de cultivo los que fueron suplementados con 16 μL de Cd^{2+} 10 mg/mL (previamente filtrado, 0,22 μm) alcanzando una concentración final de 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del ion. A partir de esta solución inicial se realizaron diluciones seriadas en los pocillos contiguos hasta alcanzar una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Cd^{2+} en volúmenes de 200 μL del medio de cultivo. A continuación en dos pocillos se agregó medio de cultivo sin metal y se inoculó uno de ellos como control positivo del crecimiento mientras que el otro fue utilizado como un control negativo [46].

Finalmente, las placas fueron puestas a incubar a 37 °C con agitación constante (200 rpm) durante la noche. Para el análisis de los resultados se realizó lecturas de la

DO₆₀₀ de cada pocillo utilizando el control negativo (medio de cultivo sin inocular) como blanco, donde toda lectura con una diferencia \leq al 5% con el blanco fue considerado como inhibición del crecimiento y se utilizó como valor de CIM. Los experimentos fueron realizados en triplicado y para el medio M63 utilizando MgSO₄ * 7H₂O o taurina 1 mM como fuente de azufre. El rango de concentraciones de cadmio utilizadas para el ensayo fueron obtenidas desde el CIM de CdCl₂ de *E. coli* en M9 con sulfato como fuente azufre (60-80 μ g/mL).

Métodos de biosíntesis de Quantum Dots.

Biosíntesis con adición del metal desde el inicio.

Para llevar a cabo el análisis por MCMC de los flujos metabólicos (Obj. 2.2) en condiciones de biosíntesis de QDs de CdS, se incorporó el metal al cultivo desde el momento en que el inóculo es agregado al medio, obteniendo una sola tasa de crecimiento por cultivo. El medio mínimo M9 preparado con MgSO₄ * 7H₂O como única fuente de azufre a una concentración 1 mM, fue inoculado con *E. coli* MG1655 según lo descrito previamente. El crecimiento del cultivo fue monitoreado mediante el cambio de la DO₆₀₀ en el tiempo hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. Alícuotas del cultivo fueron tomadas en el tiempo bajo condiciones de esterilidad y posteriormente fueron analizadas para observar la aparición de fluorescencia como indicador de la formación de QDs, según lo descrito por Monrás y cols (2012) [25].

Biosíntesis con adición del metal en fase exponencial.

Para relacionar la respuesta del cultivo durante la síntesis de QDs de CdS, la adición del metal fue realizada durante la fase exponencial de crecimiento. Cultivos de *E. coli* BW25113 fueron crecidos en M9 o M63 utilizando taurina o sulfato como fuente de azufre. El crecimiento del cultivo fue monitoreado mediante DO₆₀₀ y una vez que alcanzó la fase exponencial (DO₆₀₀ 0,4 - 0,5), el metal fue adicionado a una concentración final de 5, 10 o 180 µg/mL según correspondiese. Finalmente, alícuotas del cultivo fueron tomadas en el tiempo y analizadas para observar la aparición de la fluorescencia como indicador de la formación de QDs [24,25]

“Screening” de biosíntesis de Quantum Dots.

Los QDs de CdS son altamente fluorescentes al ser irradiados con luz UV con λ entre 350 y 400 nm, mientras que la mayoría de las macromoléculas orgánicas no emitieron fluorescencia al ser excitadas a dichas λ , por lo que es factible apreciar la formación de estas NPs en cultivos bacterianos a través de la aparición de fluorescencia. Dicho fenómeno ya fue descrito por Monrás y cols (2012) y recientemente por Gallardo y cols (2014). Por lo que basados en dichos protocolos, alícuotas de los cultivos en condiciones de biosíntesis fueron centrifugadas a 10.000 rfc durante 1 min en una centrifuga HETTICH Mikro 200R, el sobrenadante fue descartado y el pellet del cultivo suspendido en 1 mL de H₂O destilada en tubos Eppendorf no fluorescentes [25,47]. De esta manera se logró limpiar los restos auto-fluorescentes del cultivo que pudiesen interferir con el ensayo, así como iones de cadmio solubles que permitieran continuar con la reacción de síntesis. Finalmente, una vez lavado el precipitado del cultivo, las alícuotas se volvieron a centrifugar y fueron irradiadas a 365 nm (Transiluminador Maestrogen UV). El registro gráfico de la fluorescencia fue llevado a cabo utilizando una cámara Nikon Coolpix L820 en función macro, F1/55 e ISO 200.

Posteriormente las muestras fueron almacenadas a -20 °C para impedir que otros metabolitos producidos dentro de la célula continuaran el proceso de síntesis, lo que

permitió almacenar muestras durante semanas para los procesos de purificación de las NPs.

Métodos de detección y cuantificación.

Detección de H₂S.

Cultivos de *E. coli* BW25113 en medio M63 fueron crecidos en presencia de cisteína, metionina, MgSO₄ * 7H₂O o taurina a concentraciones finales de 1 mM como única fuente de azufre. La cisteína fue utilizada como control positivo de generación de H₂S, mientras que la metionina como control negativo [48]. El sulfato por otra parte, fue utilizado como control para una fuente de azufre tradicional. Sobre cada uno de los cultivos se colocó una tapa con un papel embebido en acetato de plomo. El H₂S reacciona específicamente con el plomo para formar PbS el que posee un color negro, por lo que la generación de H₂S fue seguida mediante la aparición de este precipitado. El uso de acetato de plomo permite detectar niveles traza de H₂S (hasta ppb) generados a partir de cultivos de microorganismos [48-50]. Básicamente, un papel filtro de color blanco fue humedecido totalmente por una solución de acetato de plomo saturada (5 %) y secado en estufa a 50 - 60 °C. A continuación, la tira del papel fue dispuesta en la tapa del cultivo, el que se selló para asegurar la interacción de los gases del cultivo con el papel. El papel fue colocado en la parte superior del cultivo . Además, se realizaron controles sin inocular para la posible generación de H₂S en forma espontánea desde los medios de cultivo. Una vez que el cultivo alcanzó la fase estacionaria de crecimiento el papel fue retirado y la formación de PbS fue registrada mediante una cámara Nikon Coolpix L820 en función macro, F1/45 e ISO 200.

Detección y cuantificación de COSV.

Para llevar a cabo estos experimentos se utilizaron tubos sellados por tapas con una cubierta de sílica perforable (septum), donde se llevaron a cabo los cultivos bacterianos. Esto permitió almacenar los gases emanados desde los cultivos y evitar su oxidación. El "headspace" fue colectado mediante micro-extracción de fase sólida por jeringa. Básicamente, se utiliza una jeringa que cuenta con una fibra cubierta por una fase sólida que permite adsorber los compuestos presentes en el "headspace". En este caso se utilizó una fibra SPME SUPELCO de 75 μm de carboxeno y poli di-metil siloxano para la retención de compuestos gaseosos y de bajo peso molecular. La cantidad de compuestos extraídos por la fibra se encuentra en directa relación a su concentración en la muestra, por lo que para asegurar un equilibrio entre la concentración de los gases generados y la presencia de éstos en la fibra, ésta se expuso al headspace de los cultivos durante 20 min, tiempo descrito para alcanzar el equilibrio [33]. Finalmente, la muestra se inyectó a un cromatógrafo de gases (GC) Hewlett Packard 5890 II acoplado a un detector de sulfuro por quimio-luminiscencia (SCD) Sievers Instruments (Boulder, Colorado, USA), a través de una columna capilar de 30 m x 0.32 mm (DB-5, 0.25 μm). La temperatura del inyector del GC (275 $^{\circ}\text{C}$) permite la desorción de los compuestos desde la fibra y mediante un programa de temperatura estos fueron separados según su punto de ebullición. Para asegurar una correcta separación de los picos en el cromatograma, se utilizó un programa de temperatura de 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta alcanzar una temperatura entre 20 a 50 $^{\circ}\text{C}$ mayor al último punto de ebullición que se deseaba detectar (en este caso di-metil tri-sulfuro \sim 170 $^{\circ}\text{C}$). Una vez separados los analitos entran al SCD y la señal generada depende de la cantidad del compuesto inicialmente presente en la fibra, lo que permite calcular la concentración de los compuestos presentes en el headspace mediante curvas de calibración utilizando estándares comerciales. En este trabajo se identificó y cuantificó los niveles de DMS, que presentó un tiempo de retención o R_t de 4,5 min [51]. Además se identificó DMDS (R_t : 8,7 min) y MeSH (R_t : 2,5 min). Lamentablemente, para este último no se disponía de un estándar comercial por lo que su cuantificación no fue llevada a cabo [51].

La curva de calibración para la cuantificación de DMS se llevó a cabo inyectando muestras de un estándar de DMS desde 0, 24, 64, 84 y 100 ng y registrando la intensidad de los picos cromatográficos. Las inyecciones fueron realizadas siguiendo el programa de temperatura descrito anteriormente, pero utilizando jeringas de inyección de fase líquida según lo descrito por Swearingen y cols. (2004) [51].

La preparación de las muestras de los cabeza espacio o “headspace” bacterianos para el análisis por GC-SCD se realizó como se describe a continuación. Cultivos de *E. coli* BW25113 en medio M63 utilizando taurina o sulfato como únicas fuentes de azufre fueron incubados a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. Para monitorear la DO₆₀₀ del cultivo se utilizó un espectrofotómetro Spectronic 20D+, el que permitía determinar la DO₆₀₀ a través del tubo de cultivo sin exponer el headspace al aire. Una vez alcanzada la fase estacionaria el septum del cultivo fue perforado para el proceso de extracción descrito anteriormente.

En primera instancia se utilizó cultivos de *E. coli* en presencia de 0.25, 0.5, 1, 2 y 4 mM de la fuente de S (taurina o sulfato), para así determinar el máximo nivel de producción de COSV y replicar dicha concentración para los ensayos de generación de COSV en presencia de cadmio. A continuación cultivos de *E. coli* BW25113 en medio M63 utilizando taurina o sulfato como únicas fuentes de azufre a una concentración de 1 mM fueron incubados según lo descrito anteriormente hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento (DO₆₀₀ 0,4 - 0,5) donde el metal fue adicionado a una concentración final de 10, 15, 30 o 60 µg/mL de Cd²⁺; los cultivos fueron vueltos a sellar y el headspace fue analizado luego de 16 h de incubación con el metal.

Finalmente, cultivos de *E. coli* fueron crecidos en LB en presencia de 2,5, 5, 10, 20 o 60 µg/mL de Cd²⁺. El metal fue adicionado durante la fase exponencial de crecimiento (DO₆₀₀ 0,4 - 0,5), los tubos fueron vueltos a sellar y el headspace fue analizado luego de 16 h de incubación con el metal. De esta manera se logró estudiar la generación de COSV en presencia de un medio rico, en el que se encuentran diversas fuentes de azufre para la bacteria.

Detección y cuantificación de glucosa y acetato.

Para determinar el consumo de glucosa y generación de acetato durante el proceso de biosíntesis de QDs de CdS, primero fue necesario establecer condiciones fisiológicas que permitieran evaluar la generación de NPs y al mismo tiempo la tasa de crecimiento. Para ello, biosíntesis de QDs de CdS en cultivos de *E. coli* MG1655 en medio M9 adicionando el metal desde el inicio del cultivo fueron llevados a cabo según lo descrito anteriormente. Para la determinación de la tasa de crecimiento, el cultivo fue monitoreado por su DO₆₀₀. Los cultivos utilizaron MgSO₄ * 7H₂O como única fuente de azufre a una concentración final 1 mM y fueron tratados con 10, 20, 40 o 80 µg/mL de Cd²⁺. El crecimiento de los cultivos fue seguido hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento.

Finalmente, se eligió una concentración de 80 µg/mL de Cd²⁺ para realizar los ensayos de consumo de glucosa y generación de acetato en condiciones de biosíntesis de QDs de CdS. Para esto, se utilizó un bio-reactor con capacidad de 2 L, en el que se llevó a cabo cultivos de *E. coli* MG1655 en 1,5 L de medio M9 utilizando sulfato como fuente de azufre (1 mM) y glucosa como fuente de carbono a una concentración de 0,2%. La preparación del cultivo fue realizada como se describió previamente, agregando el metal junto con el inóculo. El crecimiento del cultivo y la tasa de crecimiento fueron evaluados a través de la DO₆₀₀ del cultivo. Para ello, una bomba peristáltica fue conectada al reactor con el propósito obtener muestras representativas para la determinación de la DO₆₀₀. El reactor fue depositado en un baño termo-regulado a 37 °C y la temperatura monitoreada durante todo el experimento. Un rotor de agitación se conectó a la hélice del dispositivo permitiendo una agitación constante de 680 rpm. Además, para asegurar una máxima oxigenación se conectó una bomba de aire AA-320 al reactor. Para mantener la esterilidad del aire purgado al interior del reactor se ocuparon filtros de 0,2 µm entre el paso del aire desde la bomba al cultivo. Para monitorear el nivel de oxigenación, se midió la saturación de oxígeno del cultivo mediante un oxímetro HANNA, HI 8410. Finalmente, muestras del cultivo tomadas cada 1 h fueron filtradas (0,2 µm) para eliminar las células y analizadas mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC Waters 1525, binary pump) acoplada a detectores de índice de refracción (IR) Waters 2414 Refractive index detector y de absorbancia UV210 Waters 2487 dual λ absorbance, con una columna de intercambio

iónico Aminex HPX 87H, de 300 x 7,8 mm, utilizando un volumen de inyección de muestra de 20 μ L y una fase móvil de H_2SO_4 5 mM.

Para la identificación de glucosa y acetato, se utilizó estándares comerciales de azúcares y ácidos orgánicos (acetato, citrato, formato, glucosa, malato y oxalato) disueltos en M9 sin glucosa. La glucosa presentó un tiempo de retención (Rt) de 27,3 min para su señal en el detector IR y el acetato un Rt de 45,1 min para su señal en el detector UV210. Se evitó el solapamiento de las señales presentes en el medio M9 con la de los analitos utilizando un flujo capilar de 0,2 mL/min a una temperatura de 30 °C tanto en los detectores como en la columna. Finalmente, para la cuantificación de glucosa y acetato en el medio extracelular se realizaron curvas de calibración en medio M9 sin glucosa o acetato registrando el área integrada bajo la curva ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$) de los picos cromatográficos para las concentraciones de 0, 2.78, 5.55, 8.33, 11,10 y 13.88 mM de glucosa y de 0, 6.1, 12.2, 18.3, 24.4, y 30.5 mM de acetato, utilizando el mismo programa de corrida.

A partir de los valores determinados experimentalmente, se graficó los mmoles de glucosa o acetato determinados por HPLC en función de la biomasa para el mismo tiempo de medición. Para poder obtener la biomasa del cultivo en el tiempo se ocupó un factor de conversión de biomasa de 0,44 $\text{gDW/L}\cdot\text{DO}_{600}$ (determinado experimentalmente) para transformar la DO_{600} en unidades de gDW/L . Del gráfico generado, se realizó una regresión lineal para el intervalo de la fase de crecimiento exponencial del cultivo de la cual se determinó la tasa o velocidad de consumo de glucosa (T_{glu}) y la tasa o velocidad de generación de acetato (T_{ac}) como el producto entre el valor de la pendiente y la tasa de crecimiento obtenida del cultivo [52]. Finalmente se determinó parámetros fisiológicos de rendimiento para biomasa (Y_{biomasa}) y acetato (Y_{acetato}), que fueron utilizados para comparar las condiciones experimentales del cultivo control y el cultivo tratado con 80 $\mu\text{g/mL}$ de Cd^{2+} . Ambos rendimientos fueron calculados como las unidades de biomasa generada por mmol de glucosa consumido y como los de mmol de acetato generados por mmol de glucosa consumido a partir del inverso de la pendiente de los respectivos gráficos [52].

Métodos de análisis de tendencias de cambios de flujos metabólicos con “Markov Chain Monte Carlo” (MCMC).

En el presente trabajo, se utilizó el modelo de la red metabólica de *E. coli* MG1655. Se utilizó la velocidad de consumo de glucosa, la velocidad de generación de acetato y la tasa de generación de biomasa como parámetros experimentales para ser incorporados durante la modelación [41]. Para evitar el sesgo al seleccionar un valor óptimo durante la modelación, se realizó un análisis de tendencias de cambios de flujos metabólicos por MCMC [53]. Como resultado se obtuvo una serie de distribuciones de flujos por cada reacción metabólica, pudiendo establecer la frecuencia con la que se repite un determinado flujo metabólico para las distintas condiciones experimentales, lo que se representó mediante un histograma para cada reacción metabólica de interés. De esta manera se utilizó el MCMC como una herramienta de modelación, para determinar el efecto del cadmio sobre el metabolismo central de *E. coli* MG1655 en condiciones de biosíntesis utilizando $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ como única fuente de azufre cuando es tratada desde el inóculo con $80 \mu\text{g/mL}$ de Cd^{2+} .

Métodos de modelamiento metabólico.

Se utilizó el modelo iJO1366 como reconstrucción metabólica de *E. coli* MG1655 [41, 52]. Sobre éste se incorporaron las siguientes reacciones para representar la formación de QDs.

(1)



(2)



La reacción (1) corresponde a la síntesis de la unidad básica de QDs de CdS. El átomo de azufre proviene desde H_2S , el cuál puede ser formado desde sulfato, de acuerdo con el modelo. Por su parte, en el modelo, Cd solo presenta la reacción de incorporación y no está conectado con otras reacciones de manera que la reacción 1, representa la única vía de consumo de Cd en la célula y compite por el H_2S que puede ser consumido en reacciones de biosíntesis. Otra suposición en nuestro modelamiento es que el QD solo está formado solo por la red cristalina de Cd y S que se ordena en el espacio como una NP, que carece de coberturas y posee una proporción 1:1 entre los átomos de Cd y S. Esto, permite la simplificación del sistema, dado que muchos de los parámetros se desconocen para nuestras condiciones de bioíntesis, y se decidieron en base a lo descrito en literatura sobre QDs de CdS sintetizados químicamente [19,23]. Por otra parte, la reacción (2) representa la salida de unidades de nanopartículas de la célula, para impedir en el modelo la acumulación de estas unidades dentro de la célula, respetando de esta manera el principio de pseudo estado estacionario.

Los “scripts” de programación generados para la representación de estos modelos fueron desarrollados de acuerdo a lo descrito por Matsuda y cols. (2015) y se encuentran adjuntos como material suplementario del presente trabajo en el Anexo “Generación de modelos” [54].

Modelamiento del consumo de Cd y sulfato en condiciones de síntesis de QDs.

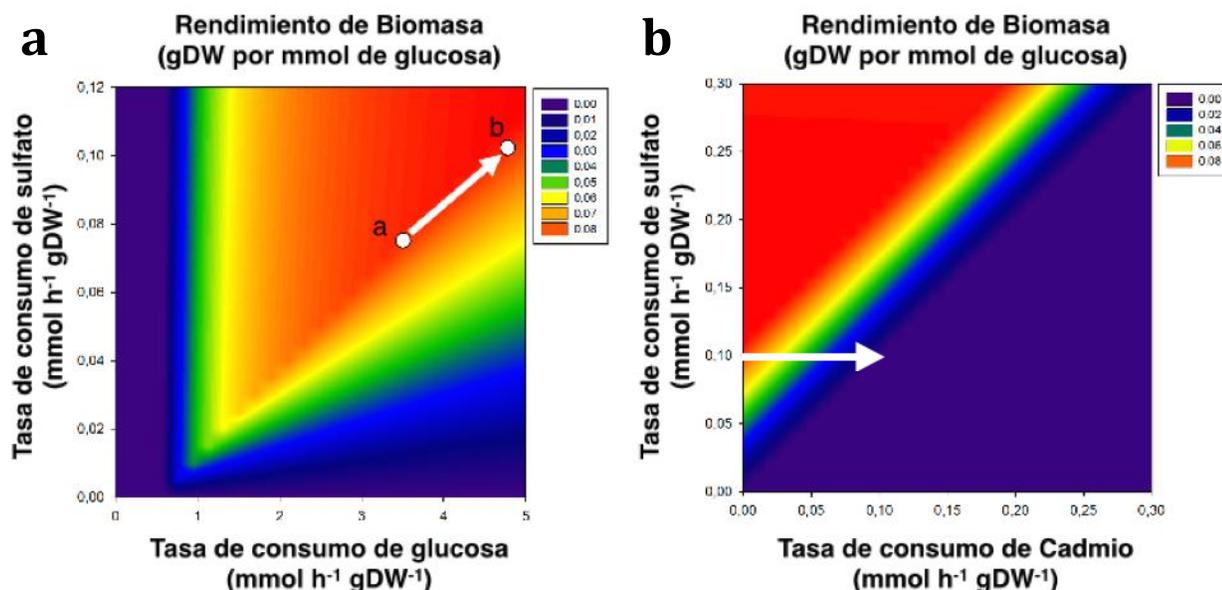


Figura 8. Phenotype phase plane para la determinación de consumo de sulfato en condiciones de biosíntesis de QDs. **a**, variación en el Y_{biomasa} cuando el consumo de glucosa y sulfato varían. La escala de colores indica el aumento en el Y_{biomasa} para el modelo iJO1366 de *E. coli* MG1655 cuando el consumo de glucosa es liberado, siendo morado un crecimiento nulo y rojo donde el rendimiento se hace máximo. Los círculos blancos (\circ) marcan la tasa de consumo de sulfato en condiciones de Y_{biomasa} máximo para los valores de tasa de consumo de glucosa determinados experimentalmente. El círculo *a* corresponde a la condición sin cadmio y el círculo *b* a la condición con tratamiento del metal. **b**, variación en el Y_{biomasa} en función del consumo de cadmio y sulfato. La flecha blanca representa el comportamiento del Y_{biomasa} bajo un consumo de glucosa constante, lo que equivale a un consumo de sulfato de $0,1 \text{ mmol h}^{-1} \text{ gDW}^{-1}$. La escala de colores indica el aumento en el Y_{biomasa} para el modelo iJO1366 de *E. coli* MG1655 cuando el consumo de cadmio es liberado, siendo morado un nulo crecimiento y rojo donde el rendimiento se hace máximo.

Dado que deseamos modelar los cambios de la distribución de flujos metabólicos como consecuencia de la síntesis de QDs en *E. coli*, se necesita especificar en que valor será restringida la velocidad de consumo de sulfato y de cadmio en el modelo modificado con las reacciones (1) y (2) a la hora de hacer el muestreo del espacio de soluciones. Contamos con los valores observados de flujo de consumo de glucosa, acetato y el rendimiento de biomasa en presencia y ausencia de Cd.

Se simuló el Y_{biomasa} ante cambios de flujos de consumo de glucosa y de sulfato, en la condición de consumo cero de cadmio (Figura 8a). El Y_{biomasa} obtenido a partir de la velocidad de producción de biomasa óptima, dividida por la velocidad de consumo de glucosa usada para calcular el óptimo. Sobre este, así llamado, plano de fase fenotípico, se

puede preguntar por la velocidad de consumo de sulfato que se requiere para la producción óptima de biomasa cuando la velocidad de consumo de glucosa corresponde al valor observado experimentalmente. En ese sentido, para mantener el rendimiento control, el flujo de entrada de glucosa exigiría un consumo de sulfato cercano a $0,1 \text{ mmol h}^{-1} \text{ gDW}^{-1}$ (Figura 8a).

Por otra parte, se observó el plano de fase fenotípico para el Y_{biomasa} ante cambios de flujos de consumo de cadmio y sulfato, en la condición del consumo observado de glucosa en presencia de cadmio (Figura 8b). En este caso el valor óptimo de producción de biomasa está dividido por la velocidad de consumo de glucosa en presencia de cadmio. Sobre este plano, podemos preguntarnos cómo disminuye el rendimiento al incrementarse la tasa de consumo de cadmio, suponiendo que se mantiene la velocidad de entrada de sulfato necesaria para el crecimiento óptimo en ausencia de cadmio (flecha en la Figura 8b). De esta forma, podemos relativizar dicha disminución respecto al rendimiento observado en la

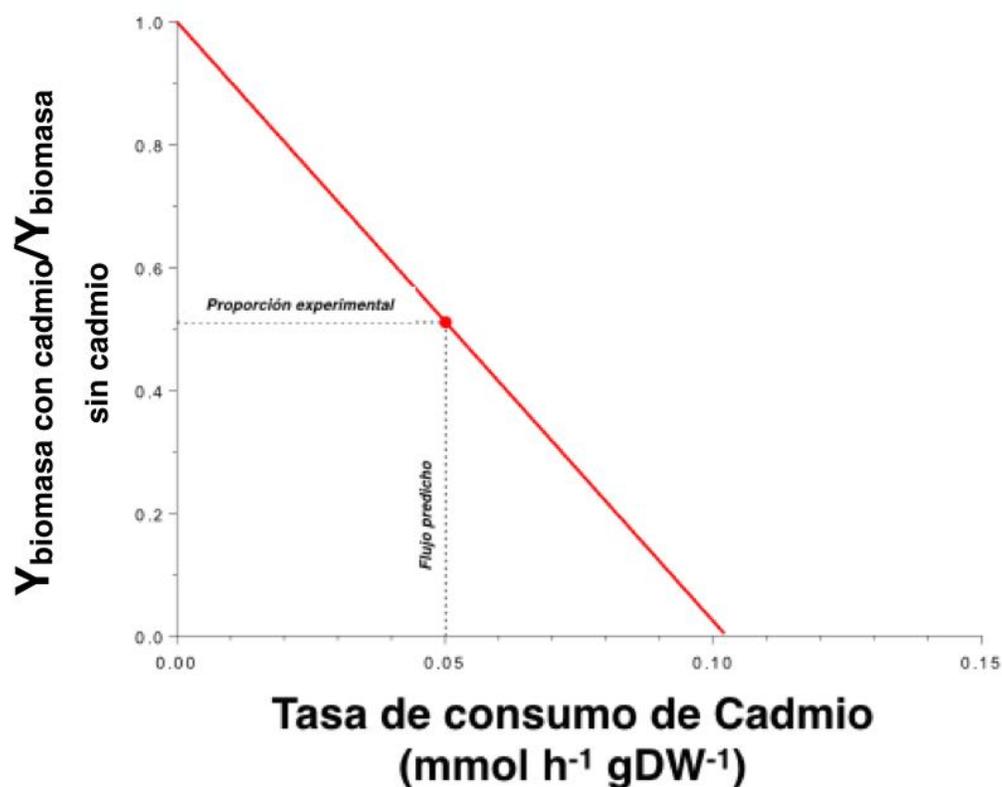


Figura 9. Análisis de robustez para la predicción del consumo de cadmio. Y_{biomasa} en función del flujo de incorporación de cadmio. El valor determinado experimentalmente para la proporción de Y_{biomasa} con cadmio / Y_{biomasa} sin cadmio fue interpolado, obteniendo una tasa de consumo de cadmio de $0,05108 \text{ mmol h}^{-1} \text{ gDW}^{-1}$.

condición control sin cadmio y preguntarnos cuál es la tasa de consumo de cadmio que disminuye el rendimiento de biomasa en la proporción observada experimentalmente (0,51). Interesantemente, se obtuvo una tasa de consumo de cadmio cercana a los 0,05 mmol h⁻¹ gDW⁻¹ lo que coincide con lo descrito en literatura para una condición de crecimiento en presencia de una concentración de 2.1 μM [55].

Usando estas aproximaciones hemos determinado los flujos de sulfato y cadmio que luego fueron utilizados en el análisis de MCMC. Los scripts de programación generados para estos análisis se pueden encontrar en el Anexo “Phenotype Phase Plane I y II” “Normalización de rendimiento” y “Predicción de consumo de cadmio”.

Análisis de flujos metabólicos mediante muestreo por “Markov Chain Monte Carlo” (MCMC).

Para el análisis por MCMC se utilizó el modelo de reconstrucción metabólica iJO1366 para *E. coli* MG1655, el software MATLAB, el Toolbox de análisis para modelos metabólicos COBRA 2 y el software solucionador de problemas de optimización GUROBI 5 [54]. Para las simulaciones se consideraron condiciones subóptimas, empleando como restricción una tasa de crecimiento de un valor del 90% de la tasa de crecimiento óptima predicha. Además, se incorporaron las tasas determinadas experimentalmente (acetato y glucosa) y las de consumo de sulfato y de cadmio predichas mediante FBA para las condiciones de presencia y ausencia de cadmio. En este último caso, se fijó el consumo de cadmio en cero. Desde el espacio de soluciones, el que contempla todas las combinaciones de flujos posibles que cumplen las restricciones mencionadas, se muestrearon al azar 5166 distribuciones de flujos. Con éstas se determinó el histograma de frecuencias de flujo de diferentes reacciones de interés, para las condiciones de cultivo en ausencia o presencia de cadmio. Los “scripts” para el análisis de flujos mediante MCMC se detallan en el Anexo I “Tendencias de cambios de flujos con MCMC”. Además la lista de reacciones para las que se desarrolló el análisis por histogramas se encuentra detallada en el Anexo “Reacciones MCMC” del presente trabajo.

Métodos de purificación de Quantum Dots.

Para la purificación de QDs de CdS sintetizados en cultivos de *E. coli* se utilizó un protocolo único descrito a continuación [25]. 50 mL de cultivo tratado con el metal fueron centrifugados a 10.000 rcf en una centrifuga Fascio TGL/16-M. El sobrenadante fue descartado y el pellet suspendido en 1 mL de NaOH 1M a 90 °C durante 10 min. A continuación se volvió a centrifugar y el pellet fue suspendido en 1 mL de buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 con SDS 1% hasta solubilizar todo el material. Luego se sonicó en hielo por 2 min en rondas de máximo 30 seg a 70 mA para evitar que se calentara la muestra y disminuir la generación de espuma. El tubo se centrifugó a 14.000 rfc, 4 °C (HETTICH Mikro 200R), durante 2 min y se comprobó la presencia de fluorescencia en el sobrenadante. Algunas veces, parte de la fluorescencia permaneció en el pellet por lo que se repitió el proceso de sonicación. En este punto los QDs liberados se pasaron por una columna de exclusión Sephadex G75 para remover proteínas remanentes. Finalmente, las NPs fueron concentradas mediante tubos Merck Amicon Ultra-15 para filtración en centrífuga con una membrana de NMWL de 10 kDa. De manera opcional se puede intentar remover el SDS de la solución diluyendo la muestra al menos 5 veces. De esta manera la concentración del SDS será menor a 8,2 mM, por debajo de su concentración micelar crítica evitando que se formen micelas, por lo que al concentrar la muestra los QDs quedarán en el filtro y el SDS será separado. La fracción de QDs purificados fue almacenada a -20 °C para posteriores análisis.

Métodos de caracterización de Quantum Dots.

Espectros de absorbancia y fluorescencia.

Muestras de QDs de CdS purificadas desde cultivos de *E. coli* BW25113 (M63, taurina 1 mM) incubados con 10 µg/mL de Cd²⁺ durante 0, 12 y 24 h fueron suspendidas en H₂O nanopura para análisis espectroscópicos en un lector híbrido de absorbancia y fluorescencia BioTek Synergy H1N. Para el espectro de absorbancia se abarcó λ desde 300 a 700 nm, rango en que es apreciable fenómenos de resonancia plasmónica característicos

de NPs metálicas [2]. Por otra parte, para la identificación de la λ máximas de emisión (λ_{em}) de la muestras se realizaron espectros de emisión de fluorescencia excitando las muestras a 360 nm [25]. Para la obtención de las λ máximas de excitación (λ_{ex}) se realizaron espectros de excitación de fluorescencia leyendo la señal emitida a las λ_{em} determinadas para cada muestra [2,25].

Microscopía confocal.

La fluorescencia de un cultivo de *E. coli* BW25113 tratado con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Cd^{2+} durante fase exponencial de crecimiento fue seguida hasta alcanzar un color verde (12 h aprox.). Sólo entonces 5 mL del cultivo fueron centrifugados a 5.000 rfc durante 10 min en una centrífuga HETTICH Mikro 200R para concentrar la células. El pellet bacteriano fue suspendido en 1 mL de buffer PBS 1X, pH 7,4, alcanzando una DO_{600} de 0,5 el que fue utilizado para realizar los análisis de microscopía confocal.

Para el montaje de la muestra se utilizaron porta objetos tradicionales de vidrio. Sobre estos se colocó una argolla de sílica con un diámetro aproximado de 10 mm y altura 5 mm. Al interior de la argolla se dispuso agarosa de bajo punto de fusión previamente derretida. Se esperó a que la agarosa gelificara, siendo cuidadosos de no dejar burbujas que afectaran el paso del láser del microscopio. Sobre el gel de agarosa se dispusieron 10 μL de la muestra, la que se dejó secar a temperatura ambiente durante 20 min. Finalmente sobre ésta se colocó un cubre objetos y aceite de inmersión.

Para observar las muestras se utilizó un microscopio confocal Leica TCS LSI MacroZoom, utilizando un láser 405 (Lumencor) de estado sólido con un detector espectral y un filtro de excitación DAPI (405 nm). Se utilizó un lente objetivo de inmersión de 63X de campo lejano con apertura numérica 1,3, se recogió la emisión de fluorescencia del espectro visible comprendido entre 400 y 700 nm, para asegurar que la señal obtenida correspondiera efectivamente a la emisión de QDs excitados a 405 nm y emitiendo fluorescencia en un rango visible. Para el registro fotográfico, el microscopio estaba acoplado a una cámara EM-CCD (Andor ixon).

“Dispersión Dinámica de la Luz” DLS.

Para determinar el tamaño de los QDs de CdS biosintetizados, se utilizó una muestra previamente purificada desde un cultivo de *E. coli* BW 25113 en M63, usando taurina 1 mM como fuente de azufre. El metal fue adicionado a una concentración de 10 µg/mL de Cd²⁺ durante la fase exponencial de crecimiento como se describió anteriormente. La muestra purificada fue suspendida en 1 mL de H₂O nanopura, sonicada en baño durante 10 min y analizada para la distribución de tamaño en un DLS Malvern Zetasizer.

Resultados.

Objetivo 1.- Evaluación de la biosíntesis de Quantum Dots de CdS durante el crecimiento exponencial de *E. coli* en medio mínimo.

La mayoría de los protocolos de biosíntesis de QDs de CdS utilizando *E. coli* han sido llevados a cabo mediante la detención del cultivo en una determinada fase de crecimiento para su posterior incubación con el metal, nunca en condiciones de crecimiento de la bacteria [19, 23]. Para evaluar y relacionar mecanismos celulares con el fenómeno de biosíntesis es necesario desarrollar el proceso en paralelo al crecimiento bacteriano. Por otra parte, tampoco se han desarrollado modelos de biosíntesis en medio mínimo. En base a lo anterior se decidió evaluar la biosíntesis de QDs de CdS durante el crecimiento exponencial de cultivos de *E. coli* en dos medios mínimos. Los cultivos fueron tratados con 10 o 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Cd^{2+} según lo descrito por nuestro grupo para la síntesis de NPs de CdS en medio LB, pero utilizando como única fuente de azufre sulfato 1 mM [24]. El crecimiento fue seguido mediante la DO_{600} del cultivo y en paralelo la fluorescencia asociada a la generación de NPs fue monitoreada mediante el “screening” de fluorescencia de pellets celulares acorde a lo descrito por Monrás y cols. (2012) [25].

Los resultados se muestran en la Figura 10a y b. Para cultivos en M63 tratados tanto con 10 o 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Cd^{2+} , el crecimiento se detuvo una vez que el metal fue adicionado y no fue capaz de sobreponerse al estrés. En el caso del medio M9 *E. coli* sí fue capaz de tolerar la presencia del metal, tanto para el tratamiento con 10 como con 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Cd^{2+} . Cuando *E. coli* en M9 fue incubada con cadmio se observó una dosis dependencia respecto al efecto del metal sobre el crecimiento del cultivo, encontrando una variación en la tasa de crecimiento cuando se utilizó 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por otra parte, en términos de la biomasa final generada, los valores de DO_{600} de los cultivos en M9 tratados con el metal fueron muy similares respecto a la condición control luego de 24 h de incubación, mientras que para los cultivos tratados con cadmio en M63, la biomasa final fue menor a los valores observados para el cultivo control (Figura 10a y b).

Finalmente, el seguimiento de la fluorescencia en el tiempo mostró la generación de NPs fluorescentes en todas las condiciones probadas (Figura 10c y 10d). Para los cultivos de *E. coli* en M63 se observó fluorescencia de color cian-verde a partir de 10 h de incubación con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y fluorescencia naranja desde las 2 a las 8 h de tratamiento con 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 10c). Por otro lado, en M9 se observó una fluorescencia roja de 4 a 8 h de incubación con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Cd^{2+} y una transición de verde a rojo desde las 2 a las 10 h cuando el cultivo fue tratado con 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 10d). En este último caso, el color de emisión de fluorescencia de las NPs, que se relaciona con el tamaño de éstas (Monrás y cols., 2012) [25], dependería de la concentración inicial del metal con la que fue tratado el cultivo, lo que concuerda con lo descrito previamente por nuestro grupo [24]. La aparición de esta fluorescencia, así como el cambio en la longitud de onda de emisión al irradiar con luz UV (λ_{ex} 360 nm) los cultivos de *E. coli* tratados con cadmio, es característica de la generación de NPs fluorescentes o QDs [25]. Estos resultados muestran que *E. coli* puede sintetizar QDs de cadmio durante la fase exponencial en medio mínimo, lo que servirá como base para los siguientes experimentos donde se evaluará el efecto de taurina en el proceso.

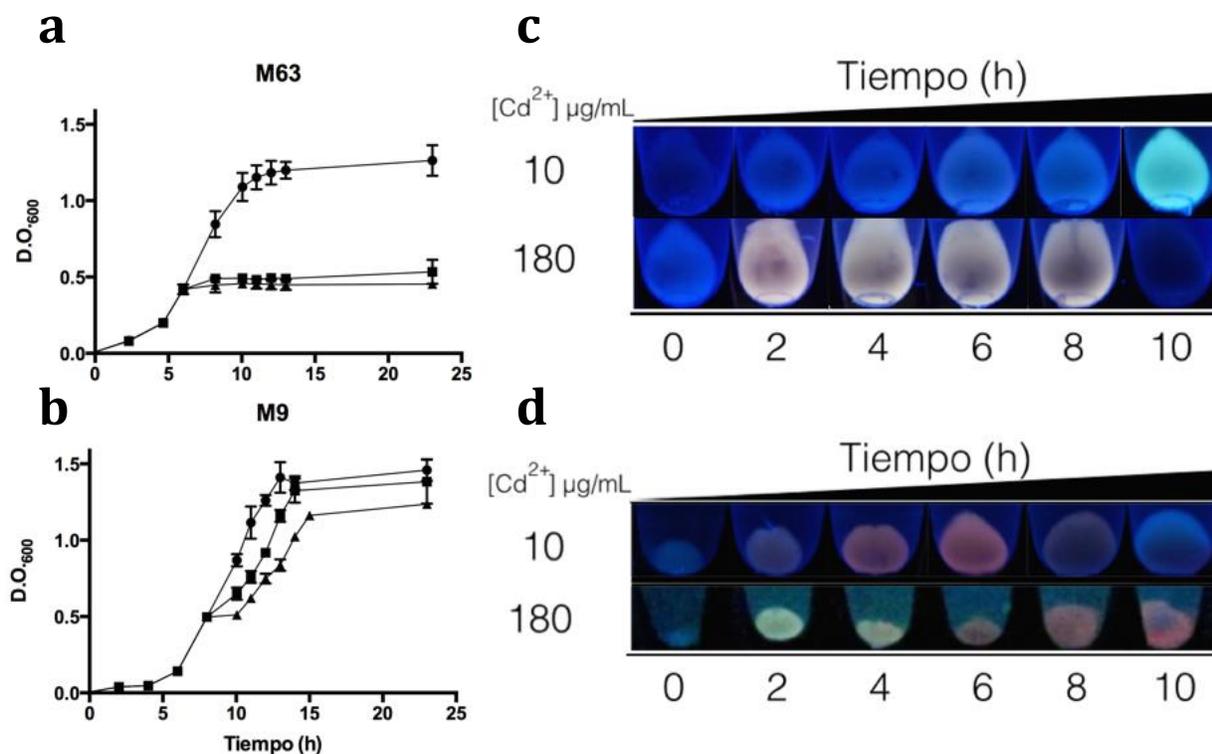


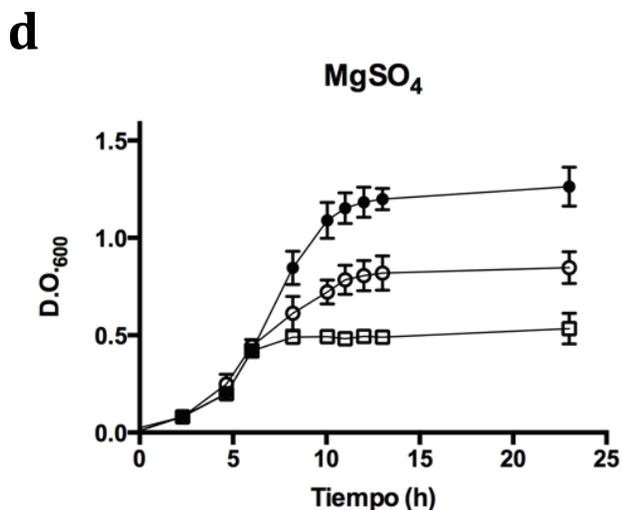
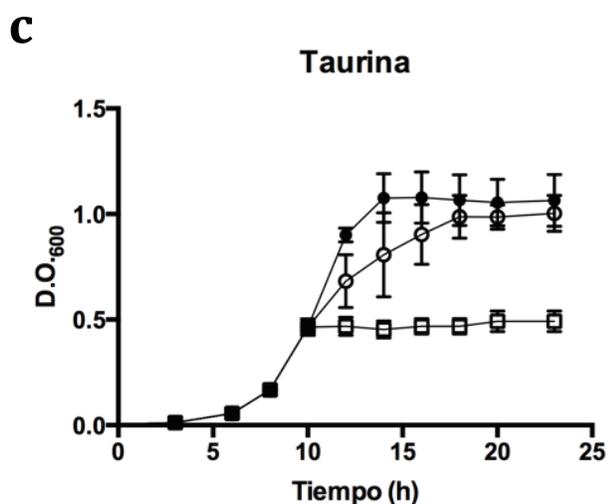
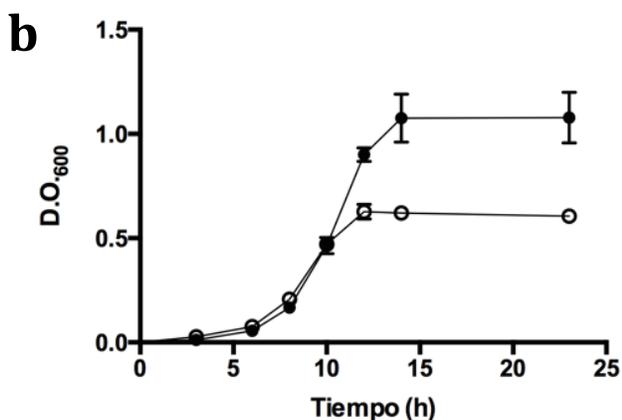
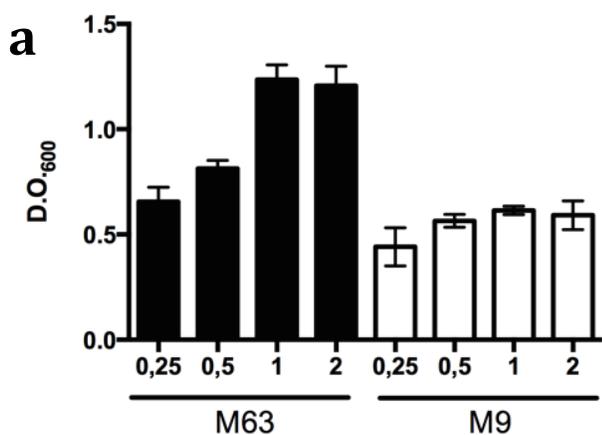
Figura 10. Biosíntesis de NPs fluorescentes durante la fase de crecimiento exponencial de *E. coli* en medio mínimo. a y b, curva de crecimiento de *E. coli* en M63 y M9 sin tratar (●) y tratada con concentraciones de 10 (■) y 180 (▲) $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Cd^{2+} , respectivamente. El metal fue adicionado en fase exponencial (DO_{600} 0.4 - 0.5) para asegurar el crecimiento del cultivo junto al proceso de síntesis. **c y d**, cinética de fluorescencia de los ensayos de biosíntesis para los tratamientos con 10 y 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cadmio en M63 y M9 respectivamente. Alícuotas del cultivo fueron tomadas cada 2 h luego del tratamiento con el metal, centrifugadas y expuestas a luz UV (λ ex. 365 nm).

Objetivo 2.- Efecto de Cd^{+2} en el metabolismo central de *E. coli* usando taurina como fuente de azufre.

2.1 Efecto de taurina como fuente de azufre sobre la tolerancia de *E. coli* a Cd^{+2} .

Como el medio M9 no ha sido comunicado en literatura para evaluar taurina como fuente de S, se evaluó el crecimiento de *E. coli* en este medio y se comparó con M63. Además, se decidió determinar la concentración de taurina óptima para el crecimiento en ambos medios. Para esto se creció *E. coli* en ambos medios mínimos con diferentes concentraciones de taurina y se evaluó el crecimiento luego de 20 h de incubación (Figura 11a). Los resultados mostraron un mayor crecimiento en M63 al utilizar las mismas

concentraciones de taurina, alcanzando un máximo en ambos medios en presencia de 1 mM de taurina. A continuación se analizaron las curvas de crecimiento a dicha concentración de taurina en ambos medios para comparar las distintas fases del crecimiento (Figura 11b). En ambos medios existen fases de crecimiento “lag” de duración similar. No obstante, las células en M63 presentan una fase exponencial de crecimiento más extensa, lo que permitirá evaluar de mejor manera cambios en la tasa de crecimiento por efecto del metal. Finalmente, la fase estacionaria se alcanzó en forma temprana para el medio M9 (12 h de incubación). Por otra parte, al comparar los resultados de crecimiento utilizando taurina como fuente de azufre en medio M63 y M9 y los obtenidos para (Figura 10a) se distinguen perfiles muy similares, lo que indicó que *E. coli* utiliza ambas fuentes de S con similar eficiencia .



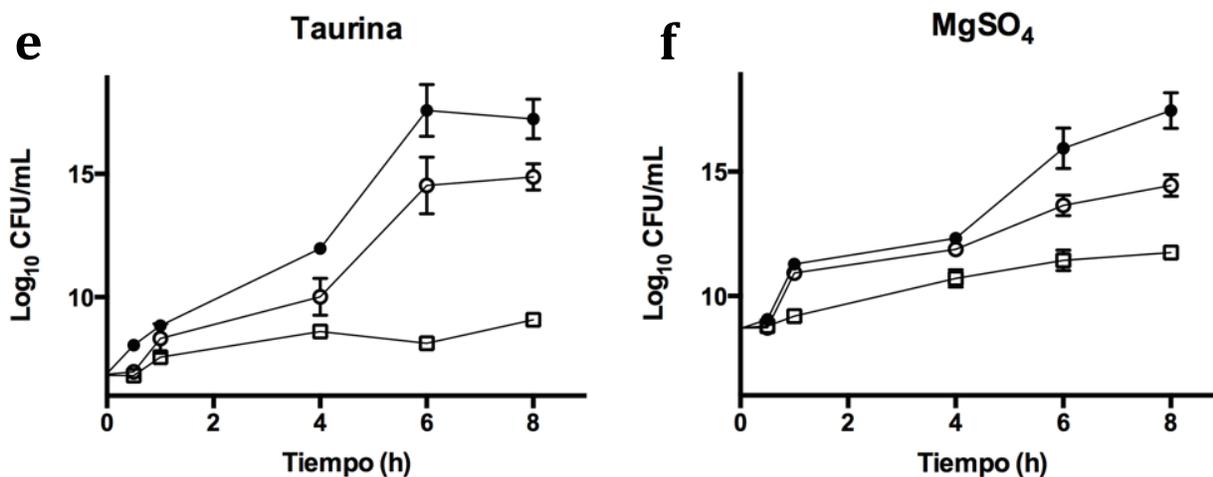


Figura 11. Efecto de la taurina sobre la toxicidad del Cd²⁺ en cultivos de *E. coli*. a, DO₆₀₀ final de cultivos de *E. coli* en presencia de taurina 0,25, 0,5, 1 y 2 mM en medio M63 (columnas negras) o M9 (columnas blancas) luego de 20 h de incubación a 37 °C. b, curva de crecimiento de *E. coli* en M63 (●) o M9 (○) con taurina 1 mM. c, curvas de crecimiento de *E. coli* en M63 con 1 mM de taurina en ausencia del metal (●) y en presencia de 5 (○) y 10 (□) µg/mL de Cd²⁺. d, curvas de crecimiento de *E. coli* en M63 con 1 mM de sulfato en ausencia del metal (●) y en presencia de 5 (○) y 10 (□) µg/mL de Cd²⁺. e, UFC en el tiempo de *E. coli* en M63 usando taurina 1mM en ausencia del metal (●) y en presencia de 5 (○) y 10 (□) µg/mL de Cd²⁺. f, UFC en el tiempo de *E. coli* en M63 usando sulfato 1mM en ausencia del metal (●) y en presencia de 5 (○) y 10 (□) µg/mL de Cd²⁺. Los cultivos fueron tratados durante fase exponencial (DO₆₀₀ 0,4 – 0,5) e incubados a 200 rpm y 37 °C.

Basados en estos resultados se decidió utilizar M63 como medio de cultivo para estudiar el efecto de taurina sobre la tolerancia de *E. coli* a Cd²⁺. A continuación, se determinó la CIM de Cd²⁺ para *E. coli* creciendo en ambas fuentes de S (taurina y sulfato). Los resultados mostraron que *E. coli* presenta una CIM de 20 µg/mL independiente de la fuente de S, por lo que se decidió ocupar dos concentraciones de cadmio, una lejana al CIM, 5 µg/mL y una cercana, 10 µg/mL.

Cultivos de *E. coli* en M63 utilizando taurina o sulfato como fuentes de S fueron tratados con 5 y 10 µg/mL Cd²⁺ durante la fase exponencial. La Figura 11c muestra el efecto del cadmio sobre el crecimiento de *E. coli* utilizando taurina como fuente de S. Si bien, al tratar el cultivo con 5 µg/mL de Cd²⁺ el crecimiento se ve afectado, éste llega a un nivel similar al control con un importante efecto sobre la tasa de crecimiento. Por otra parte, cuando el cultivo es tratado con 10 µg/mL del metal el crecimiento se detiene abruptamente sin retornar a niveles normales (Figura 11c).

La Figura 11d muestra el efecto del metal sobre cultivos de *E. coli* utilizando sulfato como fuente de S. Interesantemente, al ser tratados con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Cd^{2+} éstos no retornan a niveles de crecimiento similares al control, a pesar que continúan creciendo, lo que constituye una diferencia respecto a la respuesta de *E. coli* utilizando taurina como fuente de S. Para confirmar estos resultados, se evaluó las UFC en el tiempo luego del tratamiento con el metal. La Figura 11e muestra cómo varían las UFC de un cultivo con taurina como fuente de S luego de ser tratado con cadmio. Se determinó que con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del metal el cultivo disminuye su crecimiento sin alcanzar niveles similares al control. Al comparar estos resultados con los de los cultivos utilizando sulfato como fuente de S (Figura 11f), se observa que con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Cd^{2+} el efecto del metal resulta muy similar respecto a lo encontrado con taurina, descartando una diferencia entre ambas fuentes. Ahora bien, de existir diferencias en las respuestas, éstas deberán ser estudiadas mediante metodologías más finas, las que permitan discriminar cambios en vías metabólicas específicas o en la generación de algún metabolito de interés, en particular relacionado con la síntesis de QDs de CdS.

Modelamiento del efecto de la síntesis de QDs de CdS sobre los flujos metabólicos usando sulfato como fuente de azufre.

Efecto de Cd sobre los parámetros de crecimiento de E. coli en cultivos batch.

Para simular el comportamiento de los flujos metabólicos en las condiciones de cultivo estudiadas, es necesario incorporar parámetros fisiológicos obtenidos de manera experimental. Para esto, se desarrolló ensayos de biosíntesis que presentaran una única tasa de crecimiento por cultivo donde evaluar dichos parámetros. En base a esto se modificó el protocolo de síntesis original y se agregó el metal junto con el inóculo. Cultivos de *E. coli* MG1655 fueron crecidos en matraz con agitación vigorosa, usando medio M9 con sulfato como fuente de S (condiciones regularmente utilizadas en estudios de flujos metabólicos) e incubados con Cd^{2+} 10, 20, 40 o 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El crecimiento fue evaluado mediante DO_{600} y la tasa de crecimiento fue calculada en cada caso. Los resultados de la

Figura 12a y 12b muestran un efecto de dosis dependencia entre la tasa de crecimiento y la concentración del metal, encontrando una disminución desde 0,46 (control) a 0,41 y 0,35 h⁻¹ para los tratamientos con Cd²⁺10 y 20 µg/mL, respectivamente. En los tratamientos con Cd²⁺40 y 80 µg/mL, la tasa de crecimiento decayó aún mas hasta 0,20 y 0,17 h⁻¹, respectivamente (Figura 12a y 12b). Esta disminución en la tasa de crecimiento respecto a la concentración de cadmio alcanza una fase “plateau” a altas concentraciones del metal, sugiriendo una “saturación” del efecto de cadmio, talvez debida a la máxima velocidad del transportador en la membrana.

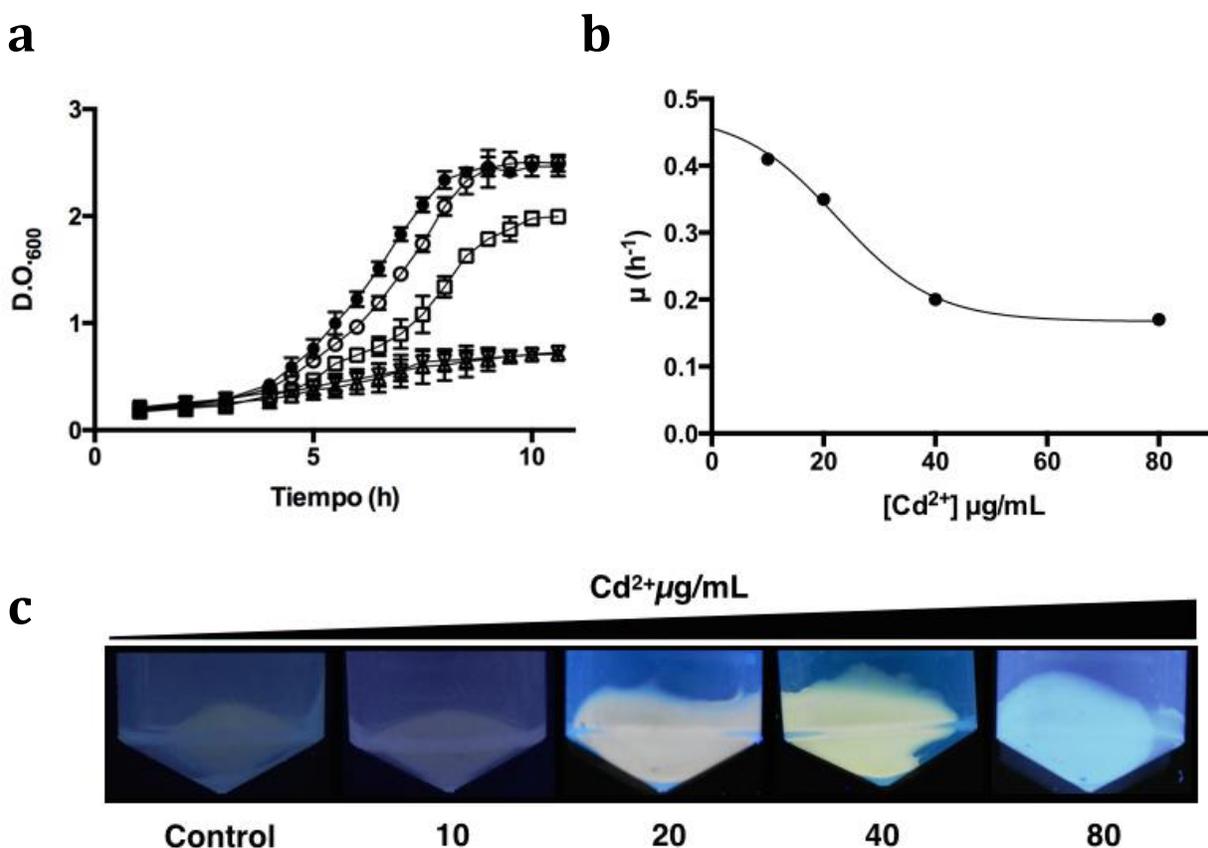
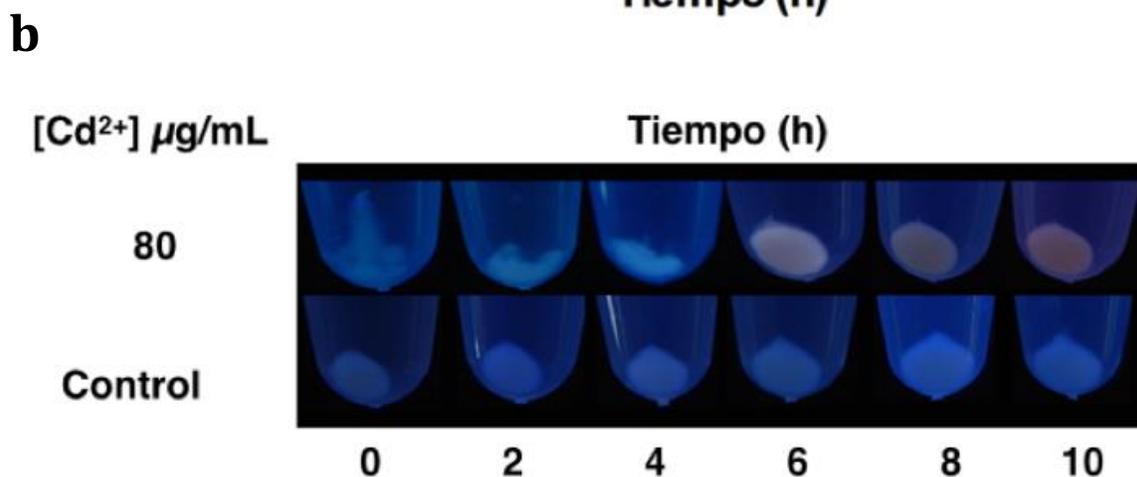
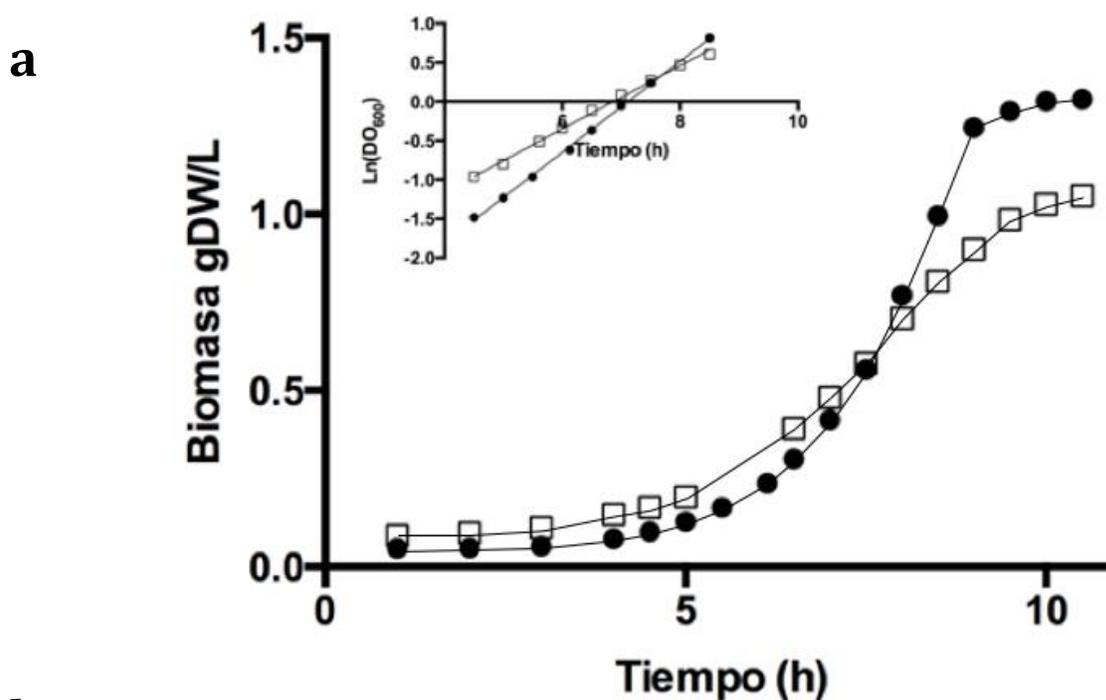


Figura 12. Efecto del cadmio sobre la tasa de crecimiento de *E. coli* en condiciones de biosíntesis de QDs. a, curvas de crecimiento de *E. coli* MG1655 en M9 (sulfato 1 mM) incubada con 0 (●), 10 (○), 20 (□), 40 (▽) y 80 (△) µg/mL de Cd²⁺ desde el inicio del cultivo. **b**, cambios en la tasa de crecimiento (µ, h⁻¹) en cultivos de *E. coli* tratados con 0, 10, 20, 40 y 80 µg/mL de Cd²⁺. Los valores de tasa de crecimiento encontrados fueron 0,46, 0,41, 0,35, 0,20 y 0,17 h⁻¹ respectivamente. Se realizó un ajuste sigmoideal a los datos, encontrando un R² de 0,9980. **c**, screening de biosíntesis de QDs. Fotografías de pellets bacterianos de cultivos de *E. coli* sin cadmio (control) y con Cd²⁺ 10, 20, 40 o 80 µg/mL luego de 7 h de incubación y expuestos a luz UV (λ ex. 365 nm).

Por otra parte, el “screening” de biosíntesis de QDs durante la fase exponencial de crecimiento mostró resultados positivos sólo para los tratamientos con 20, 40 y 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del metal. En la Figura 12c se observa la fluorescencia de los cultivos asociada a la generación de QDs luego de 7 h de incubación. Existe una dependencia entre el color de emisión y la concentración con la cual se trató al cultivo, donde color verde fué encontrado para el tratamiento con 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y un color rojo y amarillo fue encontrado para los cultivos tratados con Cd^{2+} 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente (Figura 12c).

Finalmente, Cultivos de *E. coli* MG1655 en medio M9 usando sulfato como fuente de S fueron crecidos en un reactor según lo descrito en Métodos. En la Figura 13a, se muestra la concentración de la biomasa (gDW/L) generada en el tiempo, donde se encontró una disminución en la biomasa final durante el tratamiento con 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Cd^{2+} . Se calculó las



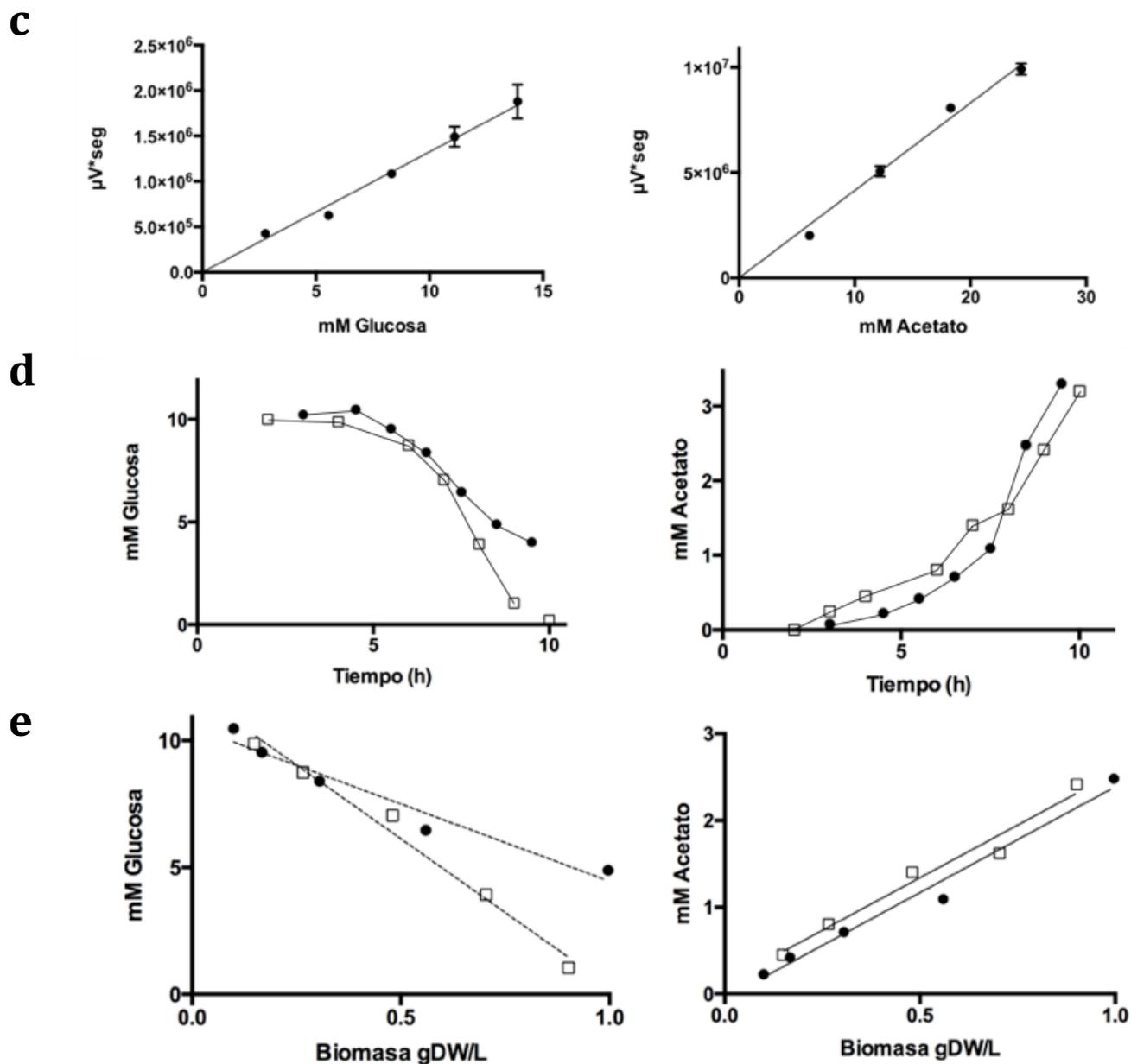


Figura 13. Determinación de parámetros fisiológicos para el MCMC. **a**, biomasa (gDW/L) generada en el tiempo por cultivos de *E. coli* MG1655 en M9 (sulfato 1 mM) en reactor e incubada con 0 (●) o 80 (□) $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Cd^{2+} . El "inset", muestra la regresión lineal para el cálculo de la tasa de crecimiento durante la fase exponencial del cultivo. Los valores encontrados fueron 0,58 y 0,42 h^{-1} respectivamente. **b**, screening de biosíntesis de QDs. Las fotografías corresponden a pellets bacterianos de cultivos de *E. coli* sin cadmio (control) y tratado con 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Cd^{2+} expuestos a luz UV (λ ex. 365 nm). **c**, curvas de calibración de estándares comerciales para determinar concentración de glucosa (izquierda) y acetato (derecha). El R^2 en ambos casos fue de 0.99. **d**, gráficos de consumo de glucosa (izquierda) y producción de acetato (derecha) en el tiempo para cultivos de *E. coli* incubada con 0 (●) y 80 (□) $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Cd^{2+} . **e**, gráficos de la concentración de glucosa (izquierda) y concentración de acetato (derecha) en función de la biomasa producida en cultivos de *E. coli* incubada con 0 (●) y 80 (□) $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Cd^{2+} .

tasas de crecimiento en ambas condiciones (0 y 80 $\mu\text{g/mL}$ de Cd^{2+}) y se observó una disminución desde $0,58 \text{ h}^{-1}$ para el control hasta $0,42 \text{ h}^{-1}$ para el tratamiento con el metal, lo que explica las diferencias en la biomasa final generada (Figura 13a). Además, se realizaron ensayos de “screening” de biosíntesis, donde se encontró generación de NPs fluorescentes de color verde a partir de las 2 h de incubación, las que cambian de color hasta una tonalidad anaranjada luego de 8 h (Figura 13b).

Otro parámetro experimental determinado fue el consumo de glucosa y generación de acetato en el tiempo en condiciones de biosíntesis. En ambos casos (0 y 80 $\mu\text{g/mL}$ de Cd^{2+}), se observó una disminución de los niveles de glucosa a medida que el cultivo crecía (Figura 13d). Para la condición control, la fase estacionaria de crecimiento se alcanza sin consumir totalmente los niveles de glucosa presentes en el medio, mientras que para el cultivo tratado con 80 $\mu\text{g/mL}$ de Cd^{2+} la glucosa fue consumida absolutamente, lo que indica un aumento en la velocidad de consumo cuando el metal se encuentra presente en el medio. Para el acetato, por otra parte, en ambos casos se observó un aumento de su concentración a medida que el cultivo crece, obteniendo niveles muy parecidos para ambas condiciones experimentales (Figura 13d). Para confirmar el efecto sobre las velocidades, éstas fueron calculadas a partir de los niveles de glucosa y acetato en función de la biomasa generada en el intervalo de la fase de crecimiento exponencial (Figura 13e). Se obtuvo un aumento en el consumo de glucosa de 3,5 a 4,77 mmoles de glucosa consumidos por gramo de peso seco por hora ($\text{mmol glucosa/gDW}\cdot\text{h}$) para el cultivo control y el cultivo tratado con cadmio, respectivamente. Ahora bien, se determinó una disminución en el rendimiento de biomasa por unidad de glucosa consumida (Y_{biomasa}) desde 0,16 a 0,09 gDW/mmol de glucosa (Figura 13e). Esto explica por qué aún teniendo un aumento en la velocidad de consumo de glucosa cuando *E. coli* es tratada con el metal, la biomasa final generada no es igual a la del tratamiento control. Además, sugiere que parte de la glucosa consumida no está siendo destinada a la generación de biomasa, probablemente producto de un cambio en la distribución de flujos metabólicos. Por otra parte, el cálculo de la velocidad de generación de acetato indicó una disminución desde 1,42 a 0,99 mmol de acetato/ $\text{gDW}\cdot\text{h}$ para el cultivo control y el cultivo tratado con 80 $\mu\text{g/mL}$ de Cd^{2+} , respectivamente (Figura 13e). Por último, el rendimiento de generación de acetato por unidad de glucosa consumida presentó variaciones, encontrando en condiciones sin tratamiento con el metal un valor de

0,37 mmol de acetato/mmol de glucosa y en presencia de éste un valor de 0,21 mmol de acetato/mmol de glucosa.

Finalmente, se determinaron los niveles de ácidos orgánicos y azúcares generados con el propósito de evaluar la actividad de otras rutas metabólicas que dieran cuenta de una redistribución de los flujos metabólicos producto del estrés generado por el cadmio. No se encontró oxalato, citrato, malato, succinato, formato o etanol en ninguno de los sobrenadantes de los cultivos. Todos los resultados experimentales obtenidos sugieren una variación en la distribución de los flujos metabólicos de *E. coli* en condiciones de estrés producido por cadmio durante la síntesis de QDs, por lo que los consumos de glucosa y producción de acetato fueron utilizados como parámetros experimentales para la estimación de los flujos metabólicos más probables, mediante MCMC.

Cambios en la magnitud de los flujos metabólicos por efecto de la síntesis de CdS QDs.

Dado que el modelo de reconstrucción metabólica iJO1366 contempla más de 2000 reacciones que participan del metabolismo de *E. coli*, el análisis de tendencias de flujos por MCMC se enfocó principalmente en la respuesta de las vías centrales, glicólisis, vía de las pentosas fosfato y ciclo del ácido tricarboxílico (CAT). De manera adicional se agregaron reacciones que fueron estudiadas por Helbig y cols. (2008) en la respuesta transcripcional de *E. coli* ante el estrés por cadmio [35]. Los resultados de las simulaciones se muestran en el presente trabajo como histogramas de tendencias de cada reacción y como esquemas resumidos (Figura 14 y 15). El estudio de tendencias de flujos metabólicos por MCMC se llevó a cabo utilizando los datos experimentales determinados para los ensayos de biosíntesis de QDs en bioreactor. Los resultados muestran que en condiciones de síntesis de QDs de CdS existe un aumento de la actividad del CAT donde 9 de las 11 reacciones que contempla el modelo presentaron un aumento en la magnitud de sus flujos, mientras que el resto permaneció constante, lo que explicaría el aumento en el consumo de glucosa y una disminución en el rendimiento de la generación de acetato (Figura 15a). Entre las reacciones que presentaron un aumento significativo destaca un aumento en la actividad de las enzimas Aconitasa (ACONT) y la actividad de la enzima Fumarasa (FUM). Acompañando a esto se observó un leve aumento en algunas de las reacciones involucradas

en el catabolismo de la glucosa a través de la glicólisis. Interesantemente y a pesar de encontrarse frente a un agente oxidante como el cadmio, la predicción del uso de glucosa a través de la vía de las pentosas fosfato no se vió modificada manteniendo niveles similares al control (Figura 15a) [56].

Dentro de las reacciones de interés estudiadas se encuentra la enzima Tioeredoxina Reductasa (TRDR), por su rol en la mantención del “pool” de tioles reducidos al interior de la célula durante el estrés por cadmio y como mecanismo de respuesta antioxidante [35, 57]. Interesantemente, el flujo metabólico para la TRDR se encuentra aumentado en condiciones de biosíntesis de QDs de CdS, lo que concuerda con lo descrito anteriormente y coincide con un efecto de respuesta ante la depleción de tioles producto del metal (Figura 15b) [35]. Una de las consecuencias de la oxidación de tioles intracelulares es la generación de ROS. Estas especies afectan las membranas celulares y son capaces de generar aldehídos altamente reactivos entre los que se encuentra el formaldehído (CH_2O) [35,58]. Helbig y cols. (2008) propusieron la eliminación de este compuesto a través de su interacción con triptofano (Trp), generando N-metilriptofano (N-metrp), el que sería excretado de la célula por un mecanismo no descrito por los autores [35]. La propuesta de Helbig y cols. (2008), es plausible bajo nuestras condiciones de estudio ya que, los resultados de las simulaciones arrojaron un aumento en la actividad de las enzimas triptofano sintasa 2 y 3 (TRPS2 y 3) (Figura 15b), pertenecientes al operon *trp*, encargado de la biosíntesis de Trp el cual es activado ante bajas concentraciones del amino ácido. Sin embargo, dado que la reacción propuesta por Helbig y cols. no pertenece al modelo, nuestras simulaciones coinciden pero no se correlacionan con el mecanismo de eliminación señalado.

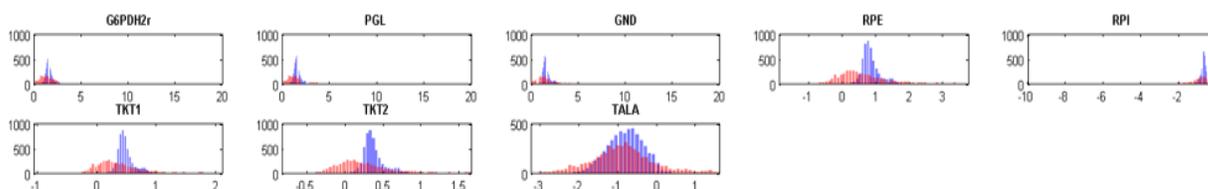
Otras de las vías metabólicas estudiadas bajo el estrés por cadmio corresponde a la vía de reducción del sulfato, el que puede ser considerado como uno de los flujos más relevantes para síntesis de QDs ya que presenta la actividad enzimática de reducción de sulfito a H_2S mediada por la sulfito reductasa (SulRi). Los análisis de tendencias de flujos muestran un claro aumento en el flujo de SulRi, lo que significa un aumento en la generación de H_2S (Figura 15c). No obstante, dicho H_2S pudiese estar siendo utilizado para síntesis de cisteína compitiendo con la formación de QDs [35,26]. Se analizó el flujo de la enzima cisteína sintasa (CYSS), capaz de transformar el H_2S en cisteína, el que presentó una

disminución (Figura 15c), consistente con una disminución de la velocidad de crecimiento. Se recalca que en nuestro modelamiento el cadmio estaría secuestrando el H₂S (el cual a su vez proviene íntegramente desde sulfato) constituyendo una diferencia relevante respecto a una respuesta típica frente al metal, en donde se aumenta la expresión del gen que codifica para CYSS [35,26].

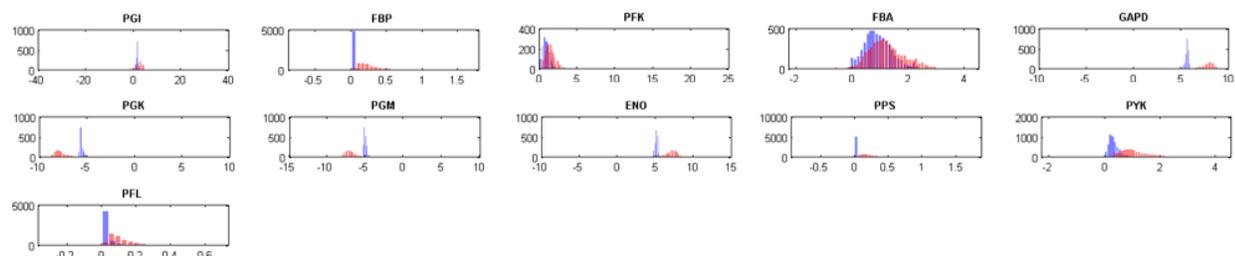
En conjunto, estos resultados indican que en condiciones de biosíntesis de QDs de CdS existe una respuesta a cadmio mediada por su efecto como oxidante de tioles intracelulares, lo que se ve contrarrestado con un aumento en los flujos del CAT, de reducción de tioredoxinas y de generación de H₂S. Lamentablemente, la evaluación de las tendencias de flujos para cultivos de *E. coli* sintetizando QDs de cadmio y utilizando taurina como fuente de S no pudo ser llevada a cabo y no se encuentran dentro del análisis del presente trabajo. El desarrollo de dicha investigación podrá ser abordado en futuros proyectos y permitirá entender de mejor manera las diferencias en la respuesta a cadmio entre ambas fuentes de S. No obstante, es de esperar que gran parte de la respuesta a cadmio utilizando taurina como fuente de S pueda ser entendida con las simulaciones aquí planteadas, dado que las respuesta encontradas en el objetivo 2.1 fueron muy similares y el mecanismo de generación de H₂S a partir de taurina converge en la reducción del sulfito al igual que en el caso del sulfato.

Histogramas de tenencia de flujos metabólicos

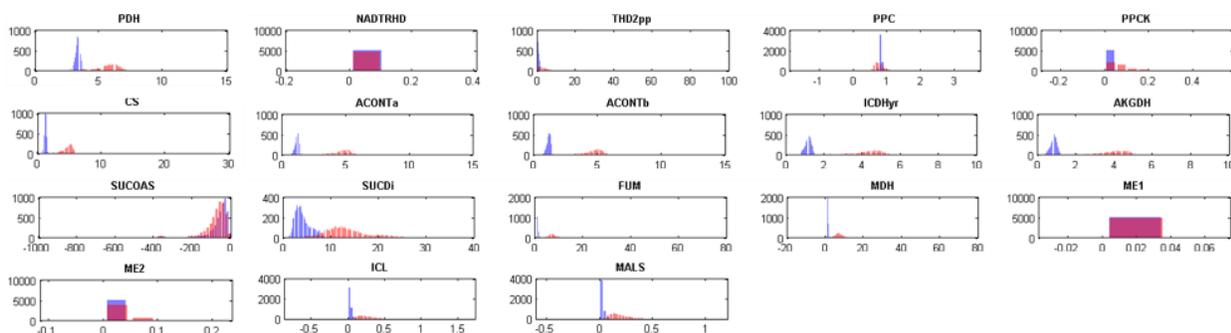
Ruta de las pentosas fosfato



Glicólisis



Ciclo del ácido tricarboxílico



Otros

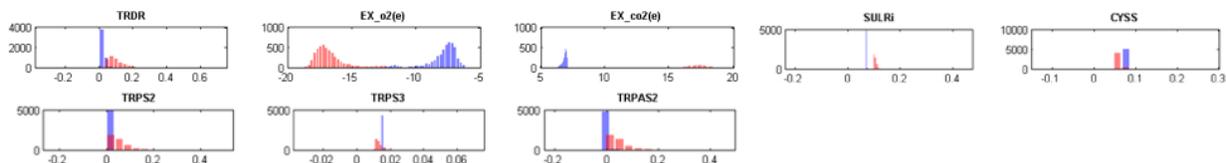
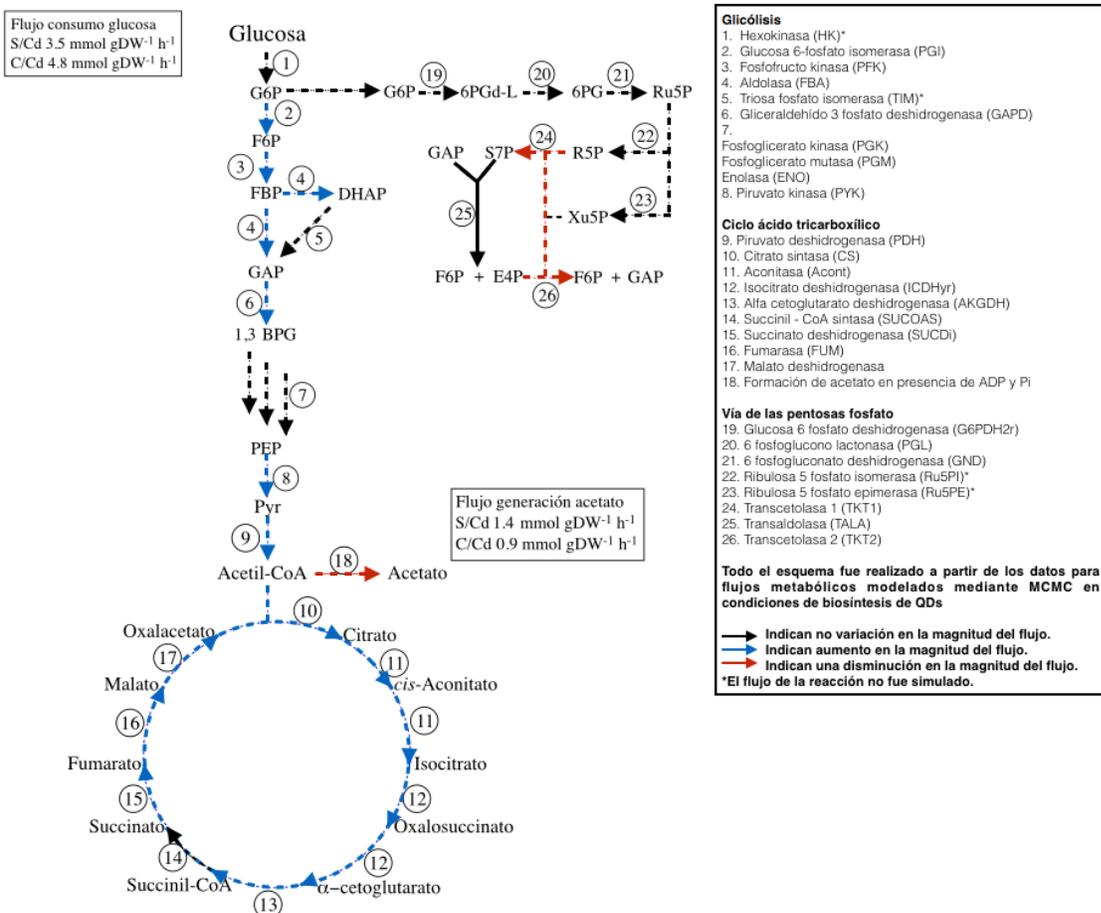


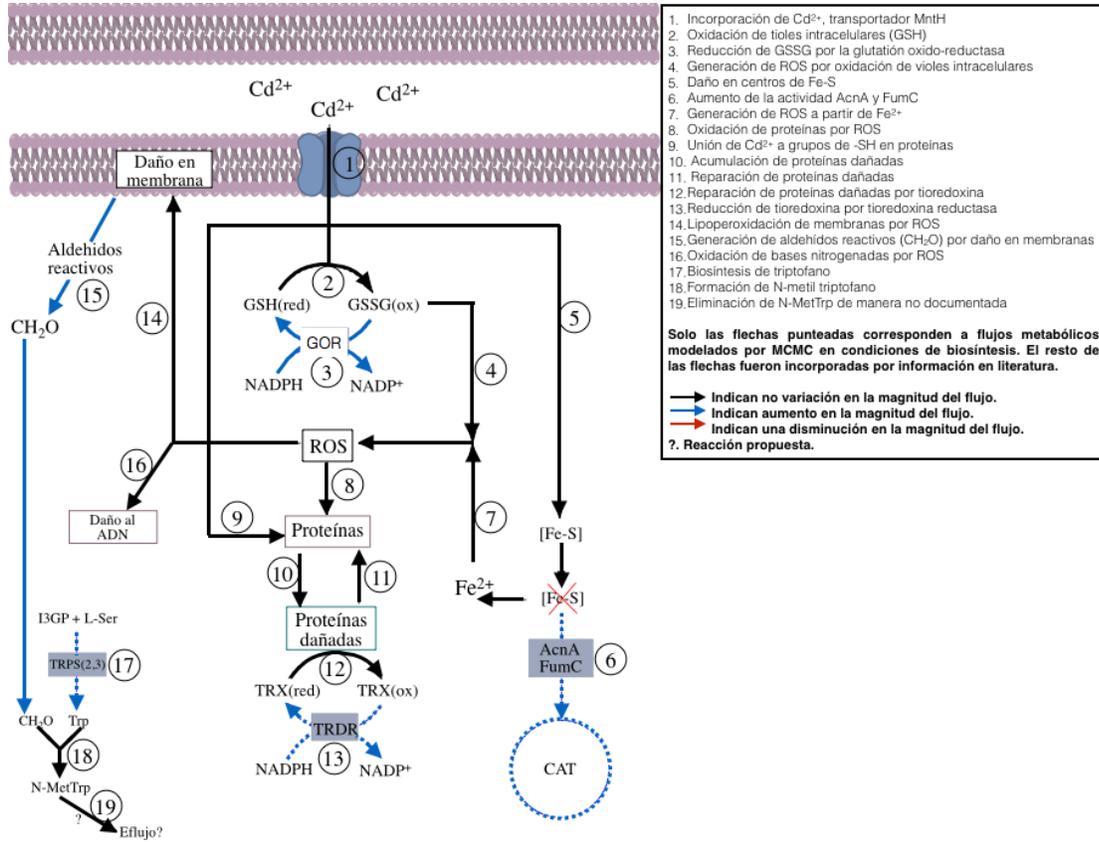
Figura 14. Histogramas de tendencia de flujos metabólicos en condiciones de biosíntesis de QDs de CdS mediante análisis de MCMC. En azul se representa la tendencia o histograma para flujos metabólicos de *E. coli* MG1655 en ausencia de cadmio en medio M9 utilizando sulfato como única fuente de azufre a 37 °C y 200 rpm. En rojo se muestran los histogramas para flujos metabólicos en presencia de 80 µg/mL de Cd²⁺ bajo las mismas condiciones de incubación. En el eje Y se representa la frecuencia con la que acontece un determinado flujo, mientras que en el eje X se muestra la magnitud o valor del flujo (mmol/gDW h). La nomenclatura de las reacciones se encuentra detallada en la sección del Anexo “Reacciones MCMC” al final de este trabajo.

a Simulación de tendencia de flujos metabólicos de las vías centrales de *E. coli* en condiciones de biosíntesis de QDs de CdS



b

Modelo de toxicidad del Cd²⁺ en *E. coli* en condiciones de biosíntesis de QDs de CdS



C

Modelo del metabolismo del sulfato en condiciones de biosíntesis de QDs de CdS

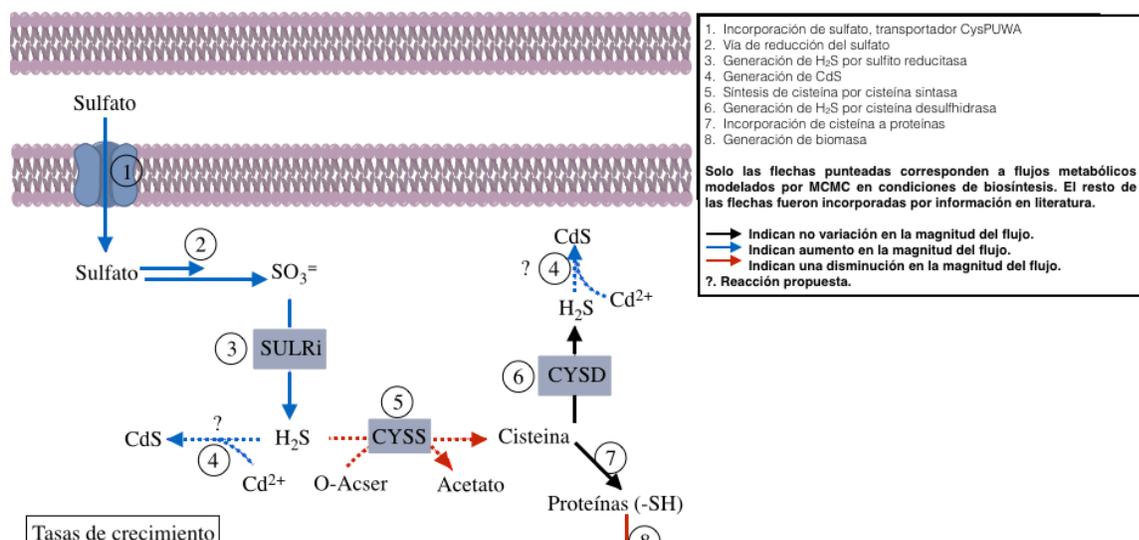


Figura 15. Efecto del cadmio en flujos metabólicos en condiciones de biosíntesis de QDs de CdS en *E. coli*. **a**, efecto del Cd²⁺ sobre el metabolismo central de *E. coli* en condiciones de biosíntesis de QDs de CdS. **b**, toxicidad de Cd²⁺ en *E. coli* en condiciones de biosíntesis de QDs de CdS. **c**, efecto del Cd²⁺ sobre el metabolismo del sulfato en condiciones de biosíntesis de QDs de CdS. La figura **a**, corresponde, en su totalidad a reacciones simuladas mediante el toolbox COBRA para el software Matlab mediante muestreo MCMC. Por otra parte **b** y **c**, presentan solo algunas reacciones modeladas (flechas punteadas) y el resto de las reacciones fueron incorporadas por evidencia empírica de aumento en la actividad enzimática o expresión génica descrita en literatura.

Objetivo 3.- Evaluación de la biosíntesis de quantum dots de CdS en *E. coli* utilizando taurina como fuente de azufre.

3.1.- Evaluación del efecto de la taurina como fuente de azufre en la biosíntesis de quantum dots de CdS en *E. coli*.

Para poder evaluar el efecto de la taurina como fuente de S en la síntesis de QDs, se realizaron experimentos de biosíntesis en cultivos de *E. coli* BW25113 en presencia de taurina o sulfato con Cd^{2+} 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Basados en los resultados mostrados anteriormente (Figura 10c), se decidió evaluar la aparición de fluorescencia en los cultivos luego de 12 h de incubación con el metal. La Figura 16a muestra los resultados para experimentos de biosíntesis en cultivos con taurina como fuente de S. En ellos se observó aparición de fluorescencia color cian (celeste) a las 12 h de tratamiento con el metal para los cultivos con 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A distintos tiempos el color de emisión varió desde verde a rojo, alcanzando a las 24 y 36 h colores amarillos y rojizos, respectivamente. Estos resultados son sumamente interesantes, pues indican la capacidad de sintetizar una amplia gama de colores de NPs utilizando concentraciones bajas de cadmio y por primera vez, utilizando taurina como fuente de S. Por otra parte, cabe señalar que la fluorescencia encontrada no se aprecia en los cultivos antes del tratamiento, ni en los cultivos sin tratar, por lo que la fluorescencia está asociada plenamente al tratamiento con el metal.

Finalmente, en la Figura 16b se muestran los resultados para el ensayo de biosíntesis utilizando sulfato como fuente de S. Al igual que en la Figura 16a, en ambas condiciones se biosintetizan QDs. Sorprendentemente, al tratar el cultivo con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Cd^{2+} se observó una fluorescencia verde a las 12 h lo que difiere de los resultados anteriores, aún mas, a medida que el tiempo avanza no se apreció un cambio en el color de emisión como si ocurre en la biosíntesis con taurina, lo que puede deberse a la formación de NPs distintas o a procesos de producción diferentes. Cuando el cultivo es tratado con el doble de la concentración del metal sí se observa cambios en los colores de emisión, la que finalmente se pierde luego de 36 h de incubación, fenómeno que no ocurre en el tratamiento con taurina.

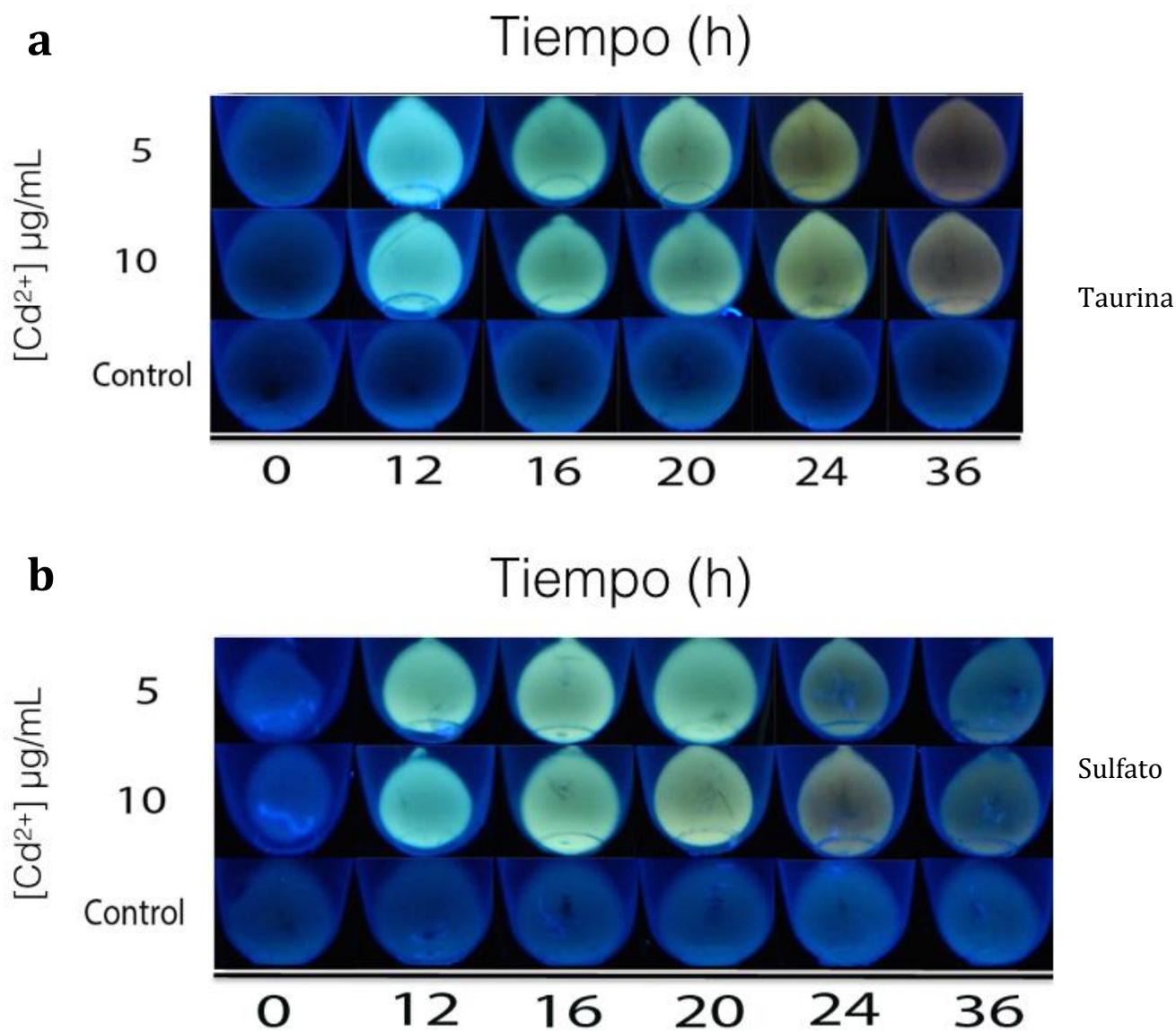


Figura 16. Biosíntesis de QDs de CdS. **a**, pellets de cultivos de *E. coli* en medio M63 con taurina 1 mM. **b**, pellets de cultivos de *E. coli* en medio M63 con sulfato 1 mM. Los tratamientos de los cultivos en ambos casos correspondieron a: sin tratar (control) y con 5 o 10 µg/mL de Cd²⁺. Las muestras fueron centrifugadas y expuestas a luz UV (λ_{ex} 365 nm). Las alícuotas fueron tomadas luego de 0, 12, 16, 20, 24 y 36 h de exposición al metal. Los cultivos fueron tratados en fase exponencial (DO₆₀₀ 0,4 - 0,5),

3.2.- Evaluación del rol del H₂S y COSV en la biosíntesis de quantum dots de CdS en cultivos de *E. coli* utilizando taurina como fuente de azufre.

Las vías de generación H₂S a partir de sulfato y taurina difieren, por lo que se decidió determinar la generación de H₂S en ambos casos para ver si dan cuenta de las diferencias encontradas durante la biosíntesis. Para esto, se detectó H₂S en cultivos de *E. coli* en presencia de cisteína, metionina, sulfato o taurina como fuentes de azufre. La cisteína ha sido descrita en procesos de biosíntesis como una fuente eficaz para la generación de H₂S (Bai y cols., 2009) por lo que fue utilizada como control positivo de la reacción. Por otra parte, la metionina se relaciona con la generación de MeSH, por lo que fue utilizada como control negativo del fenómeno [26,22]. Los resultados obtenidos para cisteína muestran una eficiente liberación de H₂S (Figura 17), mientras que en el caso de metionina no existe liberación de sulfuro, lo que tampoco ocurre en el caso de la taurina. Interesantemente, con sulfato existe una leve generación de H₂S (precipitado gris).

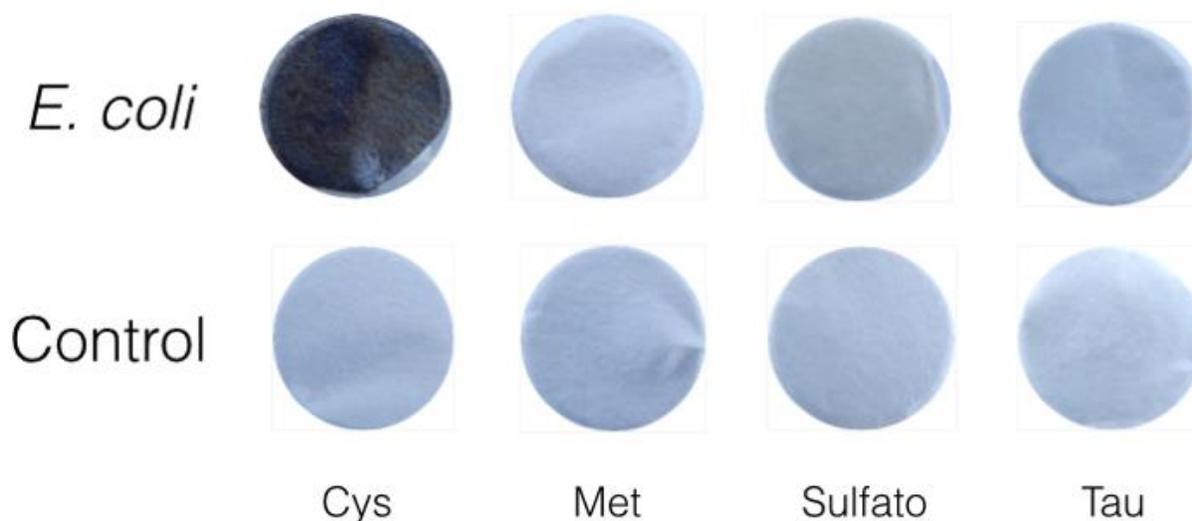


Figura 17. Detección de H₂S generado en cultivos de *E. coli* por el método de acetato de plomo. Cultivos de *E. coli* crecidos hasta fase exponencial (DO₆₀₀ 0,6) fueron centrifugados (5.000 rpm, 10 min) y suspendidos en medio M63 suplementado con Cisteína (Cys), Metionina (Met), Sulfato o Taurina (Tau) 1 mM como única fuente de S. Los cultivos fueron incubados a 37 °C durante la noche en tubos Eppendorf sobre los que se depositó papeles embebidos con acetato de plomo (asegurando la exposición del papel con el headspace del cultivo). El control corresponde a medio M63 con cada fuente de azufre sin inocular para evaluar la generación de H₂S del medio.

Estos resultados sugieren en primera instancia que la generación de NPs en cultivos con taurina, no depende de la producción de H_2S , lo que implica necesariamente un mecanismo de síntesis distinto a lo hasta ahora expuesto o la síntesis de un tipo de NP diferente. Una posibilidad sería la presencia de otros compuestos sulfurados en la formación de NPs de cadmio, pues si bien en ambas fuentes de S (taurina y sulfato) existe síntesis de NPs, los niveles de H_2S para el caso de taurina no fueron detectables, lo que ha sido comunicado utilizando metodologías menos sensibles [59,40].

Dado que no existe liberación de H_2S en presencia de taurina, se evaluó la generación de COSV en condiciones de biosíntesis para determinar su relevancia, como fuente de sulfuro en la síntesis de NPs de CdS, dicho objetivo fue realizado en colaboración con el laboratorio de química en la “Sam Houston State University” a cargo del profesor Thomas G. Chasteen. Para esto, cultivos de *E. coli* BW25113 conteniendo taurina o sulfato fueron incubados en tubos sellados para el análisis del espacio cabeza o “headspace” bacteriano. El sello (septum) de los tubos fue perforado para la recolección de las muestras y estas fueron analizadas mediante SCD-GC. A las 24 h de incubación se determinó un pico único a 4,5 min tanto para taurina como para sulfato, el que correspondió a di-metil sulfuro (DMS) (Figura 18a). La identidad de este pico fue confirmada utilizando un estándar comercial como control. Se determinaron los ng de DMS producidos por ambos cultivos tratados con distintas concentraciones de taurina o sulfato utilizando curvas de calibración del compuesto (Figura 18b). Los ng de DMS producidos son mostrados en la Figura 18c, donde se observó un comportamiento de saturación para la generación de DMS dependiente de la concentración de la fuente de S utilizada. Interesantemente se observaron valores mayores de producción de DMS cuando taurina fue utilizada como fuente de S. Los valores máximos de producción de DMS encontrados fueron 82,7 ng/ DO_{600} para taurina 2 mM y de 47 ng/ DO_{600} para sulfato 1 mM. Como los ensayos previos de síntesis de QDs fueron desarrollados a una concentración de 1 mM, lo que coincide con la máxima producción de DMS para sulfato, se utilizó dicha concentración en los ensayos de identificación de DMS en condiciones de biosíntesis.

Para esto, se repitió la determinación de DMS pero esta vez en cultivos tratados durante la fase exponencial de crecimiento utilizando concentraciones de Cd^{2+} desde 0 a 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados muestran que los ng de DMS disminuyen a medida que aumenta la concentración del metal, tanto para cultivos suplementados con taurina como con sulfato (Figura 18d). Estos resultados indican una relación entre la generación de DMS y el estrés

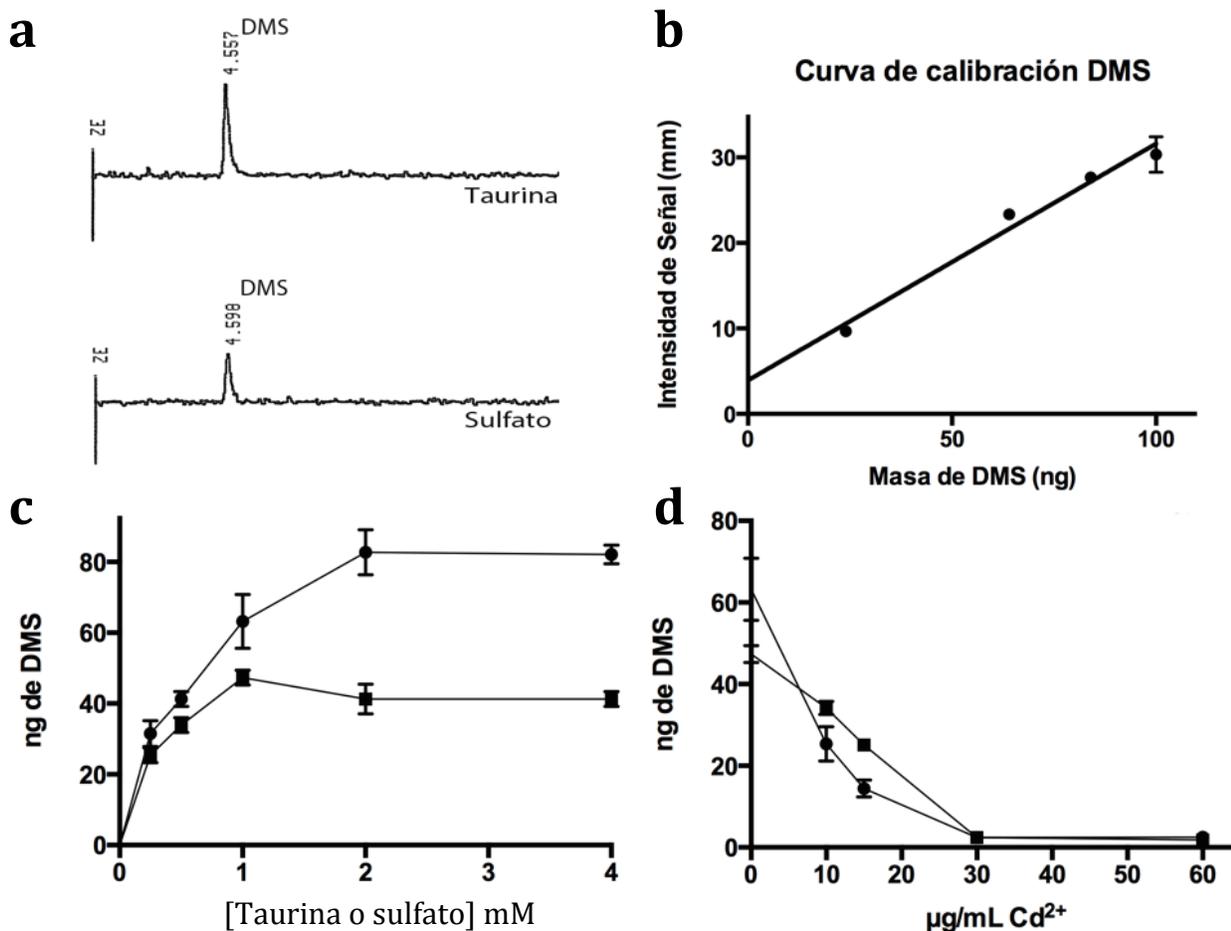


Figura 18. Generación de compuestos organosulfurados volátiles (COSV) en condiciones de biosíntesis de QDs de CdS en *E. coli*. **a**, cromatogramas de headspace de cultivos de *E. coli* crecidas en M63 con taurina y sulfato 1 mM. **b**, curva de calibración de DMS. Se evaluó la intensidad de señal generada para un estándar comercial de DMS variando la masa por inyección de 24 ng hasta 100 ng. El R^2 encontrado fue de 0.97. **c**, cuantificación de DMS (ng) en el headspace de cultivos de *E. coli* en M63 usando taurina (●) o sulfato (■) a 0, 0.25, 0.5, 1, 2 o 4 mM. **d**, cuantificación DMS (ng) en cultivos de *E. coli* en M63 con taurina (●) o sulfato (■) 1 mM, en presencia de 0, 10, 15, 30 o 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Cd^{2+} . La adición del metal fue realizada durante la fase exponencial del crecimiento (DO_{600} 0,4 - 0,5). La detección de los compuestos volátiles fue realizada mediante SCD-GC según lo descrito en Materiales y Métodos. Los ng de DMS fueron normalizados por el valor de la DO_{600} de cada cultivo al momento de la toma de la muestra.

por cadmio durante la síntesis de NPs, fenómeno no descrito a la fecha. Esto puede ser consecuencia de una interacción directa del metal con el DMS o con un precursor de la síntesis de este compuesto volátil.

Para evaluar el rol de otros COSV en la biosíntesis de NPs de CdS, se realizó análisis de headspace de cultivos de *E. coli* BW25113 en medio LB. En este medio de cultivo la biosíntesis de NPs ya ha sido descrita por nuestro grupo de investigación [24,25]. Para esto, cultivos de *E. coli* crecidos en LB hasta fase exponencial fueron tratados con concentraciones de Cd²⁺ de 0 a 60 µg/mL y el headspace de los cultivos fue analizado. Los resultados muestran un aumento en la generación de ng de COSV respecto a lo observado en medio M63. Entre las especies identificadas se encontró MeSH, DMS y DMDS a 2,5, 4,5 y 8,7 min, respectivamente (Figura 19a). Los cultivos de *E. coli* tratados con el metal presentaron una disminución parcial o total de MeSH, mientras que los picos de DMS y DMDS se mantuvieron sin variaciones, lo que sugiere que el MeSH (precursor del DMS) es la molécula con la que interaccionaría el metal (Figura 19a a 19f). Finalmente, se evaluó la fluorescencia de los cultivos tratados con cadmio en medio LB (Figura 19g) y se encontró que sólo en los tratamientos con 10, 20 y 60 µg/mL de Cd²⁺ existe fluorescencia verde al momento del análisis del headspace, lo que indica la generación de NPs de CdS. Coincidentemente, en dichas condiciones no se detectó liberación de MeSH lo que permite concluir que en un medio rico como el LB también existe una relación entre la generación de COSV y la síntesis de NPs.

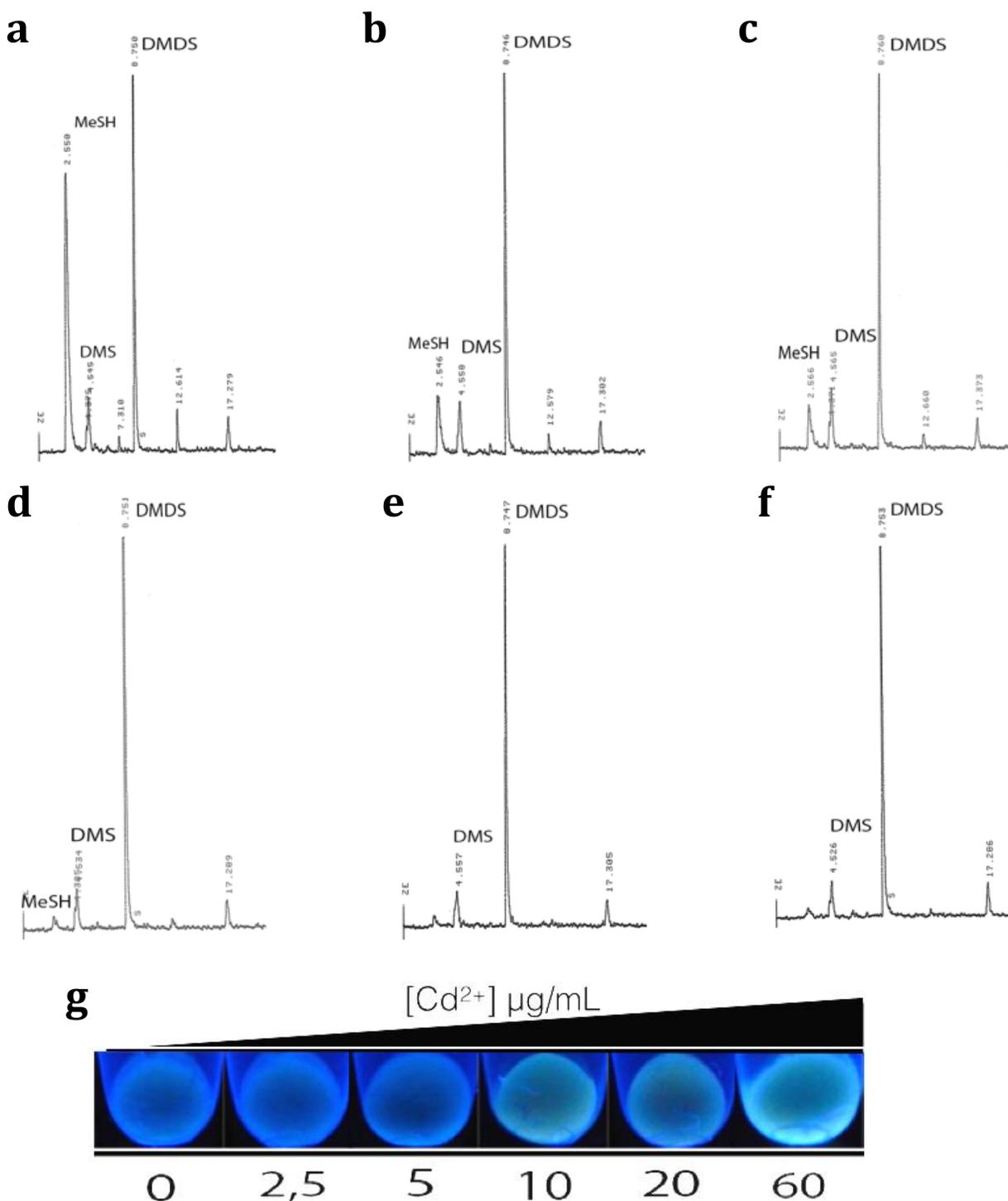


Figura 19. Análisis del cabeza espacio o “headspace” de cultivos de *E. coli* crecidos en medio LB en condiciones de biosíntesis de QDs de CdS. a – f, cromatogramas de headspace de cultivos de *E. coli* crecidos en LB en presencia de 0, 2.5, 5, 10, 20 y 60 µg/mL de Cd²⁺, respectivamente. MeSH, DMS y DMDS corresponden a los picos para metanotiol, dimetil sulfuro y dimetil disulfuro respectivamente. La detección de los COSV fue realizada mediante SCD-GC luego de 16 h de incubación con el metal a 37 °C. **g**, fluorescencia de los cultivos tratados con 0, 2.5, 5, 10, 20 y 60 µg/mL de Cd²⁺. El metal fue adicionado en fase exponencial (DO₆₀₀ 0.4 – 0.5).

Objetivo 4.- Purificación y caracterización de quantum dots de CdS sintetizados en *E. coli* usando taurina como fuente de azufre.

Se estudió las propiedades espectroscópicas, el tamaño y ubicación celular de las partículas producidas para confirmar la síntesis intracelular de QDs de CdS. Para esto, se obtuvo fracciones purificadas de QDs biosintetizados luego de 0, 12 y 24 h de tratamiento de *E. coli* con cadmio usando taurina como fuente de S.

El espectro de absorbancia (Figura 20a) presentó una perturbación en el patrón de las muestras expuestas a cadmio entre las longitudes de onda (λ) de 330 a 400 nm, exhibiendo un característico de QDs de CdS biosintetizados [25,20]. Por otra parte, el espectro de emisión de fluorescencia (Figura 20b) mostró un máximo de λ de emisión a 500 nm luego de 12 h de exposición al metal, lo que corresponde a NPs con un color de emisión verde y de 540 nm luego de 24 h de incubación, correspondiente a NPs con un color de emisión amarillo. El desplazamiento en la λ_{max} de emisión de fluorescencia según el tiempo de incubación con el metal, es señal de un aumento en el tamaño de la NP, lo que corresponde a la formación de QDs. Por otra parte, el espectro de excitación en la Figura 20c mostró una λ_{max} de excitación a 360 nm tanto para las NPs verdes como amarillas, lo que coincide con lo descrito en literatura para los máximos de excitación en QDs de CdS (350 a 470 nm) con rangos de emisión de fluorescencia en el espectro visible [13]. Para el análisis del tamaño de las NPs se realizaron ensayos de DLS (Figura 20d). NPs purificadas de un cultivo de *E. coli* luego de 24 h de incubación con 10 $\mu\text{g/mL}$ de cadmio, presentaron un índice de polidispersidad (PDI) cercano a 0,59, lo que indica la presencia de una distribución de tamaño poblacional monodispersa [60]. Este resultado sugiere un grado de control sobre el proceso de síntesis, permitiendo avanzar a la mayoría de semillas de los nanocristales en forma coordinada al interior de la célula hasta alcanzar un tamaño específico. El tamaño determinado para los QDs fue de 6,9 nm, lo que coincide con lo descrito en literatura para QDs sintetizados en microorganismos y confirmando que *E. coli* puede generar NPs fluorescentes a partir de cadmio utilizando taurina como única fuente de S [23-25].

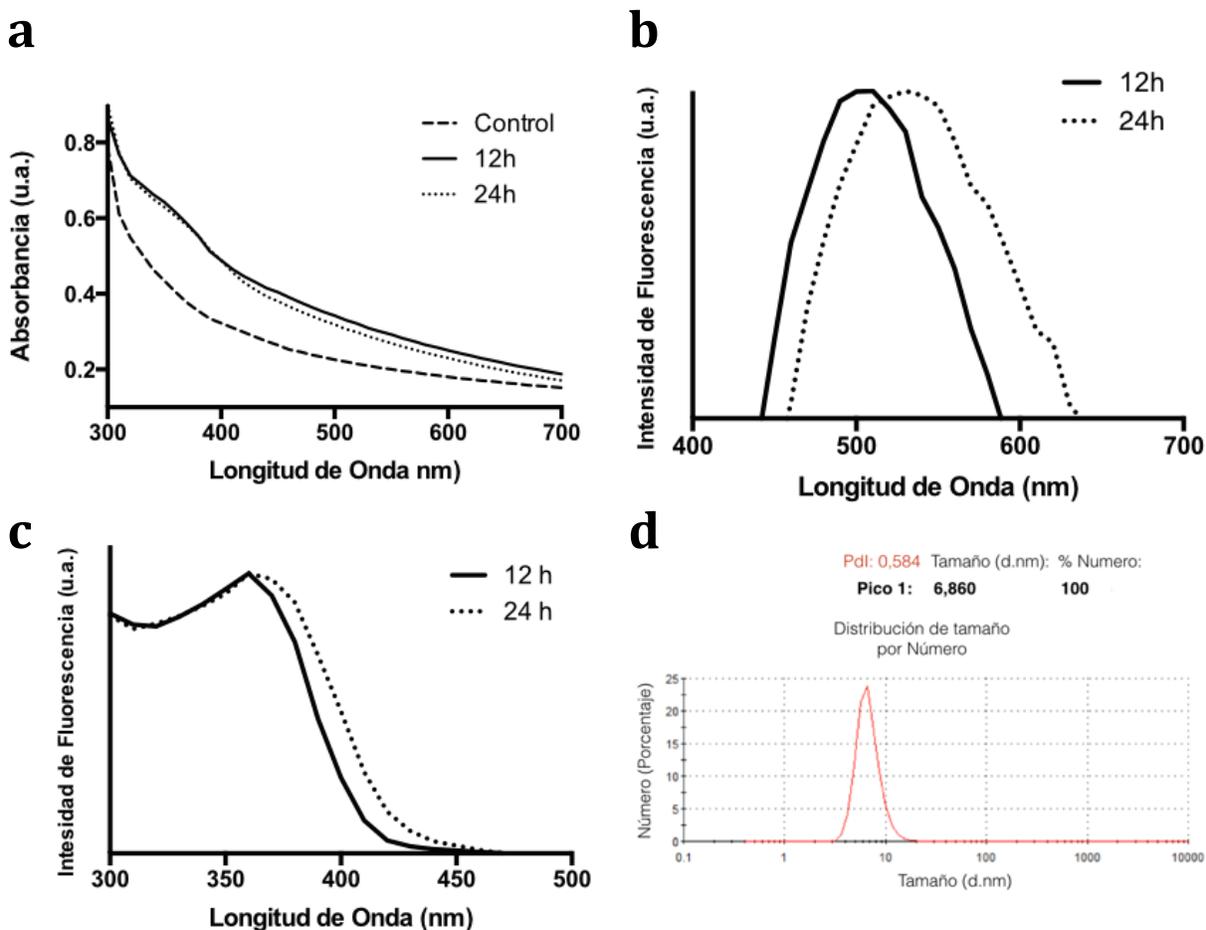


Figura 20. Caracterización espectroscópica y determinación de tamaño de NPs biosintetizadas en cultivos de *E. coli* utilizando taurina como fuente de S. **a**, espectro de absorbancia de NPs fluorescentes extraídas de un cultivo de *E. coli* en M63 con 1 mM de taurina luego de 12 y 24 h de incubación con Cd^{2+} 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. **b**, espectro de emisión de fluorescencia de NPs sintetizadas a las 12 y 24 h. Se utilizó una λ de excitación de 360 nm, registrando valores de λ_{max} de emisión en 500 y 540 nm para las NPs sintetizadas a las 12 y 24 h, respectivamente. **c**, espectro de excitación de fluorescencia de las NPs sintetizadas a las 12 y 24 h. **d**, dispersión dinámica de la luz de QDs sintetizados por *E. coli* en M63 usando taurina como fuente de S en presencia de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Cd^{2+} . Luego de 24 h de incubación con el metal las células fueron lisadas y las NPs purificadas. Las muestras fueron sonicadas previo a la determinación de la distribución de tamaño. Se obtuvo un índice Pdl de 0,58 mediante el promedio de tres mediciones.

Interesantemente, la producción de NPs con una distribución de tamaño monodispersa se encuentra asociada a procesos de síntesis intracelulares [4]. Sabiendo esto, se decidió estudiar la ubicación de las NPs por microscopía confocal en cultivos de *E. coli* en condiciones de biosíntesis. Para ello, se utilizó cultivos tratados con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Cd^{2+} luego de 12 h de incubación con el metal. La Figura 21 corresponde a las fotografías por microscopía confocal obtenidas para las muestras excitadas utilizando un láser de luz UV a 400 nm y filtros para el rango de emisión de fluorescencia visible, seleccionando sólo las señales generadas por los QDs y disminuyendo la auto-fluorescencia asociada a moléculas orgánicas. En la figura se observa una morfología celular típica, sin alteraciones o secreción de material. La fluorescencia se aloja principalmente en los polos de las células lo que indicaría una síntesis intracelular y explicaría el alto grado de orden en la distribución de los tamaños encontrados.

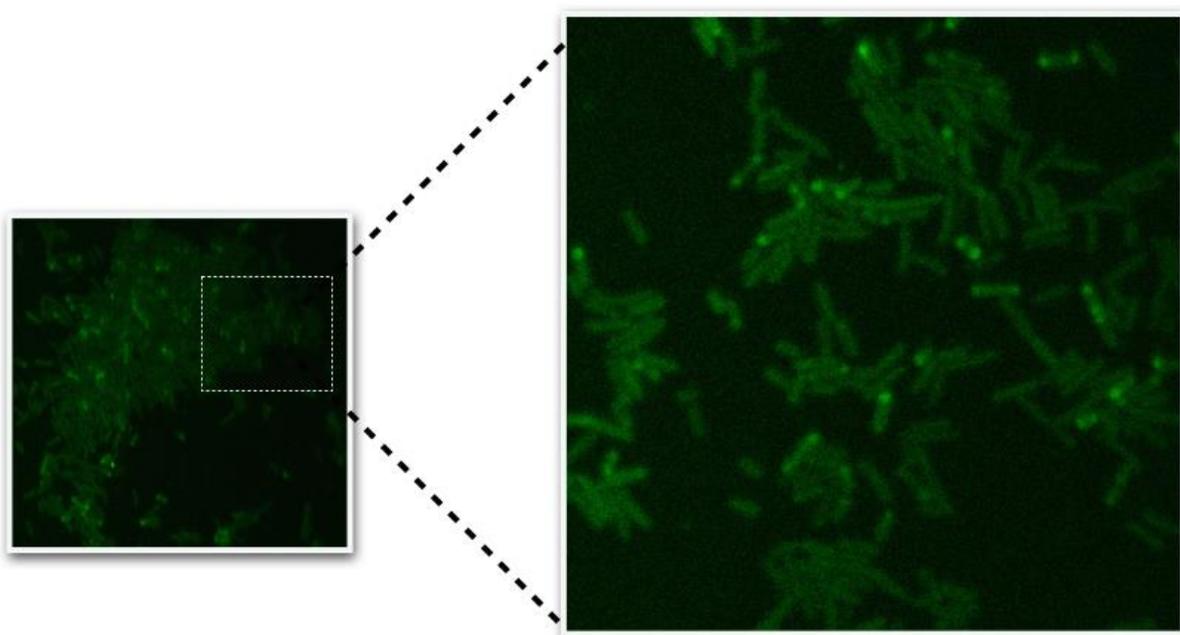


Figura 21. Microscopía confocal. Cultivos de *E. coli* usando taurina como fuente de S fueron tratados con cadmio (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Cd^{2+}) durante 12 h, centrifugados y suspendidos en un buffer PBS (pH 7,2). Las células fueron depositadas sobre agarosa de bajo punto de fusión para análisis de microscopía de fluorescencia usando una fuente de luz UV 400 nm y filtros de emisión para el fluoróforo de referencia DAPI.

Discusión

En la actualidad, existe la necesidad de encontrar un método eficiente y de bajo costo de síntesis de QDs para ser utilizado en la industria, lo que abre la puerta a métodos no convencionales como aquellos que involucran el uso de microorganismos [3]. Poco se conoce entre los mecanismos celulares involucrados en la síntesis biológica de NPs. De hecho, en uno de los modelos más estudiados a la fecha (síntesis de QDs de CdS en *E. coli*) se desconocen los compuestos sulfurados específicos que participan del proceso [19,23]. Ahora bien, se ha descrito que tanto los mecanismos de producción, como los compuestos sulfurados generados por *E. coli* son específicos para ciertas fuentes de S, de ahí la importancia de estudiar el metabolismo asociado a fuentes de S no convencionales [26]. Helbig y cols. (2008) demostraron durante el estrés por cadmio un aumento importante en la expresión de los genes del operón *tauABCD* responsable de la asimilación de S a partir de taurina, lo que sugiere el uso de taurina como una alternativa a otras fuentes de S para *E. coli* durante el estrés por el metal, pudiendo favorecer la biosíntesis de NPs [35]. Por otra parte, se desconocen los compuestos sulfurados derivados del metabolismo de taurina, lo que también es interesante para la síntesis de nuevos tipos de NPs. Basado en lo anterior se decidió evaluar el rol de taurina como fuente de S durante el estrés por Cd²⁺ en la síntesis de QDs de CdS en *E. coli*.

Interesantemente y a pesar del aumento en la expresión del operon *tauABCD* descrito durante el estrés por cadmio, la respuesta de *E. coli* no presentó un aumento en la tolerancia del cultivo frente al metal al utilizar taurina como fuente de S. No se hallaron diferencias en la CIM (20 µg/mL), cambios en las curvas de crecimiento ni variaciones significativas en las UFC luego del tratamiento con el metal utilizando taurina o sulfato como fuente de S (Figura 11). Estos resultados sugieren que la tolerancia al metal no varía al utilizar ambas fuentes de S y por lo tanto, *E. coli* es capaz de responder de manera similar utilizando taurina o sulfato durante el estrés por cadmio, por lo que las diferencias en la síntesis de NPs podrían no estar relacionadas directamente con la tolerancia al metal sino que posiblemente, con los metabolismos asociados al uso de cada fuente de S. Como una primera aproximación al efecto de la síntesis de QDs de CdS sobre los flujos metabólicos,

usamos el análisis de balance de flujos sobre un modelo metabólico modificado, que representa la producción de QDs como el “drenaje” de H₂S que depende del consume de cadmio. Lamentablemente, las simulaciones sólo pudieron realizarse para sulfato debido a que por impericias técnicas el uso del reactor se vio limitado. No obstante, los resultados señalan un efecto importante sobre rutas de gran relevancia para la síntesis de QDs utilizando taurina como fuente de S y serán evaluadas experimentalmente a futuro. Para realizar las simulaciones se determinaron parámetros experimentales necesarios para restringir el espacio de flujos posibles en el metabolismo de *E. coli*. Una de las primeras tareas fue escalar el proceso de síntesis utilizando un reactor para cultivos microbiológicos donde se evaluó la generación de biomasa en el tiempo y la tasa de crecimiento. Al escalar el proceso de síntesis de QDs a un volume de 1500 mL, existen distintas consideraciones que modifican tanto la tolerancia al metal como la tasa de crecimiento (Figura 13a). Shiloach y cols. (2005), plantearon la importancia de la transferencia de oxígeno hacia el cultivo como un factor limitante en el escalamiento de procesos biológicos [61]. En dicho trabajo se mostró cómo al mejorar los sistemas de aireación en cultivos de *E. coli* utilizando glucosa como fuente de carbono y utilizando oxígeno puro en vez de aire, tanto el rendimiento de biomasa generada por unidad de oxígeno consumido como la tasa de crecimiento aumentaban. Justamente, los resultados exhibidos en las Figuras 12 y 13a, muestran una disminución en la reducción de la tasa de crecimiento, pasando de una disminución del 55% a tan solo un 30%, cuando el cultivo es tratado con la misma concentración de cadmio pero el sistema de incubación varía. Estos resultados pueden ser explicados producto de una mejora en el sistema de agitación y la tasa de oxigenación del cultivo en reactor, lo que permitió aumentar el crecimiento tanto en la condición control, como en el cultivo tratado con cadmio. No obstante, el efecto nocivo del metal se mantuvo, disminuyendo la tasa de crecimiento a un 70% respecto del valor control. Por otra parte los resultados de la biosíntesis en reactor muestran generación de NPs a partir de las 2 h de incubación con el metal (Figura 13b), lo que constituye un sistema de producción biológica de QDs a mayor escala; si bien queda mucho por estudiar en función de la optimización de la biosíntesis en estos modelos de cultivo, existe una mejora en los tiempos de síntesis respecto a lo descrito en literatura [19,23]. Estos resultados abren la puerta a distintas ventajas producto del uso de bioreactores, como por ejemplo, el suministro de sustratos de

manera constante para la prolongación del cultivo en un cierto estadio metabólico, pudiendo lograr síntesis de NPs con propiedades específicas o mantener un cultivo continuo en virtud de aumentar la eficiencia en la producción, lo que acerca a la biosíntesis de NPs a convertirse en una alternativa real y de bajo costo para la producción a gran escala de QDs.

Por otra parte, las simulaciones de tendencia de flujos metabólicos mediante MCMC, predijeron un aumento en la magnitud de los flujos asociados al CAT. En particular las actividad de la reacciones catalizadas por las enzimas aconitasa y la fumarasa presentaron un importante aumento de sus flujos (Figura 15a). Dado que en el CAT ocurre pérdida de carbon como CO_2 , la disminución del rendimiento de biomasa y el rendimiento de acetato por mol de glucose consumida, puede ser explicada por una gran producción de CO_2 producto del incremento del flujo en CAT. Por otra parte, se ha demostrado que aconitasa y fumarasa son reguladas a nivel transcripcional, mostrando una gran sensibilidad durante el estrés por ROS [35,56]. Por lo que el increment en CAT también es coherente con un evento de estrés oxidativo durante la síntesis de NPs de CdS. Esta coincidencia no puede ser usada para sugerir la ocurrencia de dicho evento, pues no está siendo modelado en la matriz estequiométrica de *E. coli*. En nuestro modelamiento, todos los efectos observados debieran ser consecuencia principalmente del drenaje de H_2S por la reacción (1) introducida en el modelo. Estas predicciones coinciden con los resultados de Helbig y cols. (2008), donde se determinó un aumento en la expresión de los genes que codifican para algunas de las enzimas del CAT (entre ellas la aconitasa A y la fumarasa C) luego de exponer cultivos de *E. coli* a cadmio [35].

Por otra parte, en la literatura se ha descrito un importante aumento del contenido de tioles intracelulares de bajo peso molecular destinados a la reparación de enlaces disulfuro en proteínas oxidadas por efecto del cadmio, encontrándose entre ellos, la tioredoxina [35]. Esto coincide con nuestra predicción, donde existe un aumento de la actividad TRDR utilizada en la restauración del “pool” de tioredoxina reducida, permitiendo de esta manera responder al efecto nocivo del metal (Figura 15b). Quizás, la mayor diferencia con lo descrito en literatura durante la respuesta de estrés por cadmio, es la disminución en los flujos de la enzima CYSS (Figura 15c), responsable de la síntesis de cisteína, la que durante el estrés por cadmio presenta un incremento en su expresión

producto del aumento en la generación de su regulador transcripcional CysB [35]. Lo que concuerda de manera global con la disminución en la velocidad de producción de acetato determinada experimentalmente, ya que éste, corresponde a un producto de la reacción de la generación de cisteína. Por otra parte, como se mencionó anteriormente, existe una disminución en la biomasa final generada, lo que concuerda con una disminución de generación de cisteína para ser incorporada en proteínas. Finalmente, el aumento del flujo de producción de H₂S, sugiere que parte del sulfuro producido estaría siendo destinado a la generación de QDs de CdS y no a la síntesis de cisteína, que es el principal mecanismo, implícito en nuestro modelamiento para el efecto de cadmio sobre la disminución de la tasa de crecimiento (Figura 15c).

Ya que durante el estrés por cadmio utilizando taurina o sulfato como fuentes de S existe una respuesta similar y que las simulaciones de flujos metabólicos predijeron un aumento en la generación de H₂S por SULFRi durante el fenómeno de biosíntesis, lo que podría ser un mecanismo de síntesis para NPs en *E. coli* utilizando taurina, se comparó la biosíntesis de QDs de CdS utilizando ambas fuentes de S. Interesantemente, se encontró generación de QDs luego de 12 h de incubación con el metal al utilizar taurina como fuente de S (Figura 16a). Una posible explicación es la acumulación de los componentes de la NP a lo largo del crecimiento hasta alcanzar una concentración crítica, punto en el que se generan las semillas y comienza el crecimiento de las nanoestructuras. Sweeney y cols. (2004) registraron un aumento en la concentración de GSH y S⁻² intracelular en cultivos de *E. coli* sintetizando nanocristales de CdS a partir de una sal de CdCl₂ y Na₂S [23]. En dicho trabajo se relacionó la acumulación de GSH y S⁻² con la eficiencia de la síntesis de NPs en las distintas fases del crecimiento, encontrando que durante la fase exponencial tardía existiría un aumento en el rendimiento de síntesis producto de la acumulación de S⁻². Seguramente, en la generación de NPs utilizando taurina como fuente de S ocurre algo similar, *E. coli* va degradando la taurina y acumulando distintas fuentes de sulfuro. Por otra parte, entre la síntesis utilizando sulfato o taurina no se encontró diferencias significativas salvo la capacidad de diferenciar de mejor manera los colores cuando taurina es la fuente de S, encontrando una variación bien definida desde celeste hasta rojo (Figura 16b). No

obstante, los tiempos de síntesis son similares lo que sugiere un mecanismo común para la generación de NPs.

Una posibilidad es que la síntesis en presencia de ambas fuentes de S esté asociada a la generación de H₂S como se predijo en las simulaciones de flujos metabólicos, pero los resultados indicaron que *E. coli* no genera este compuesto utilizando taurina, mientras que pequeñas cantidades fueron encontradas para sulfato (Figura 17). Esto sugiere en primera instancia que la síntesis de QDs utilizando taurina no avanza a través de la generación de H₂S, o por lo menos, la presencia de éste no sería indispensable para el fenómeno. Cabe señalar que la vía de generación de H₂S desde ambas fuentes corresponden a vías asimilativas, lo que quiere decir que es incorporado a la biomasa del cultivo y por tanto no se puede descartar que parte de ese sulfuro sea secuestrado por el metal para la formación de la NP, afectando el crecimiento y haciéndolo indetectable para nuestra metodología. Ahora bien, la detección de H₂S mediante precipitación por acetato de plomo corresponde a uno de los métodos con menor límite de detección descritos a la fecha; si bien no es una metodología cuantitativa, ha sido utilizada en microbiología ampliamente producto de su alta sensibilidad a concentraciones trazas del compuesto [62-65], por lo que de existir la generación de H₂S durante la biosíntesis de QDs de CdS en *E. coli* utilizando taurina como fuente de S, estaría ocurriendo en muy bajas concentraciones.

Otra posibilidad de mecanismo común entre ambas fuentes de S corresponde a la generación de COSV. De los resultados del análisis de headspace de cultivos de *E. coli* utilizando taurina o sulfato sólo se identificó la generación de DMS (Figura 18a). Cuando taurina es utilizada como fuente de S la producción de dicho gas aumenta respecto al cultivo utilizando sulfato (Figura 18c), lo que explicaría las diferencias en los colores de fluorescencia encontrados en la biosíntesis. Además, se demostró que los niveles de dichos compuestos disminuyen ante la presencia de cadmio, ya sea porque éste afecta los mecanismos involucrados en la generación de DMS, interactuando con los precursores involucrados en la síntesis de este compuesto, afectando las enzimas involucradas en los pasos de síntesis o porque el cadmio estaría interactuando directamente con el DMS (Figura 18d y 22). Uno de los precursores del DMS es el MeSH, el que en condiciones de biosíntesis también presentó una disminución en sus niveles (Figura 19 a-f), lo que permite

suponer que la generación de DMS se vería afectada producto de una disminución del MeSH por un efecto del cadmio río arriba en la generación del DMS (Figura 22). Por otra parte, estos resultados abren la discusión al uso de otras fuentes de sulfuro distintas del H₂S, dado que el uso de taurina o sulfato limitan la generación COSV, es factible que otros compuestos como la cisteína o la metionina pudiesen generar COSV específicos favoreciendo la generación de NPs. A la fecha, no se comprende en su totalidad los mecanismos de generación de estos compuestos en *E. coli*, por lo que tratar de entender los procesos enzimáticos que regulen dichas rutas ayudaría a dilucidar el rol de la generación de COSV en la biosíntesis de QDs de CdS (Figura 22). Aún mas, estos resultados enfatizan la relevancia del metabolismo del S asociado a la generación de NPs y aportan en el entendimiento de los mecanismos celulares que dominan el fenómeno de biosíntesis, ayudando a convertir a este tipo de metodologías en un modelo simple y eficiente de producción de QDs.

Finalmente, se purificó y caracterizó los QDs producidos por *E. coli* utilizando taurina como fuente de S. Se desarrolló un método de purificación simple y de bajo costo. El alto grado de purificación obtenido para las muestras se observó en los resultados de las características espectrocópicas obtenidas, donde se evidenció perfiles sin perturbaciones atribuibles a restos de materia orgánica (Figura 20a).

De los resultados de las caracterizaciones espectroscópicas se obtuvo un patrón de absorbancia típico de NPs metálicas [2]. Para NPs de CdS se han descrito patrones de absorbancia con una frecuencia de oscilación a longitudes de onda cercanos al UV (350-470) [66]. Interesantemente, los resultados concuerdan con dicha descripción, mostrando la capacidad de ser excitadas entre 350 hasta 400 nm. Esto resulta sumamente relevante si se piensa en implementar el uso de estas NPs en la fabricación de paneles solares sensibilizados por QDs. En los últimos años, gran parte de las publicaciones relacionadas con el aumento o mejora de la eficiencia de celdas solares se han volcado hacia la sensibilización de estos sistemas [67]. Entre los trabajos más relevantes destaca el de Li y cols. (2011) donde utilizaron QDs de CdS, dada su alta capacidad de absorber luz visible para sensibilizar superficies/materiales semiconductores con un amplio “band gap”

(distancia entre la banda de valencia y la banda de conductancia), aumentando la capacidad de transferir electrones [8].

Por otra parte, los perfiles de fluorescencia coinciden con lo descrito en literatura para síntesis de QDs de CdS, encontrando un corrimiento en la longitud de onda de emisión cuando el tiempo de incubación aumenta y una mantención en la longitud de onda de excitación para las NPs [19,23,66]. Esto sugiere que los QDs sintetizados son utilizables como marcadores en sistemas biológicos, dado que son excitables a longitudes de onda superiores a 400 nm pueden ser estimulados para generar un marcaje fluorescente sin dañar tejido orgánico, lo que es altamente deseado para ser utilizado como marcador en sistemas biológicos durante procesos de monitoreo *in vivo* [9]. Si bien falta evaluar el grado de toxicidad asociado a este tipo de NPs, la baja concentración del metal utilizada para su síntesis, lo que sumado al posible recubrimiento de las NPs producto de un proceso de síntesis biológica, no sería extraño encontrar altos grados de biocompatibilidad [18].

A continuación se logró demostrar en las fracciones purificadas la presencia de NPs de un tamaño aproximado de 6,9 nm con un alto grado de monodispersidad. Sweeney y cols. (2004). reportaron la generación de QDs de CdS en *E. coli* con tamaños entre los 2 a los 5 nm, mientras que Mi y cols. (2010) informaron de la síntesis de QDs de CdS, también en cultivos de *E. coli*, de 6 nm aproximadamente [19,23]. Así, nuestros resultados coinciden con lo descrito en literatura, confirmando la síntesis de QDs de CdS. En ambos trabajos la síntesis ocurrió de manera intracelular, lo que explicaba el alto grado de monodispersidad encontrado [4,19,23]. Esto resulta interesante pues sugiere un grado de control sobre el proceso de formación del cristal lo que posiciona a los sistemas biológicos como alternativas reales para la síntesis de NPs para su uso en sistemas optoelectrónicos, donde el grado de monodispersidad de las NPs es sumamente necesario [67,68]. Entre más homogénea sea la forma y tamaño de las NPs utilizadas en la sensibilización de paneles solares, más eficiente resulta el proceso de transferencia de electrones hacia el electrodo [67,68]. De existir una muestra heterogénea en tamaño y forma, las energías de excitación de los electrones diferirían entre nanopartículas y el proceso de transferencia no sería lineal hacia el electrodo [68], por lo que la obtención de muestras monodispersas presenta una serie de ventajas frente a otros métodos de síntesis.

Finalmente, los resultados de los estudios por microscopía confocal sugieren la acumulación de las NPs al interior de la célula, específicamente en los polos de ésta. Estos resultados son interesantes, pues el alto grado de monodispersidad de la muestra se correlaciona con un proceso de síntesis intracelular, lo que ya ha sido descrito en otros trabajos de síntesis de NPs en sistemas biológicos [4,19,23]. El hecho que se localicen en los extremos de la célula abre la pregunta a qué procesos fisiológicos estarían siendo desarrollados en dicha zona y de qué manera el control de estos procesos afectan a la formación o liberación de las NPs facilitando las metodologías de purificación.

Estos resultados indican un proceso de biosíntesis intracelular de QDs de CdS en cultivos de *E. coli* utilizando taurina como fuente S, con un alto grado de monodispersidad y por tanto con una alta potencialidad de ser utilizados en la industria, lo que a diferencia de otros modelos de biosíntesis no había podido ser conseguido [4,68].

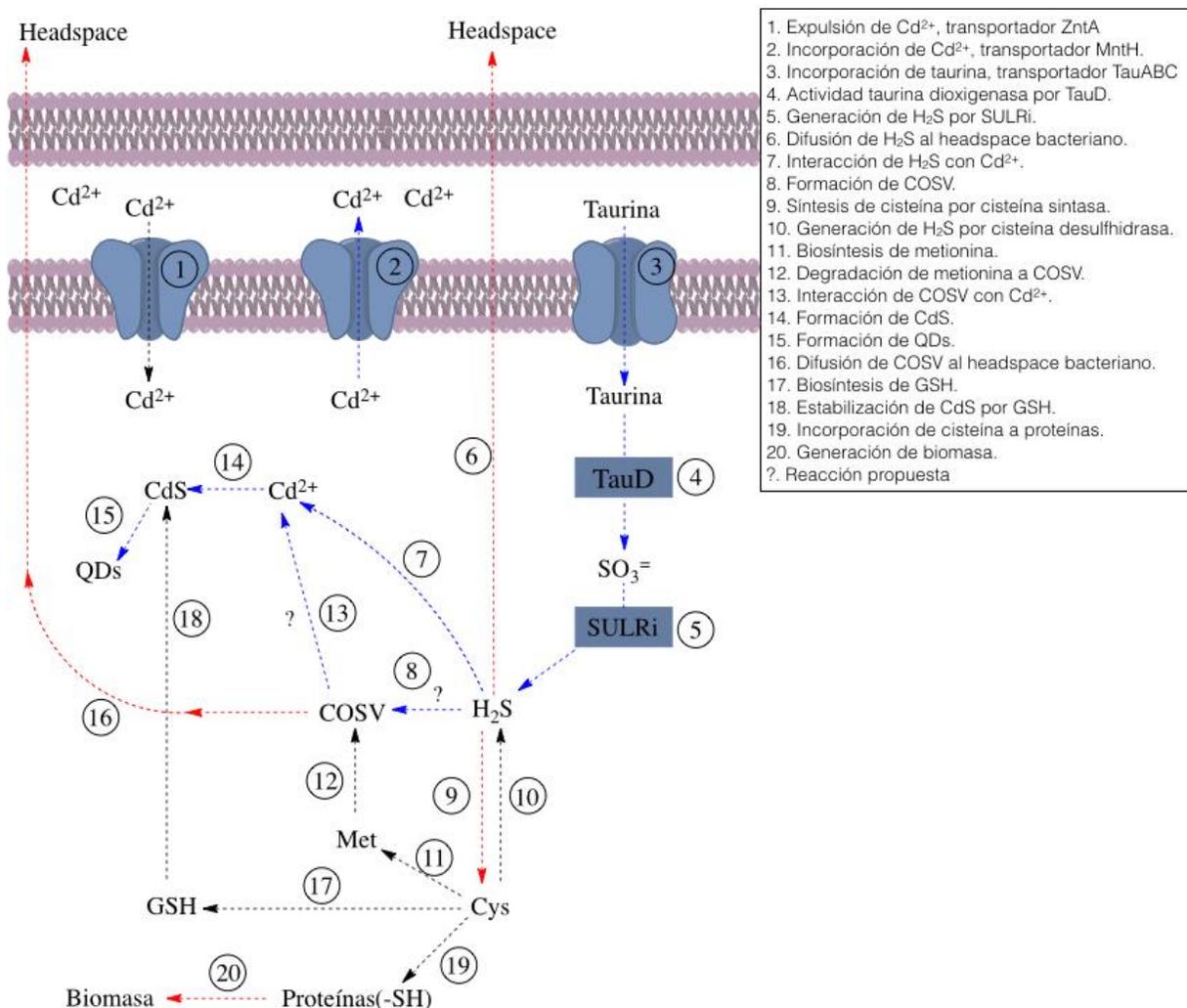


Figura 22. Biosíntesis de QDs de CdS utilizando taurina como fuente de S. Rutas metabólicas implicadas en la síntesis de QDs de CdS utilizando taurina como fuente de S. Las flechas punteadas representan reacciones existentes y propuestas (?), las flechas de color negro representan reacciones sin evidencia de cambio de flujo. Las flechas de color rojo representan reacciones con evidencia de disminución de su flujo y las flechas azules representan reacciones con evidencia de aumento de flujo. Como evidencias de variaciones en los flujos de reacciones se consideraron las predicciones por MCMC y/o evidencia directa descrita en literatura.

Conclusión.

En el presente trabajo hemos podido determinar que:

E. coli sintetiza NPs fluorescentes de cadmio junto con mantener su crecimiento utilizando taurina y sulfato como única fuente de S.

Durante el estrés por cadmio en la síntesis de NPs no existen diferencias apreciables en la respuesta al metal cuando *E. coli* utiliza taurina o sulfato como fuentes de S.

Respecto a la biosíntesis, existe una mayor definición en los colores de las NPs generadas, presentando un patrón de emisión de fluorescencia característico de QDs cuando taurina fue utilizada como fuente de S.

Contrariamente a lo esperado, la síntesis de NPs utilizando taurina como fuente de S, no dependería de H_2S , existiendo una relación entre el cadmio y la generación de COSV, específicamente MeSH y el DMS.

Las NPs producidas coinciden en sus características espectroscópicas, tamaño y localización celular con QDs de CdS sintetizados biológicamente.

Referencias.

- [1] Horikoshi, S. & Serpone, N. (2013). *Microwaves in nanoparticle synthesis, fundamentals and applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1-23.
- [2] Leutwyler, W. K., Bürgi, S. L., & Burgl, H. (1996). Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *Science*, 271(5251), 933-937.
- [3] Thakkar, K. N., Mhatre, S. S., & Parikh, R. Y. (2010). Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(2), 257-262.
- [4] Narayanan, K. B., & Sakthivel, N. (2010). Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Advances in Colloid and Interface Science*, 156(1), 1-13.
- [5] Research Topics: Explore the scientific questions that fascinate us (2013). Retrieved September 22, 2014. <http://wichlab.com/research>.
- [6] de Mello Donegá, C. (2011). Synthesis and properties of colloidal heteronanocrystals. *Chemical Society Reviews*, 40(3), 1512-1546.
- [7] Grieve, K., Mulvaney, P., & Grieser, F. (2000). Synthesis and electronic properties of semiconductor nanoparticles/quantum dots. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5(1), 168-172.
- [8] Li, L., Yang, X., Gao, J., ... & Sun, L. (2011). Highly efficient CdS quantum dot-sensitized solar cells based on a modified polysulfide electrolyte. *Journal of the American Chemical Society*, 133(22), 8458-8460.
- [9] Barroso, M. M. (2011). Quantum dots in cell biology. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 59(3), 237-251.

- [10] Durán-Toro, V., Gran-Scheuch, A., Órdenes-Aenishanslins, ... & Pérez-Donoso, J. M. (2014). Quantum dot-based assay for Cu²⁺ quantification in bacterial cell culture. *Analytical Biochemistry*, 450(1), 30-36.
- [11] Ortega, A., Escobar, R., Colle, S., & De Abreu, S. L. (2010). The state of solar energy resource assessment in Chile. *Renewable Energy*, 35(11), 2514-2524.
- [12] Bruchez, M. P. (2011). Quantum dots find their stride in single molecule tracking. *Current Opinion in Chemical Biology*, 15(6), 775-780.
- [13] Wang, L. Y., Wang, L., Gao, F., Yu, Z. Y., & Wu, Z. M. (2002). Application of functionalized CdS nanoparticles as fluorescence probe in the determination of nucleic acids. *Analyst*, 127(7), 977-980.
- [14] Frasco, M. F., & Chaniotakis, N. (2009). Semiconductor quantum dots in chemical sensors and biosensors. *Sensors*, 9(9), 7266-7286.
- [15] Murray, C., Norris, D. J., & Bawendi, M. G. (1993). Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E= sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites. *Journal of the American Chemical Society*, 115(19), 8706-8715.
- [16] Derfus, A. M., Chan, W. C., & Bhatia, S. N. (2004). Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Letters*, 4(1), 11-18.
- [17] Pérez-Donoso, J. M., Monrás, J. P., Bravo, D., ... & Vásquez, C. C. (2012). Biomimetic, mild chemical synthesis of CdTe-GSH quantum dots with improved biocompatibility. *PLoS ONE*, 7(1), e30741.
- [18] Díaz, V., Ramírez-Maureira, M., Monrás, J. P... & Pérez-Donoso, J. M. (2012). Spectroscopic properties and biocompatibility studies of CdTe quantum dots capped with biological thiols. *Science of Advanced Materials*, 4(5-6), 609-616.

- [19] Mi, C., Wang, Y., Zhang, J., ... & Xu, S. (2011). Biosynthesis and characterization of CdS quantum dots in genetically engineered *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 153(3), 125-132.
- [20] Holmes, J. D., Richardson, D. J., Saed, S., ... & Sodeau, J. R. (1997). Cadmium-specific formation of metal sulfide 'Q-particles' by *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology*, 143(8), 2521-2530.
- [21] Dameron, C. T., Smith, B. R., & Winge, D. R. (1989). Glutathione-coated cadmium-sulfide crystallites in *Candida glabrata*. *Journal of Biological Chemistry*, 264(29), 17355-17360.
- [22] Bai, H. J., Zhang, Z. M., Guo, Y., & Yang, G. E. (2009). Biosynthesis of cadmium sulfide nanoparticles by photosynthetic bacteria *Rhodospseudomonas palustris*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 70(1), 142-146.
- [23] Sweeney, R. Y., Mao, C., Gao, X., ... & Iverson, B. L. (2004). Bacterial biosynthesis of cadmium sulfide nanocrystals. *Chemistry & Biology*, 11(11), 1553-1559.
- [24] Vengas, F. (2014). Papel del fosfato inorgánico en la síntesis biológica de nanopartículas semiconductoras fluorescentes de CdS (quantum dots) en *Escherichia coli*. Tesis de Magister. Universidad Andres Bello, Santiago, Chile.
- [25] Monrás, J. P., Díaz, V., Bravo, D., ... & Pérez-Donoso, J. M. (2012). Enhanced glutathione content allows the *in vivo* synthesis of fluorescent CdTe nanoparticles by *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 7(11), e48657.
- [26] Sekowska, A., Kung, H. F., & Danchin, A. (2000). Sulfur metabolism in *Escherichia coli* and related bacteria: facts and fiction. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2(2), 145-177.

- [27] Awano, N., Wada, M., Kohdoh, A., ... & Nakamori, S. (2003). Effect of cysteine desulfhydrase gene disruption on L-cysteine overproduction in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62(2-3), 239-243.
- [28] Awano, N., Wada, M., Mori, H., ... & Takagi, H. (2005). Identification and functional analysis of *Escherichia coli* cysteine desulfhydrases. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 4149-4152.
- [29] Chartron, J., Shiau, C., Stout, ... & Carroll, K. S. (2007). 3'-Phosphoadenosine-5'-phosphosulfate reductase in complex with thioredoxin: a structural snapshot in the catalytic cycle. *Biochemistry*, 46(13), 3942-3951.
- [30] Ostrowski, J., Barber, M. J., Rueger, D. C., Miller, B. E., Siegel, L. M., & Kredich, N. M. (1989). Characterization of the flavoprotein moieties of NADPH-sulfite reductase from *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. Physicochemical and catalytic properties, amino acid sequence deduced from DNA sequence of *cysJ*, and comparison with NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 264 (27), 15796-15808.
- [31] Kadota, H., & Ishida, Y. (1972). Production of volatile sulfur compounds by microorganisms. *Annual Review in Microbiology*, 26(1), 127-138.
- [32] Essa, A. M. M., Creamer, N. J., ... & Macaskie, L. E. (2006). A new approach to the remediation of heavy metal liquid wastes via off-gases produced by *Klebsiella pneumoniae* M426. *Biotechnology and Bioengineering*, 95(4), 574-583.
- [33] Chasteen, T. G., Silver, G. M., Birks, ... & Fall, R. (1990). Fluorine-induced chemiluminescence detection of biologically methylated tellurium, selenium, and sulfur compounds. *Chromatographia*, 30(3-4), 181-185.
- [34] Bertin, G., & Averbek, D. (2006). Cadmium: cellular effects, modifications of

biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie*, 88(11), 1549-1559.

[35] Helbig, K., Grosse, C., & Nies, D. H. (2008). Cadmium toxicity in glutathione mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 190(15), 5439-5454.

[36] Cook, A. M., & Denger, K. (2006). Metabolism of taurine in microorganisms. Springer US.

[37] McLaggan, D., & Epstein, W. (1991). *Escherichia coli* accumulates the eukaryotic osmolyte taurine at high osmolarity. *FEMS Microbiology Letters*, 81(2), 209-213.

[38] Van der Ploeg, J. R., Weiss, M. A., Saller, E., ... & Leisinger, T. (1996). Identification of sulfate starvation-regulated genes in *Escherichia coli*: a gene cluster involved in the utilization of taurine as a sulfur source. *Journal of Bacteriology*, 178(18), 5438-5446.

[39] Eichhorn, E., van der Ploeg, J. R., Kertesz, M. A., & Leisinger, T. (1997). Characterization of α -ketoglutarate-dependent taurine dioxygenase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(37), 23031-23036.

[40] Clarke, P. H. (1953). Hydrogen sulphide production by bacteria. *Journal of General Microbiology*, 8(3), 397-407.

[41] Orth, J. D., Thiele, I., & Palsson, B. Ø. (2010). What is flux balance analysis?. *Nature Biotechnology*, 28 (3), 245-248.

[42] Grenier, F., Matteau, D., Baby, V., & Rodrigue, S. (2014). Complete genome sequence of *Escherichia coli* BW25113. *Genome Announcements*, 2 (5), e01038-14.

[43] Bertani, G. (2004). Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *Journal of Bacteriology*, 186(3), 595-600.

- [44] Green, M.R. & Sambrook, J. (2012). Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, p68.
- [45] Lawrence, J. V., & Maier, S. (1977). Correction for the inherent error in optical density readings. *Applied and Environmental Microbiology*, 33 (2), 482-484.
- [46] Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3 (2), 163-175.
- [47] Gallardo, C., Monrás, J. P., Plaza, D. O., ... & Pérez-Donoso, J. M. (2014). Low-temperature biosynthesis of fluorescent semiconductor nanoparticles (CdS) by oxidative stress resistant Antarctic bacteria. *Journal of Biotechnology*, 187, 108-115.
- [48] Küster, E., & Williams, S. T. (1964). Production of hydrogen sulfide by Streptomycetes and methods for its detection. *Applied Microbiology*, 12 (1), 46-52.
- [49] ZoBell, C. E., & Feltham, C. B. (1934). A comparison of lead, bismuth, and iron as detectors of hydrogen sulphide produced by bacteria. *Journal of Bacteriology*, 28 (2), 169.
- [50] Tille, P. (2013). Bailey & Scott's diagnostic microbiology 10th ed. *Elsevier Health Sciences*.
- [51] Swearingen, J. W., Araya, M. A., Plishker, ... & Chasteen, T. G. (2004). Identification of biogenic organotellurides in *Escherichia coli* K-12 headspace gases using solid-phase microextraction and gas chromatography. *Analytical Biochemistry*, 331(1), 106-114.
- [52] Kayser, A., Weber, J., Hecht, V., & Rinas, U. (2005). Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* in glucose-limited continuous culture. I. Growth-rate-dependent metabolic efficiency at steady state. *Microbiology*, 151 (3), 693-706.

- [53] Kadiramanathan, V., Yang, J., Billings, S. A., & Wright, P. C. (2006). Markov chain Monte Carlo algorithm based metabolic flux distribution analysis on *Corynebacterium glutamicum*. *Bioinformatics*, 22 (21), 2681-2687.
- [54] Matsuda, L. (2014). Establecimiento de la homeostasis redox del NADPH: participación de la transhidrogenasa PntAB y la vía de las pentosas fosfato. Tesis de Doctorado. Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- [55] Laddaga, R. A., & Silver, S. (1985). Cadmium uptake in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 162(3), 1100-1105.
- [56] Sandoval, J. M., Arenas, F. A., & Vásquez, C. C. (2011). Glucose-6-phosphate dehydrogenase protects *Escherichia coli* from tellurite-mediated oxidative stress. *PLoS ONE*, 6 (9), e25573.
- [57] Holmgren, A., Johansson, C., Berndt, C., ... & Lillig, C. H. (2005). Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochemical Society Transactions*, 33 (6), 1375-1377.
- [58] Pérez, J. M., Arenas, F. A., Pradenas, G. A., ... & Vásquez, C. C. (2008). *Escherichia coli* YqhD exhibits aldehyde reductase activity and protects from the harmful effect of lipid peroxidation-derived aldehydes. *Journal of Biological Chemistry*, 283 (12), 7346-7353.
- [59] Tanner, F. W. (1917). Studies on the bacterial metabolism of sulfur: I. Formation of hydrogen sulfide from certain sulfur compounds under aerobic conditions. *Journal of bacteriology*, 2 (5), 585-599.
- [60] Merkus, H. G. (2009). Particle size measurements: fundamentals, practice, quality. *Springer Science & Business Media*, 17, 200-220.
- [61] Shiloach, J., & Fass, R. (2005). Growing *E. coli* to high cell density—a historical

perspective on method development. *Biotechnology Advances*, 23 (5), 345-357.

[62] Collins, R. N., Treger, M. D., Goldsby, ... & Barr, R. N. (1968). Interstate outbreak of *Salmonella newbrunswick* infection traced to powdered milk. *Journal of the American Medical Association*, 203 (10), 838-844.

[63] Weissman, J. B., Doug Deen, R., Williams, M., & Swanston, N. (1977). An island-wide epidemic of salmonellosis in Trinidad traced to contaminated powdered milk. *West Indian Med J*, 26 (3), 135-43.

[64] Finegold S. M., Martin W. J. (1982). Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology 6th ed. *The CV. Mosby Co., St. Louis*.

[65] Rowe, B., Hutchinson, D. N., Gilbert, ... & Jepson, M. (1987). Salmonella ealing infections associated with consumption of infant dried milk. *The Lancet*, 330(8564), 900-903.

[66] Resch-Genger, U., Grabolle, M., Cavaliere-Jaricot, S., ... & Nann, T. (2008). Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nature Methods*, 5 (9), 763-775.

[67] Kamat, P. V. (2008). Quantum dot solar cells. Semiconductor nanocrystals as light harvesters. *The Journal of Physical Chemistry C*, 112 (48), 18737-18753.

[68] Rühle, S., Shalom, M., & Zaban, A. (2010). Quantum-dot-sensitized solar cells. *ChemPhysChem*, 11 (11), 2290-2304.