

UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas



**Estructuras tipo minicélulas como mecanismo de expulsión de
Quantum Dots y tolerancia a metales en *Escherichia coli***

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

Felipe Daniel Valenzuela Ibaceta

Dr. Sergio Aníbal Álvarez Armijo

Director de Tesis

Dr. José Manuel Pérez Donoso

Director de Tesis

Santiago – Mayo 2023

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

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

FELIPE DANIEL VALENZUELA IBACETA

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. Sergio Álvarez Armijo _____

Director de Tesis:

Dr. José Pérez Donoso _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Marcelo Kogan _____

Dr. Davor Cotoras _____

Dr. Mauricio Latorre _____

Tabla de contenido

Agradecimientos	5
Financiamiento	6
Abreviaturas	7
Índice de figuras	8
Índice de tablas	9
Índice de anexos	9
Resumen	10
Abstract	11
1. Introducción	12
1.1. <i>Quantum Dots</i> : Características generales	12
1.2. Alternativas de obtención de QDs: Biosíntesis bacteriana	14
1.3. Morfología y localización de QDs durante la biosíntesis	16
1.4. Minicélulas: rol en la división y relación con metales	19
1.5. Implicancias y objetivo	24
2. Hipótesis	26
3. Objetivo general	26
4. Objetivos específicos	26
5. Métodos	27
5.1. Inducción y sobreexpresión de la proteína GshA	27
5.2. Biosíntesis intracelular de QDs	27
5.2.1. Biosíntesis de QDs de CdS y CdTe en fase estacionaria	27
5.2.2. Biosíntesis de QDs de CdS en fase exponencial	28
5.3. Purificación de nanopartículas y análisis de propiedades ópticas	28
5.4. Microscopía óptica y de fluorescencia	29
5.5. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	29
5.6. Ensayo de difusión en placa	29
5.7. Cuantificación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)	30
5.8. Enriquecimiento de minicélulas	30
6. Resultados	32
6.1. Inducción y sobreexpresión de la proteína GshA	32
6.2. Biosíntesis intracelular de QDs de CdS y CdTe	33
6.3. Estudios morfológicos de <i>E. coli</i> en condiciones de biosíntesis	34

6.4. Estudios morfológicos por microscopía electrónica de transmisión (TEM)	38
6.5. Tolerancia a cadmio en cepas mutantes del sistema Min	43
6.6. Biosíntesis intracelular de QDs de CdS en cepas mutantes del sistema Min	47
6.7. Análisis morfológico de cepas mutantes del sistema Min en condiciones de biosíntesis	48
6.8. Cinética de biosíntesis en cepas mutantes del sistema Min	49
6.9. Análisis de localización de nanopartículas por TEM.....	52
6.10. Estudios comparativos de minicélulas y células bacilares	53
7. Discusión	57
7.1. Cambios morfológicos de la cepa AG1/pCA24NgshA en condiciones de biosíntesis	57
7.2. Biosíntesis de QDs en cepas productoras constitutivas de minicélulas	63
7.3. Rol fisiológico y proyecciones.....	70
8. Conclusiones	74
9. Referencias.....	75
10. Anexos	83
11. Otras actividades.....	85

Agradecimientos

A mi familia, por estar ahí en cada momento y apoyar todas y cada una de las decisiones que hice. A mi madre y a mi padre por tirarme para arriba y acompañarme paso a paso en este largo camino. A mis tíos por ser mis fans y esperar mucho de mí. A mis abuelos. Donde sea que estén, fue gracias a ustedes que llegué a ser lo que soy. Muchas gracias por sus historias, por las risas, por los momentos y por ayudarme a llegar tan lejos.

Gracias los profesores que me ayudaron en mi desarrollo y para tomar las decisiones necesarias para llegar a mis metas. A la profe Jeshu, al profe Araya y al profe Ogalde por tantos buenos momentos en el colegio y ayudarme a llegar a bioquímica. Al profesor Assaf por introducirme a la microbiología y ayudar a desarrollarme como científico. A la profesora Seelenfreund por su apoyo en el desarrollo docente, conversaciones críticas y por guiarme en momentos difíciles de la carrera. Al profesor Sergio por su apoyo constante en este trabajo y su amplia disposición y ganas de aportar. Gracias a la comisión por su análisis crítico, sugerencias y disposición para las presentaciones.

A mi distinguido círculo de amigos: Seba, Osses, Lamoza, Pikachu, Pato, Javi y Dani. Por ser colegas y reírnos juntos de toda clase de estupideces. Por todos los hermosos momentos que hemos pasado y que seguirán en el futuro.

Gracias a Alexandra Elbakyan por crear Scihub y permitirme estudiar ciencias.

Gracias a Yuki. Llegaste al final de esta etapa a alegrar un poquito los días oscuros. Ojalá tengamos bonitos momentos en el futuro.

Finalmente, gracias al gran Nanolab. No podría haber tenido mayor suerte de llegar a tan tremendo laboratorio. Gracias al profe Jota. Me recibió en su laboratorio en uno de mis peores momentos y su apoyo constante permitió que desarrollara la loca idea que fue mi tesis. Me ayudó a sacar lo mejor de mí en cada experimento que hacía y confió en mí cuando ni siquiera yo mismo lo hacía. Gracias a todo el equipo del lab. Seba, Nico Torres, Nico Bruna, Mati, Javi, Kako, Vale, Claudio, Manuel y tía Olaya, por todo su apoyo, camaradería, buena onda y ganas para ayudarme a crecer y perfeccionarme. Ojalá sigamos haciendo locuras en el futuro.

Gracias a usted, estimado lector, que se está dando el tiempo de leer este trabajo.

“Profesor, yo no soy lo que usted llama un hombre civilizado. He roto por completo con toda la sociedad, por razones que yo sólo tengo el derecho de apreciar. No obedezco a sus reglas y le conjuro a usted que no las invoque nunca ante mí”. -Julio Verne; *Veinte mil leguas de viaje submarino*.

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 de la Vida de la Universidad Andrés Bello. El trabajo fue financiado por el proyecto FONDECYT 1200870.

Abreviaturas

CdCl₂: Cloruro de cadmio

CdS: Sulfuro de cadmio

CdSe: Seleniuro de cadmio

CdTe: Telururo de cadmio

Cm: Cloranfenicol

FAAS: Espectroscopía de absorción atómica a la llama

GSH: Glutati3n reducido

GshA: Glutamato-cisteína ligasa

H₂O₂: Per3xido de hidr3geno

IPTG: isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

K₂TeO₃: Telurito de potasio

LB: *Lysogeny broth*; caldo de lisogenia

MIC: Concentraci3n m3nima inhibitoria

NA: Apertura num3rica

DO₆₀₀: Densidad 3ptica a 600 nm

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

QDs: *Quantum dots*

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato s3dico

TEM: Microscopía electr3nica de transmisi3n

UV: Ultravioleta

Índice de figuras

Figura 1: Propiedades ópticas y tamaño de QDs.....	12
Figura 2: Análisis morfológicos y distribución de QDs en células durante la biosíntesis.....	16
Figura 3: Evidencia de división polar, no canónica, durante la biosíntesis de QDs.....	18
Figura 4: Minicélulas y eliminación de elementos de daño celular.....	21
Figura 5: Cinética de inducción de la proteína GshA.....	30
Figura 6: Biosíntesis intracelular de QDs de CdS y CdTe en <i>E. coli</i>	31
Figura 7: Propiedades ópticas de QDs sintetizados en <i>E. coli</i>	32
Figura 8: Emisión de fluorescencia de células individuales.....	33
Figura 9: Análisis de patrones de emisión de fluorescencia en la cepa AG1/pCA24NgshA.....	35
Figura 10: Distribución de tamaño celular bajo condiciones de biosíntesis.....	36
Figura 11: Morfología celular en condiciones de biosíntesis.....	37
Figura 12: Formación de agregados en la cepa AG1/pCA24NgshA.....	39
Figura 13: Patrones de acumulación de material electrodensos relacionados a la división celular.....	40
Figura 14: Formación de minicélulas en la cepa AG1/pCA24NgshA.....	41
Figura 15: Morfología de cepas mutantes del sistema Min.....	42
Figura 16: Ensayo de difusión en placa de CdCl ₂	44
Figura 17: Biosíntesis intracelular en cepas mutantes del sistema Min.....	45
Figura 18: Emisión de fluorescencia intracelular en mutantes del sistema Min.....	46
Figura 19: Emisión de fluorescencia desde minicélulas.....	47
Figura 20: Cinética de biosíntesis de QDs de CdS en cepas de <i>E. coli</i>	49
Figura 21: Propiedades ópticas de QDs biosintetizados por cepas mutantes del sistema Min.....	49
Figura 22: Localización de QDs de CdS en cepas mutantes del sistema Min.....	51
Figura 23: Enriquecimiento de minicélulas y células bacilares.....	52
Figura 24: Análisis de pureza luego de enriquecimiento diferencial.....	53
Figura 25: Comparación de emisión de fluorescencia de minicélulas y células bacilares.....	54
Figura 26: Modelo morfológico de la biosíntesis de QDs de cadmio en <i>E. coli</i> AG1/pCA24NgshA.....	60
Figura 27: Modelo morfológico de la biosíntesis intracelular de QDs en cepas $\Delta minC$ y $\Delta minCDE$	68

Índice de tablas

Tabla 1: Porcentaje de estructuras celulares de tamaño 0,5-1,0 μm	36
Tabla 2: Recuento de cuerpos electrondensos generados en condiciones de biosíntesis.....	38
Tabla 3: Concentración mínima inhibitoria de CdCl_2	44

Índice de anexos

Anexo 1: Morfología de la cepa AG1/pCA24N en condiciones de biosíntesis	82
Anexo 2: Análisis de cuerpos electrondensos sin exposición a metales.....	82
Anexo 3: Morfología de QDs de CdS biosintetizados por <i>E. coli</i>	83
Anexo 4: Cuantificación de cadmio en minicélulas.....	83

Resumen

Antecedentes: Los *quantum dots* (QDs) son nanopartículas fluorescentes, cuyas cualidades ópticas las hacen de interés en múltiples áreas. Una forma para su obtención es por medio de biosíntesis bacteriana, donde distintas especies fabrican las nanopartículas al ser cultivadas en presencia de sales metálicas. Sin embargo, el mecanismo de síntesis es poco conocido a la fecha. Estudios en *Escherichia coli* sugieren que los QDs biosintetizados se asocian al polo celular, y a subsecuentes eventos de división polar para su eliminación. Este comportamiento se asemeja a un fenómeno descrito recientemente en *E. coli* que comprende la relocalización de cuerpos de inclusión en los polos de la célula para su eliminación dentro de minicélulas. Considerando que la exposición a metales usados comúnmente en la biosíntesis de QDs (cadmio o telurio) también genera cuerpos de inclusión, es posible pensar que durante el proceso de biosíntesis la célula genera minicélulas como un mecanismo de expulsión del metal. A su vez, la producción de minicélulas entregaría una mayor tolerancia a los metales pesados ya que permitiría su eliminación de la célula. No obstante, a la fecha no se ha estudiado si existe relación entre la producción de minicélulas y la exposición a metales pesados en *E. coli*. **Hipótesis:** La biosíntesis de QDs de cadmio en *E. coli* induce la generación de minicélulas como una respuesta para la expulsión del metal de la célula. **Métodos:** Se realizó biosíntesis intracelular de QDs en la cepa *E. coli* AG1/pCA24NgshA, modelo descrito de biosíntesis de QDs y formación de estructuras similares a minicélulas. La morfología celular y distribución de QDs se analizó por microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica de transmisión (TEM). La presencia de cuerpos de inclusión fue evaluada por TEM y SDS-PAGE. Para analizar cómo la producción de minicélulas puede afectar la biosíntesis de QDs, se realizó biosíntesis intracelular de QDs de cadmio en cepas mutantes del sistema Min ($\Delta minC$; $\Delta minCDE$) productoras de minicélulas. Se analizó la tolerancia a cadmio por difusión en placa y cuantificación de MIC. La morfología celular y distribución de QDs se evaluó por microscopía de fluorescencia y TEM. **Resultados:** En el modelo de *E. coli* AG1/pCA24NgshA, los QDs se acumulan principalmente en los polos de las células. Además, se pueden distribuir en células esféricas, de tamaño menor a 1 μm , las que podrían corresponder a minicélulas. En condiciones de biosíntesis, el número de células de tamaño menor a 1 μm aumenta a un $\sim 5\%$, en comparación al control de $\sim 1\%$. Además, los QDs colocalizan con cuerpos de inclusión generados en la célula. Al estudiar cepas productoras de minicélulas, se determinó que estas son menos tolerantes a cadmio que la cepa WT. No obstante, al realizar biosíntesis, los QDs se ubican a lo largo de la célula, con una alta densidad dentro de las minicélulas generadas. Además, la biosíntesis en las cepas productoras de minicélulas genera QDs con mayor intensidad de fluorescencia que la cepa WT. Finalmente, se determinó que las minicélulas cargadas con QDs presentan mayor intensidad de fluorescencia por área en comparación a células bacilares, lo que sugiere que los QDs se acumulan preferentemente en minicélulas. **Conclusiones:** La biosíntesis intracelular de QDs de cadmio en *E. coli* se relaciona a la producción de minicélulas que se generan por división polar y encapsulan a las nanopartículas. Las cepas productoras de minicélulas acumulan QDs principalmente dentro de minicélulas para su expulsión. Este trabajo es el primero en reportar la relación entre la formación de minicélulas y la biosíntesis de QDs, dando luces en la importancia fisiológica de ambos procesos. Además, recalca la oportunidad para el estudio de la generación de minicélulas cargadas con nanopartículas de interés de alta calidad y con alta emisión de fluorescencia para distintas aplicaciones.

Abstract

Background: Quantum dots (QDs) are fluorescent nanoparticles, whose optical properties make them of interest in multiple areas. A way to generate them is through bacterial biosynthesis, where different species manufacture nanoparticles when cultivated in the presence of metallic salts. However, the mechanism of synthesis is poorly understood to date. Studies in *Escherichia coli* suggest that biosynthesized QDs associate to the cell pole and to subsequent polar division events for their removal. This behaviour resembles a recently described phenomenon in *E. coli* involving the relocation of inclusion bodies to the poles of the cell for their elimination within minicells. Considering that exposure to metals commonly used in the biosynthesis of QDs (cadmium or tellurium) also generates inclusion bodies, it is possible to think that during the biosynthesis process, the cell generates minicells as a metal expulsion mechanism. In turn, the production of minicells would provide a greater tolerance to heavy metals since it would allow their elimination from the cell. However, to date it has not been studied whether there is a relationship between minicell production and exposure to heavy metals in *E. coli*. **Hypothesis:** The biosynthesis of cadmium QDs in *E. coli* induces the generation of minicells as a response for the removal of the metal from the cell. **Methods:** Intracellular biosynthesis of QDs was performed in the strain *E. coli* AG1/pCA24NgshA, a described model of QDs biosynthesis and formation of minicell-like structures. Cell morphology and distribution of QDs was analysed by fluorescence microscopy and transmission electron microscopy (TEM). The presence of inclusion bodies was evaluated by TEM and SDS-PAGE. To analyse how minicell production may affect QDs biosynthesis, intracellular biosynthesis of cadmium QDs was performed in minicell-producing Min system mutant strains ($\Delta minC$; $\Delta minCDE$). Cadmium tolerance was analysed by plate diffusion and MIC quantification. Cell morphology and distribution of QDs was assessed by fluorescence microscopy and TEM. **Results:** In the *E. coli* AG1/pCA24NgshA model, QDs accumulate mainly at the poles of cells. In addition, they can be distributed in spherical cells, smaller than 1 μm in size, which could correspond to minicells. Under biosynthesis conditions, the number of cells smaller than 1 μm is increased to $\sim 5\%$, compared to $\sim 1\%$ in control condition. Furthermore, the QDs colocalize with inclusion bodies generated in the cell. When studying strains that produce minicells, it was determined that they are less tolerant to cadmium than the WT strain. However, when performing biosynthesis, the QDs are located throughout the cell, with a high density within the generated minicells. In addition, biosynthesis in minicell-producing strains generates QDs with higher fluorescence intensity than the control strain. Finally, it was determined that minicells loaded with QDs present higher fluorescence intensity per area compared to rod cells, suggesting that QDs accumulate preferentially in minicells. **Conclusions:** The intracellular biosynthesis of cadmium QDs in *E. coli* is related to the production of minicells that are generated by polar division and encapsulate the nanoparticles. Minicell-producing strains accumulate QDs primarily within minicells for expulsion. This work is the first to report the relationship between minicell formation and QDs biosynthesis, shedding light on the physiological importance of both processes. In addition, it highlights the opportunity to study the generation of minicells loaded with high-quality nanoparticles of interest with high fluorescence emission for different applications.

1. Introducción

1.1. *Quantum Dots*: Características generales

Los *Quantum Dots* (QDs) son nanocristales fluorescentes semiconductores de un rango de tamaños entre 1 a 10 nm, en sus tres dimensiones, los cuales se componen de átomos de elementos como cadmio, cobre, indio, zinc, azufre, selenio, o telurio (Mansur, 2010; Jahangir et al., 2019). Las propiedades de emisión de fluorescencia de estas nanopartículas se deben al efecto de confinamiento cuántico (Sumanth Kumar et al., 2018): En un QD, los niveles de energía forman bandas, con los electrones presentes en la banda de valencia. Cuando un electrón obtiene suficiente energía para sobrepasar la barrera energética, este pasa a la banda de conductividad, dejando un “hueco” de carga positiva en su lugar. Este par electrón-hueco es denominado “excitón”. Ahora bien, cuando el tamaño de la nanopartícula se acerca a la distancia del excitón, también conocido como el radio de Bohr del excitón, los niveles de energía de la nanopartícula se vuelven discretos y la energía requerida para pasar de un nivel a otro aumenta. Entonces, a menor tamaño de la nanopartícula, su emisión de fluorescencia tiende a longitudes de onda de mayor energía (Figura 1A; Dabbousi et al., 1997). Esta propiedad permite modificar las propiedades ópticas de los QDs (Figura 1B) por lo que, según la composición química y el tamaño de las nanopartículas, la banda de emisión podría encontrarse en cualquier sitio del espectro, desde el ultravioleta hasta el infrarrojo (Pleskova et al., 2018). Debido a estas características ópticas, se ha propuesto su uso para biología, medicina, y bioimágenes (Wang et al., 2015; Díaz-García et al., 2018; Pleskova et al., 2018; Tian et al., 2017). Además, presentan potenciales usos en áreas de interés medioambiental, como sensibilizadores en celdas solares (Crisp et al., 2017), degradación de compuestos orgánicos por fotocatalisis (Abbasi et al., 2017), y producción de hidrógeno como fuente de energía (Yin et al., 2019).

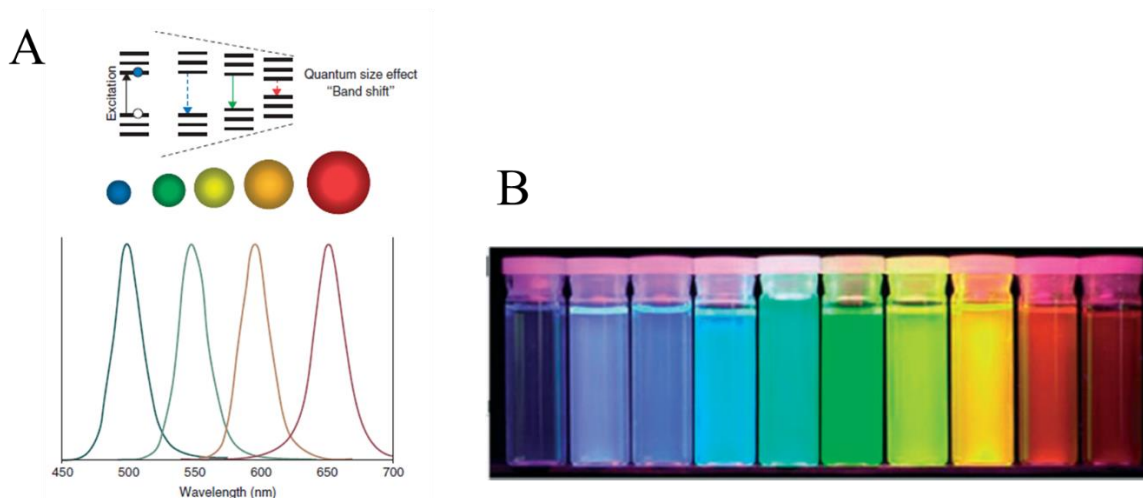


Figura 1: Propiedades ópticas y tamaño de QDs. Representación esquemática del cambio de las propiedades ópticas de QDs relacionado a su tamaño. (A) Esquema del efecto de confinamiento cuántico, representando la distancia de los niveles energéticos relacionado al tamaño de la nanopartícula. Se muestra también el cambio en los espectros de emisión de fluorescencia dependiendo del tamaño. (B) QDs en solución expuestos a luz UV, mostrando cambios en la coloración relativos al tamaño de la nanopartícula. Imagen obtenida y adaptada desde Mansur, 2010.

Actualmente, la síntesis de QDs se realiza principalmente por métodos químicos (Murray et al., 1993). No obstante, los métodos de síntesis químicos presentan la desventaja de ser altamente demandantes y poco sustentables, ya que se llevan a cabo utilizando altas temperaturas y ambientes libres de agua y oxígeno, lo que implica un procedimiento de alto consumo de energía (Tanaka et al., 2016; Qin et al., 2018).

Otro elemento importante es la toxicidad de los QDs debido a que estas nanopartículas están compuestas por metales pesados como cadmio o telurio. Varios reportes han estudiado los efectos negativos de QDs sintetizados por medios químicos en distintos organismos. Por ejemplo, se ha reportado en varias ocasiones la inducción de apoptosis en células endoteliales humanas frente a la exposición a QDs de CdTe, lo que dificulta su uso en aplicaciones biomédicas (Yan et al., 2011; Yan et al., 2016). En lo que respecta a la toxicidad en el medio ambiente, su estudio ha empezado a tomar importancia por la masificación del uso de estas nanopartículas. Se ha estudiado el efecto de QDs de CdTe en el molusco *Biomphalaria glabrata*, un bioindicador ambiental y se demostró que la exposición a concentraciones en el rango nanomolar por 24 horas induce mortalidad en adultos y embriones, malformaciones y bioacumulación de cadmio, entre otros efectos (de Vasconcelos Lima et al., 2019). Estos resultados toman especial relevancia considerando el efecto que podría generar la presencia

de QDs en el ambiente y en el ecosistema. A pesar de que aún hay pocos estudios de lo anterior o del transporte por materia orgánica y degradación de QDs en el ambiente, se estima un aumento importante de desechos de QDs al medioambiente por el alto interés de investigación de estas nanopartículas en la actualidad (Nikazar et al., 2020), por lo que recientemente ha ganado importancia la búsqueda de estrategias de síntesis de QDs más simples y amigables con el medio ambiente, las cuales a la vez generen nanopartículas de mayor biocompatibilidad.

1.2. Alternativas de obtención de QDs: Biosíntesis bacteriana

Dentro de las alternativas desarrolladas para alcanzar el objetivo previamente descrito, se han estudiado estrategias de síntesis biológica de QDs, también conocidas como biosíntesis. Estos métodos utilizan células o biomoléculas que interactúan con precursores metálicos para la síntesis de estos materiales (Hulkoti & Taranath, 2014). Entre los diversos sistemas utilizados para realizar biosíntesis se encuentran los microorganismos como las bacterias. Debido a su fácil cultivo, rápido crecimiento y capacidad de crecer en condiciones simples de laboratorio (pH, temperatura y presión), las bacterias son atractivos organismos para la síntesis de estos nanomateriales (Saravanan et al., 2021). Otra ventaja importante de la biosíntesis de QDs utilizando bacterias corresponde a las características adicionales que las nanopartículas pueden obtener. Al realizar biosíntesis de QDs en bacterias, estos presentan una recubierta de materia orgánica de proteínas y otras biomoléculas, los cuáles pueden estabilizar a la nanoestructura y disminuir su toxicidad (Bao et al., 2010). Esta cubierta de proteínas ha sido asociada en varios estudios a una mayor biocompatibilidad y solubilidad en agua, lo que se traduce en un mayor potencial para áreas biológicas y un menor impacto ambiental (Qin et al., 2018; Xu et al., 2019). Además, se ha reportado la biosíntesis de QDs con especies bacterianas extremófilas, las cuáles generan nanopartículas con propiedades únicas, como estabilidad frente a sal (Bruna et al., 2019) o pH ácido (Ulloa et al., 2016), lo que enfatiza la importancia del estudio de estas estrategias de síntesis para obtener nanopartículas con nuevas propiedades y más aplicaciones.

Pese a que se han estudiado varios modelos de biosíntesis de QDs en bacterias, aún no existe comprensión completa del mecanismo dentro de la célula ni su importancia fisiológica. Como

tal, varios reportes se han enfocado en entender los factores necesarios para la síntesis de QDs en bacterias, donde la mayoría de los reportes corresponde a QDs basados en cadmio, como sulfuro de cadmio (CdS), telururo de cadmio (CdTe), o seleniuro de cadmio (CdSe). Por ejemplo, se conoce que la translocación de cadmio al interior de la célula es promovida por el sistema de transportadores de fosfatos Pit (van Veen et al., 1994), y, por consiguiente, la concentración de moléculas fosforiladas es un factor importante en la biosíntesis de QDs de cadmio (Venegas et al., 2017). A su vez, la actividad de la bomba de eflujo ZntA, encargada de la expulsión de cadmio de la célula, también juega un rol en las propiedades de los QDs obtenidos (Zhu et al., 2021). Por lo tanto, los mecanismos de defensa de la célula frente al metal tendrían un papel en la biosíntesis de estos nanocristales. En la misma línea, se han estudiado en profundidad los mecanismos de defensa contra el metal presentes en la célula y cómo estos influyen la biosíntesis de QDs. En nuestro grupo, por ejemplo, se estudió el rol del glutatión (GSH), dada la afinidad del ión cadmio por los grupos tiol y por la importancia de este tripéptido en la tolerancia al metal (Helbig et al., 2008). Para esto, se utilizó la cepa de *Escherichia coli* AG1/pCA24NgshA. Esta cepa es derivada de la colección ASKA (Kitagawa et al., 2005) y sobreexpresa el gen *gshA*. Esta modificación genera un mayor contenido de GSH que en una cepa de *E. coli wild type* (WT) (Monrás et al., 2012). Esta cepa es capaz de generar QDs de CdS y CdTe al ser tratada con un medio que contiene cloruro de cadmio (CdCl₂) por sí solo, o CdCl₂ y telurito de potasio (K₂TeO₃), respectivamente. Este resultado reveló que un factor importante en la generación de QDs en *E. coli* corresponde a las defensas antioxidantes de la célula, y además recalca la acción reductora y estabilizadora de GSH en QDs basados en cadmio. En otro reporte, se analizó la capacidad de producción de QDs de CdS en cinco cepas del género *Pseudomonas* aisladas de la Antártica por medio de screening a resistencia a peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y CdCl₂ (Gallardo et al., 2014). Todas estas cepas fueron capaces de producir QDs de CdS al ser tratadas con CdCl₂. En este contexto, se pudo dilucidar que durante las condiciones de biosíntesis de QDs estas cepas liberan sulfuro de hidrógeno (H₂S), compuesto que promovería la síntesis de QDs. La liberación de H₂S es potenciada por la adición de cisteína al medio, lo que, a su vez promueve la síntesis de QDs. Esto ocurre por la acción de enzimas con actividad cisteína desulfidrasa, las que generan H₂S a partir de cisteína (Awano et al., 2005), y que se han descrito como catalizadores en la síntesis de QDs dada la interacción del

cadmio con los iones sulfuro (Dunleavy et al., 2016). En la misma línea, en el reporte de Plaza et al. (2016) se realizó un *screening* de resistencia a metales como cadmio y telurito (sugiriendo altas defensas antioxidantes intrínsecas), también en muestras ambientales del territorio Antártico, y se aisló 12 cepas de los géneros *Pseudomonas* y *Psychrobacter*, capaces de biosintetizar QDs de CdS (Plaza et al., 2016). En conjunto, todos estos resultados resaltan la importancia de la abundancia de moléculas antioxidantes de la célula en la biosíntesis de QDs y así también, en la interacción del cadmio con tioles biológicos para mediar esta síntesis.

1.3. Morfología y localización de QDs durante la biosíntesis

A pesar de la evidencia de la importancia de las defensas antioxidantes en la generación de QDs, la descripción del mecanismo general de biosíntesis es aún poco definido. Un factor importante y poco explorado a considerar corresponde a los cambios morfológicos que las células pueden sufrir durante la biosíntesis de QDs, así como la ubicación intracelular de las nanopartículas sintetizadas. Estos elementos son relevantes dado que los efectos que el metal tiene sobre la célula podrían dar pistas del mecanismo y de cómo este se ve regulado.

Reportes han analizado la ubicación intracelular de QDs basados en cadmio en *E. coli* mediante microscopía electrónica. Por ejemplo, se ha descrito que luego de la biosíntesis intracelular de QDs de CdS estos están presentes en el espacio citoplasmático, con una parte importante asociados a la membrana (Figura 2A y 2B; Mi et al., 2011; Marusak et al., 2016). En la misma línea, al analizar la ubicación de otro tipo de QDs de cadmio, como CdSe, se evidenció que, aunque hay una distribución en toda la célula de QDs, existe una acumulación preferentemente polar, asociada a la membrana de la célula (Figura 2C; Tian et al., 2019; Zhu et al., 2021). Curiosamente, este comportamiento no se limita solo a *E. coli*, dado que otras especies también muestran patrones morfológicos similares luego de la biosíntesis de QDs. Por ejemplo, al realizar biosíntesis intracelular en especies del género *Pseudomonas*, aisladas desde la Antártica, las células muestran acumulación de nanoestructuras en la zona polar (Figura 2D; Gallardo et al., 2014). Al mismo tiempo, en el polo donde ocurre esta acumulación ocurre una pérdida de la morfología de la membrana, sugiriendo cambios de estabilidad localizada. Algo similar ocurre en la biosíntesis en especies de *Psychrobacter* y

otras especies de *Pseudomonas* donde ocurre un ensanchamiento del espacio periplásmico luego de la biosíntesis de QDs de CdS (Figura 2E; Plaza et al., 2016). El conjunto de estos antecedentes sugiere que la biosíntesis de QDs basados en cadmio está relacionada a una acumulación polar de nanoestructuras, principalmente asociadas a la membrana de la célula. A su vez, existen cambios morfológicos a nivel de la membrana, en las zonas de acumulación de nanopartículas. Considerando que estos fenotipos son compartidos tanto en *E. coli* como en otras especies, se puede especular que los cambios que ocurren a nivel de membrana podrían corresponder a un mecanismo de respuesta conservado frente al metal.

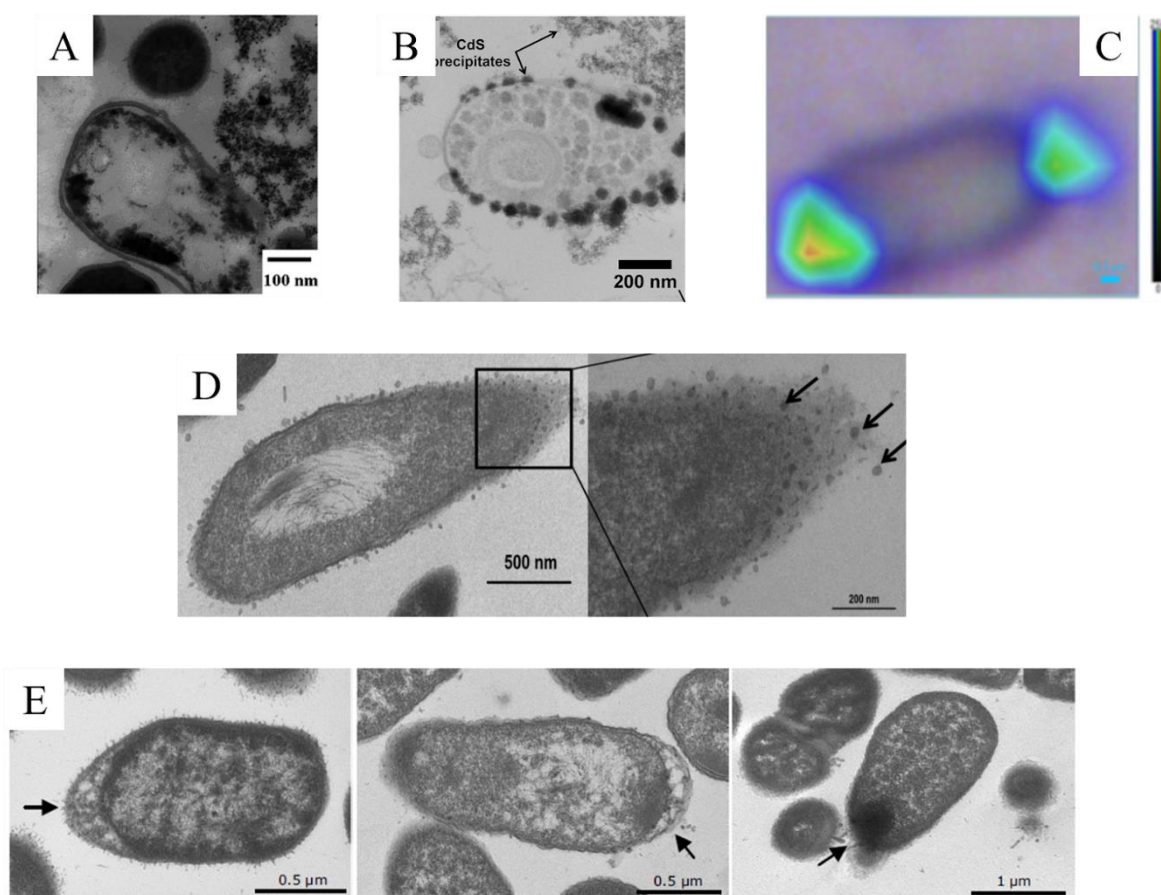


Figura 2: Análisis morfológicos y distribución de QDs en células durante la biosíntesis. Localización intracelular de QDs sintetizados en bacterias y cambios morfológicos asociados. (A) y (B) Micrografías de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de células de *E. coli*, con nanocristales electrondensos de CdS asociados a la membrana. Imágenes tomadas de Mi et al., 2011, y Marusak et al., 2016, respectivamente. (B) Análisis por espectroscopía de Raman de QDs de CdSe en *E. coli*. Imagen tomada de Zhu et al., 2021. (D) Micrografía de TEM de *Pseudomonas* sp. donde se observa la acumulación de nanoestructuras en el polo de la célula. Imagen tomada de Gallardo et al., 2014. (E) Micrografías de TEM de *Pseudomonas* sp. y *Psychrobacter* sp. con acumulación polar de nanoestructuras y cambios morfológicos a nivel del espacio periplásmico. Imagen tomada de Plaza et al., 2016.

Como se mencionó previamente, a pesar de que se han descrito varios análisis con respecto a los cambios morfológicos asociados a la biosíntesis de QDs en bacterias, pocos esfuerzos se han dedicado a entender los mecanismos que llevan a estos cambios o las razones fisiológicas para ello. Los análisis de nuestro grupo de investigación se han centrado en tratar de entender este fenómeno. En un modelo de biosíntesis de QDs de cobre en *E. coli*, se observa la acumulación de nanoestructuras asociadas al polo de la célula (Figura 3A; resultados no publicados), fenómeno que se repite de la biosíntesis de QDs basados en cadmio. No obstante, se observa de forma recurrente la formación de invaginaciones polares asociadas a la acumulación de las nanopartículas (Figura 3A). Esto sugiere que durante este proceso las células sufren divisiones aberrantes a nivel del polo de la célula, lo que “encapsularía” a las nanoestructuras sintetizadas. Esta no es la primera vez que se observa este fenómeno. En el sistema de biosíntesis de la cepa de *E. coli* AG1/pCA24NgshA (Monrás et al., 2012), se analizó la emisión de fluorescencia desde células individuales por medio de microscopía de fluorescencia. Este análisis indicó que la emisión de fluorescencia se concentra en estructuras definidas, de reducido tamaño, posicionadas principalmente en los polos de la célula (Figura 3B). Estas estructuras poseen forma de gránulo y pueden ubicarse dentro o fuera de la célula, “encapsuladas” en un tipo de membrana y adheridas a los polos celulares. Este antecedente es relevante porque enfatiza una potencial respuesta general frente a la exposición a metales pesados y la biosíntesis de QDs, y sugiere que su biosíntesis se ve mediada por una división polar no canónica, que podría estar mediando la acumulación/expulsión de QDs.

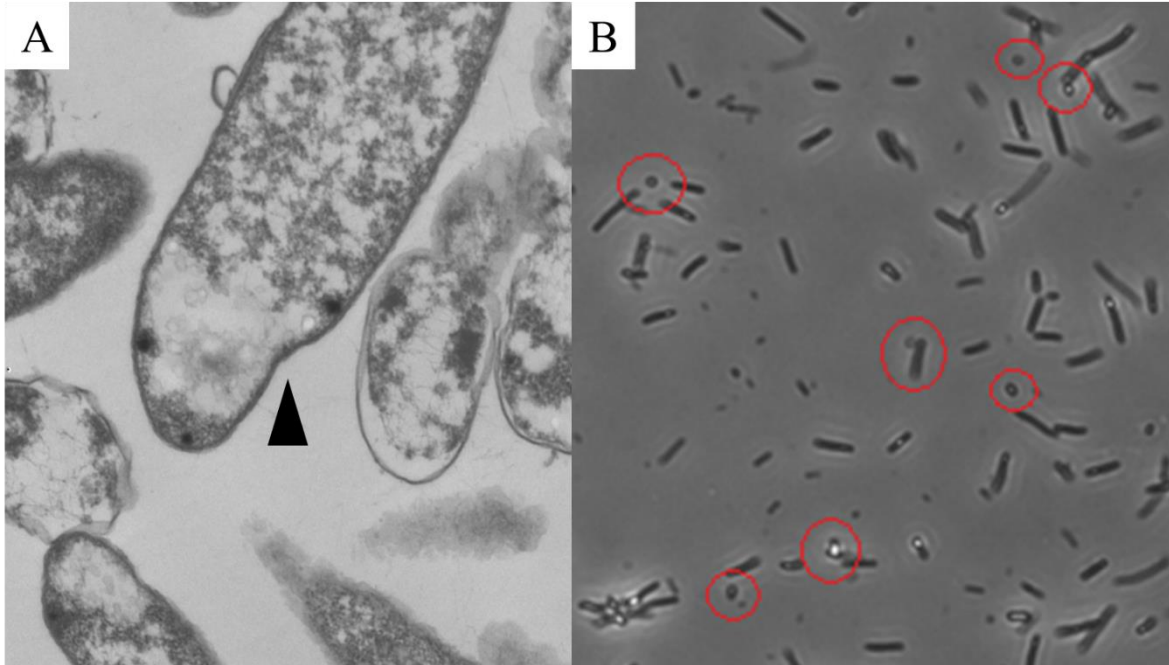


Figura 3: Evidencia de división polar, no canónica, durante la biosíntesis de QDs. (A) Micrografía de TEM de célula de *E. coli* durante la biosíntesis de QDs de cobre. La punta de flecha indica una invaginación polar cercana a cristales electrondensos (resultados no publicados). (B) Células de la cepa *E. coli* AG1/pCA24NgshA luego de exposición a CdCl_2 y K_2TeO_3 , visualizada por microscopía de epifluorescencia. Imagen tomada de Monrás et al., 2012.

1.4. Minicélulas: rol en la división y relación con metales

En distintos sistemas de biosíntesis de QDs basados en cadmio en *E. coli*, la evidencia obtenida a la fecha indica que el proceso involucra: i) la asociación a membrana de los QDs sintetizados, ii) una acumulación preferentemente polar de los QDs, con cambios morfológicos en la membrana, y iii) división polar no canónica y presencia de QDs en células pequeñas. Este último punto es interesante, ya que considerando los reportes presentados sobre los efectos morfológicos de la desregulación de la división celular en *E. coli*, se puede proponer que la biosíntesis de QDs en esta bacteria está relacionada, al menos en parte, a un proceso conocido como formación de minicélulas, que corresponde a un evento ligado fuertemente a la división celular y que ha tomado relevancia en el último tiempo por las oportunidades de investigación básica y biotecnológicas asociadas (Farley et al., 2016).

La producción de minicélulas ha sido descrita desde el año 1930 (Hoffman & Frank, 1963). A pesar de que se han estudiado principalmente como herramientas biotecnológicas, como por ejemplo para entrega de drogas en tratamiento de cáncer (Zhang et al., 2018; Briolay et al., 2021), sólo recientemente se ha podido dilucidar el mecanismo molecular asociado a su

generación desde la célula y las características genéticas necesarias de las cepas que lo sufren. Las minicélulas son estructuras pequeñas, de tamaño variable, con un promedio de 0,4 μm de diámetro (Burt et al., 2020), que se generan por división a partir del polo de una célula entera, pero que no sufren división celular y no presentan ADN genómico (Adler et al., 1967). Originalmente, se había observado que algunas especies bacterianas son altamente propensas a producir minicélulas, como por ejemplo *Proteus vulgaris*, donde se describió la formación de “gránulos” a partir del polo de células bacilares, los que no se dividían y se mantenían inmóviles (Kvittingen, 1949). Por su parte, este fenómeno fue muy difícil de describir en *E. coli*, donde frente a condiciones específicas de cultivo como la exposición a uretano (inhibidor de crecimiento) o un aumento de temperatura, se observó la formación de gránulos de origen polar (Hoffman & Frank, 1963). En el reporte de Hoffman & Frank, se preparó una serie de cultivos de *E. coli* a una temperatura de 43,5 °C, y sólo se pudo detectar un evento de formación de minicélulas. Esto, junto a los reportes previos, llevaron a proponer que este fenómeno corresponde a una “debilidad en la división celular” que ocurría frente a condiciones de estrés. No obstante, su baja incidencia no permitía establecerlo como un mecanismo regulado de respuesta frente al estrés. Unos años más tarde, se aisló una cepa de *E. coli* productora de minicélulas por medio de screening de resistencia a radiación ionizante (Adler et al., 1967). Análisis morfológicos evidenciaron que esta cepa producía minicélulas en cultivo, a partir de divisiones en los polos sin necesidad de un estímulo estresor (Figura 4A, Adler et al., 1967). Al caracterizar las minicélulas producidas, estas no presentaban ADN cromosomal, pero sí proteínas y ARN. De hecho, podían efectuar respiración celular y otras actividades metabólicas (Adler et al., 1967). Análisis posteriores dilucidaron que esta cepa presentaba una delección del gen *minC* (ΔminC), codificante para la proteína MinC, efectora del sistema Min. Este sistema se compone como operón de las proteínas MinC, MinD y MinE, las cuáles oscilan a lo largo del bacilo y localizar el septum de división al centro de la célula (Ramm et al., 2019). Estudios siguientes derivados del trabajo de Adler et al. (1967) llevaron a la conclusión de que el requerimiento genético para la producción constitutiva de minicélulas correspondía a mutaciones del sistema Min (Pichoff et al., 1995; Yu & Margolin, 2000). De hecho, ΔminC no es la única mutación del sistema que puede crear este fenotipo. Delecciones en *minC*, *minD* o el operón completo, o una sobreexpresión de *minE*, generan un fenotipo productor de minicélulas (Ramm et al., 2019).

Originalmente, el trabajo de Adler en 1967 reforzó la relación entre la formación de minicélulas y los estímulos de estrés. No obstante, los informes posteriores permitieron entender la importancia de las proteínas del sistema Min en la división de la célula, y como su delección generaba problemas en el proceso, por lo que se daba paso a una nueva pregunta: Si efectivamente la producción de minicélulas se relaciona con estrés en la célula, ¿cuál es la utilidad de generar células “abortivas” sin ADN y sin capacidad de proliferar? Como una forma de contestar esta pregunta, se quiso dilucidar si la delección del gen *minC* podría entregar alguna ventaja adaptativa a la célula frente a condiciones de estrés. Para comprobar esto, se generó un modelo de estudio utilizando una cepa de *E. coli* Δ *minC*, productora constitutiva de minicélulas, y se utilizó estreptomicina como estímulo de estrés (Rang et al., 2018). Frente a una concentración subletal del antibiótico, la cepa Δ *minC* generó más minicélulas que en condiciones control. En contraste, la cepa WT no produjo minicélulas en ninguna condición experimental. Algo importante es que el tiempo de duplicación celular es mayor en la cepa mutante. Esto se explica por la misma producción de minicélulas, que “ralentiza” el crecimiento. También se observó que el estrés por antibióticos aumenta la generación de cuerpos de inclusión. Curiosamente, en la cepa Δ *minC*, estos cuerpos de inclusión se relocalizan en el polo celular para ser contenidos y eliminados al interior de minicélulas (Figura 4B). Finalmente, se realizaron ensayos de tolerancia a estreptomicina, revelando que la cepa Δ *minC* es más tolerante al antibiótico que la cepa WT (Rang et al., 2018). En conjunto, estos resultados llevan a concluir que la producción de minicélulas posee un “costo” asociado, pero a su vez, existe un beneficio de supervivencia frente a un ambiente de estrés. Este trabajo, en conjunto a otros estudios, ayudaron a proponer el modelo actual de envejecimiento celular en *E. coli* (Figura 4C, Shi et al., 2020). En este modelo, se indicó que las células poseen dos polos: un polo “antiguo”, derivado directamente de la célula madre, y un polo “nuevo”, sintetizado de novo. Los polos antiguos tienden a acumular elementos de daño a la célula, como lo son cuerpos de inclusión (Rang et al., 2018), lo que se relaciona a la eliminación de estos al interior de minicélulas.

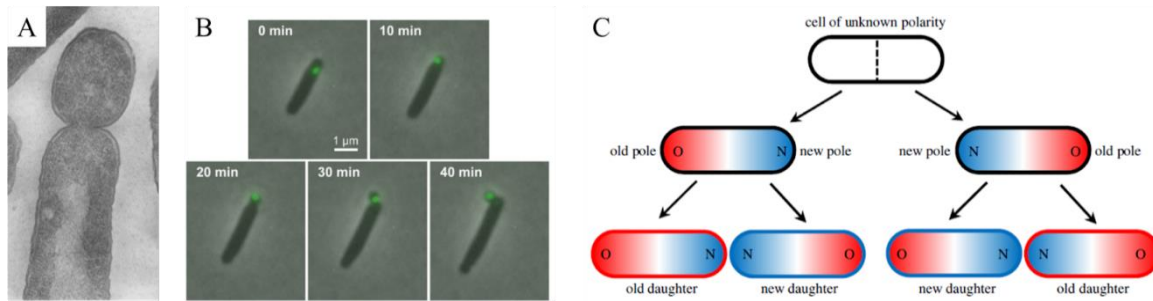


Figura 4: Minicéculas y eliminación de elementos de daño celular. (A) Micrografía de TEM de *E. coli* $\Delta minC$ formando una minicélula sin ADN desde el polo celular. Imagen tomada de Adler et al., 1967. (B) Eliminación *in vivo* de cuerpos de inclusión en minicéculas. En verde, se marca la proteína IbpA, chaperona de unión a cuerpos de inclusión. Imagen tomada de Rang et al., 2018. (C) Modelo de envejecimiento celular. Las células poseen polos antiguos y nuevos. Los polos antiguos acumulan elementos de daño a la célula como proteínas mal plegadas, por lo que al generarse una minicélula, esta elimina estos elementos de daño desde la célula. Imagen tomada de Shi et al., 2020.

El trabajo de Rang et al. (2018) y el modelo propuesto por Shi et al. (2020) permiten sugerir que la producción de minicéculas funciona como un mecanismo de eliminación de daño celular, lo que a su vez otorga una ventaja proliferativa frente a condiciones de estrés. No obstante, la formación de minicéculas no ocurre como un mecanismo regulado, sino que es a causa de una mutación (Adler et al., 1967). Se puede suponer que si células WT fueran capaces de producir minicéculas, sería posible su supervivencia frente a condiciones de acumulación de daño celular, pero empíricamente esto no ocurre, y es muy difícil de analizar. Los reportes de nuestro grupo de la biosíntesis de QDs en *E. coli*, muestran elementos muy similares a la producción de minicéculas, como la presencia de invaginaciones polares y la formación de estructuras tipo gránulos que contienen las nanopartículas sintetizadas (Monrás et al., 2012). Las similitudes morfológicas entre los procesos apoyan la propuesta de que la producción de QDs está asociada la generación de minicéculas y que estas minicéculas poseen un rol de resistencia a estrés. No obstante, es necesario llevar a cabo más estudios que puedan indicar que efectivamente se están formando minicéculas en cepas bacterianas sin mutaciones del sistema Min, junto a análisis que ayuden a entender que ocurre en cepas productoras de minicéculas durante la biosíntesis de QDs.

Actualmente, no existen antecedentes concretos que puedan relacionar la exposición a iones de metales pesados con la producción de minicéculas en bacterias. Sin embargo, se han podido analizar fenotipos *minicell-like* en otras especies distintas a *E. coli*. Por ejemplo, en *Neisseria gonorrhoeae* se ha observado un fenotipo *minicell-like* en una cepa mutante que

no expresa la proteína OxyR, al mismo tiempo que se ha propuesto una posible regulación del sistema Min por esta misma proteína (Parti et al., 2013). Un fenotipo similar se ha descrito en cepas marinas como *Halomonas meridiana* y *Marinobacter algicola*, donde se observa la producción de gránulos similares a minicélulas frente a exposición a manganeso (Fernandes et al., 2018). Finalmente, se ha podido identificar una posible regulación del sistema Min por la proteína Fur en *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, lo que relacionaría la exposición al hierro con un potencial fenotipo de producción de minicélulas (Haraszthy et al., 2006). Sin embargo, estos fenómenos nunca se han relacionado efectivamente con la producción de minicélulas, ni tampoco han sido descritos como tal.

Un antecedente adicional de la relación entre la biosíntesis de QDs y la formación de minicélulas está asociada a las proteínas que recubren las nanopartículas sintetizadas. Nuestro grupo analizó las proteínas unidas en QDs producidas por *E. coli*, *Halobacillus* sp. y *Acidithiobacillus ferrooxidans* (resultados no publicados). Estas proteínas se pueden agrupar en cinco categorías: respuesta a estrés, unión a ADN, chaperonas, asociadas a ribosomas y enzimas metabólicas. De particular interés son las chaperonas, ya que se ha podido describir su función en la estabilización de las nanopartículas generadas en cepas bacterianas, como es el caso del complejo GroEL/GroES, el cual es capaz de aislar, “plegar”, controlar el tamaño y entregar estabilidad térmica a QDs de CdS sintetizadas por medios químicos (Ishii et al., 2003). Existen varios reportes que podrían relacionar el enriquecimiento de determinadas proteínas con la producción de QDs y minicélulas en bacterias. Por ejemplo, se analizó la cepa denominada P4 de *E. coli* que presenta resistencia intrínseca a cadmio. Al analizar cambios de expresión de proteínas frente a exposición a cadmio, se pudo observar un aumento de expresión de las chaperonas DnaK y ClpB (Khan et al., 2015). En otro reporte, se analizaron cambios proteómicos una cepa de *E. coli* resistente al oxianión telurito (Aradská et al., 2013). Después de exponer a la bacteria a K_2TeO_3 , esta sufrió un incremento de expresión de la chaperona DnaK. Estos reportes sugieren que la exposición de *E. coli* a metales usados comúnmente en la producción de QDs, induce un aumento de expresión de chaperonas, incluso en cepas con resistencia a dichos metales, lo que sugiere también que la producción de QDs conlleva un estado de estrés por proteínas mal plegadas, algo que ya se ha relacionado a la formación de minicélulas (Rang et al., 2018; Shi et al., 2020).

Junto a los antecedentes anteriores, existen varios trabajos donde se estudian las proteínas enriquecidas de forma diferencial en células bacilares y minicélulas en *E. coli*. Por ejemplo, usando una cepa de *E. coli* mutante del operón Min se observó un enriquecimiento de varias proteínas metabólicas en la membrana de las minicélulas generadas por la cepa (Lai et al., 2004). En otro reporte, en *E. coli* WT se analizaron las proteínas que se relocalizan a distintas partes de la célula, donde se pudo dilucidar que algunas de las proteínas que se ubican en los polos son similares a las proteínas unidas a QDs, entre las que destaca la chaperona GroEL (Li & Young, 2012). En este mismo trabajo se observó que algunas proteínas se distribuyen en forma ubicua, mientras que otras se ubican de preferencia en uno o ambos polos. A su vez, otro reporte determinó las diferencias proteómicas de membrana interna de una cepa de *E. coli* WT en comparación con una cepa con delección del sistema Min (Lee et al., 2016). Los resultados indicaron el enriquecimiento de varias proteínas en las minicélulas generadas, destacando especialmente 12 proteínas metabólicas en la cepa con la mutación, lo que llevó a sugerir una adaptación metabólica frente a la producción de minicélulas.

1.5. Implicancias y objetivo

Los reportes anteriores sugieren que la biosíntesis de QDs y la formación de minicélulas son eventos relacionados. La biosíntesis de QDs en bacterias induce un estado de estrés por proteínas mal plegadas. Esto se concluye por el aumento de expresión de proteínas chaperonas que se mantiene incluso si la cepa presenta medios de resistencia a las sales metálicas (Aradská et al., 2013, Helbig et al., 2008). Así también, se sugiere que el proceso de producción de minicélulas tiene una relación con este tipo de estrés dada la capacidad de cepas productoras para reposicionar y eliminar cuerpos de inclusión a través de minicélulas (Rang et al., 2018) y la reubicación polar diferenciada de algunas proteínas como la chaperona GroEL (Li & Young, 2012). Estos antecedentes coinciden con las observaciones de nuestro grupo, donde la producción y eliminación de QDs ocurre a través de estructuras esféricas que se posicionan en los polos de la célula. Esto sugiere que estas estructuras que contienen los QDs y que se encargan de su eliminación corresponden a minicélulas, lo que a su vez correspondería a un mecanismo de respuesta a metales.

En base a estos antecedentes, en el presente trabajo se propuso evaluar la formación de minicélulas frente a la biosíntesis de QDs. Se realizaron estudios morfológicos de la biosíntesis de QDs de CdS y CdTe en el sistema de la cepa de *E. coli* AG1/pCA24NgshA. Además, se analizaron los cambios en el proceso de biosíntesis de QDs de CdS en cepas mutantes del sistema Min. La importancia de este trabajo radica en ayudar a entender los cambios fisiológicos de la célula durante la biosíntesis de QDs, con tal de comprender el mecanismo involucrado, para poder ejercer un mejor control sobre el proceso. Así también, se plantea analizar la posibilidad de generar minicélulas cargadas con QDs fluorescentes para mejorar su biocompatibilidad y, en consecuencia, su número de aplicaciones.

2. Hipótesis

La biosíntesis de QDs de cadmio en *E. coli* induce la generación de minicélulas como una respuesta para la expulsión del metal de la célula.

3. Objetivo general

Caracterizar las estructuras tipo minicélulas formadas en *E. coli* durante la biosíntesis de QDs de cadmio, y determinar su importancia en la expulsión del metal.

4. Objetivos específicos

i) Determinar si las estructuras formadas en *E. coli* durante la biosíntesis de QDs de cadmio corresponden a minicélulas.

ii) Analizar el rol de la formación de minicélulas en la biosíntesis de QDs de cadmio en *E. coli* y la expulsión del metal.

5. Métodos

5.1. Inducción y sobreexpresión de la proteína GshA

Para corroborar la inducción de la expresión de la proteína GshA en la cepa *E. coli* AG1/pCA24NgshA, se realizó un análisis de proteínas totales por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Para esto, una colonia de la cepa *E. coli* AG1/pCA24NgshA fue cultivada toda la noche en caldo de lisogenia (LB) líquido (composición: 0,5% extracto de levadura, 1% triptona, 1% NaCl), suplementado con 25 µg/mL de cloranfenicol (Cm) a 37 °C con agitación constante. Se realizó una dilución en una razón 1:50 en medio LB fresco suplementado con Cm, y este cultivo se incubó a 37 °C con agitación constante hasta alcanzar un valor de densidad óptica (DO₆₀₀) ~ 0,5. Luego, se agregó al cultivo 0,5 mM de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y se incubó por 1, 2, 3, y 4 horas a 37 °C. Luego de esto, las células se sedimentaron por centrifugación a 7690 g por 7 minutos a 4 °C y se lavaron 2 veces con Tris-HCl 50 mM pH 8.5. El pellet de células se resuspendió en 1 mL de la misma solución de Tris-HCl, suplementado con 1 mM de inhibidor de proteasa fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y las células se rompieron por sonicación. Las muestras se centrifugaron a 14000 g por 10 minutos y se descartó el pellet para obtener un extracto crudo. Para la cuantificación de proteínas desde el extracto obtenido se utilizó el método de Bradford. Como controles, se realizó el mismo procedimiento sin la adición de IPTG, y también con la cepa *E. coli* AG1/pCA24N (WT) que porta el plásmido vacío. Para la evaluación de proteínas presentes en la fracción insoluble, los restos celulares obtenido luego de la sonicación fueron resuspendidos en urea 8 M durante 1 hora a temperatura ambiente, y se procedió de la misma forma anterior.

5.2. Biosíntesis intracelular de QDs

5.2.1. Biosíntesis de QDs de CdS y CdTe en fase estacionaria

Se realizó el protocolo de biosíntesis intracelular de QDs previamente descrito (Monrás et al., 2012). Una colonia de la cepa de *E. coli* AG1/pCA24NgshA fue cultivada toda la noche en medio LB líquido, suplementado con 25 µg/mL de Cm a 37 °C con agitación constante. Se realizó una dilución en una razón 1:50 en medio LB fresco suplementado con Cm, y este cultivo se incubó a 37 °C con agitación constante hasta alcanzar un valor de DO₆₀₀ ~ 0,5. Luego, se agregó al cultivo 0,5 mM de IPTG y se incubó por 4 horas a 37 °C. Para iniciar la biosíntesis, al cultivo se agregaron 10 µg/mL de CdCl₂ para la síntesis de QDs de CdS, o 10

$\mu\text{g/mL}$ de CdCl_2 y $0,5 \mu\text{g/mL}$ de K_2TeO_3 para la síntesis de QDs de CdTe. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 18 horas con agitación constante. Luego, las células se centrifugaron a 7690 g por 30 minutos a 4°C y se lavaron con buffer fosfato de potasio 50 mM pH $7,4$. Los pellets fueron expuestos a luz UV (365 nm) para registro fotográfico. Como controles, se realizó el mismo procedimiento sin la adición de metales (control negativo de biosíntesis) y con la cepa *E. coli* AG1/pCA24N (WT) que porta el plásmido vacío (control de efecto del vector).

5.2.2. Biosíntesis de QDs de CdS en fase exponencial

Una colonia de la cepa de *E. coli* BW25113 fue cultivada toda la noche en medio LB líquido a 37°C con agitación constante. Se realizó una dilución en razón 1:100 en medio mínimo M9-glucosa (composición: $42,2 \text{ mM}$ Na_2HPO_4 , 22 mM KH_2PO_4 , $8,56 \text{ mM}$ NaCl , $18,7 \text{ mM}$ NH_4Cl , 1 mM MgSO_4 , $0,1 \text{ mM}$ CaCl_2 y $0,2\%$ glucosa) suplementado con $60 \mu\text{g/mL}$ de CdCl_2 . Este cultivo se incubó a 37°C con agitación constante durante distintos tiempos. Luego de la incubación, las células se centrifugaron a 7690 g por 30 minutos a 4°C y se lavaron con buffer fosfato de potasio 50 mM pH $7,4$. Los pellets fueron expuestos a luz UV (365 nm) para registro fotográfico. Este mismo proceso fue realizado para las cepas de *E. coli* ΔminC y ΔminCDE , generadas a partir de la cepa BW25113 por el método de Datsenko y Wanner (Datsenko & Wanner, 2000). Como control negativo de biosíntesis, se realizaron reacciones sin la adición de CdCl_2 .

5.3. Purificación de nanopartículas y análisis de propiedades ópticas

Pellets bacterianos obtenidos de 100 mL de cultivo, luego de condiciones de biosíntesis (descrito arriba), fueron suspendidos en 10 mL de NaOH 1M e incubados a 90°C durante 10 minutos. Se recuperaron los pellets por centrifugación y se resuspendieron en 10 mL de Tris-HCl pH 8 50 mM , con 1% de SDS, para luego ser tratados por sonicación. Las muestras se volvieron a centrifugar para remover los restos celulares. Se eliminaron los restos celulares de los sobrenadantes por medio de filtros de membrana de tamaño de poro de $0,22 \mu\text{m}$. Las nanopartículas fueron concentradas en filtros Amicon® con tamaño de corte de 10 kDa hasta obtener un volumen aproximado de $200 \mu\text{L}$. Estas fracciones, altamente enriquecidas en nanopartículas, fueron caracterizadas usando un lector de microplacas Synergy H1 (BioTek

Instrument Inc.). Los espectros de absorción se registraron entre 300 y 700 nm, y los de emisión de fluorescencia entre 390 y 700 nm, excitando a 360 nm.

5.4. Microscopía óptica y de fluorescencia

Para la visualización microscópica, se utilizó un microscopio de epifluorescencia MF606 (BW OPTICS). Los pellets bacterianos fueron resuspendidos en 200 μ l de buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7,4. Luego, una alícuota de 5 μ l fue montada en un portaobjetos y cubierta con un cubreobjetos. Las muestras se observaron con objetivos 40X (NA: 0,65) y 100X (NA: 1,25). Para la visualización de emisión de fluorescencia, se utilizó el filtro de excitación “U”, excitando con una longitud de onda entre 330-380 nm. Para el análisis de imágenes y medición de longitud celular se utilizó el programa Fiji-ImageJ (Schindelin et al., 2012).

5.5. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Pellets celulares obtenidos luego de las distintas condiciones de biosíntesis fueron fijados con glutaraldehído 2,5%, tratadas con tetróxido de osmio 1% y luego infiltradas con resina epóxica. Se obtuvieron microcortes por medio de ultramicrotomo y estos fueron montados en una grilla comercial de cobre. Se obtuvieron micrográficas utilizando un microscopio electrónico Talos F200C G2.

5.6. Ensayo de difusión en placa

Las cepas de *E. coli* BW25113, Δ *minC* y Δ *minCDE* fueron cultivadas en medio LB líquido a 37 °C con agitación constante hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento ($DO_{600} \sim 0,2$). Estos cultivos fueron utilizados para sembrar sobre medio LB-agar. Luego, se colocaron 3 discos de papel filtro estériles sobre la placa. Sobre cada disco se colocó una gota de 10 μ L de una solución 300 mM de $CdCl_2$, lo que equivale a 550 μ g de la sal. Las placas se incubaron a 37 °C toda la noche. Luego de la incubación, las placas se fotografiaron en un fotodocumentador Uvitec Cambridge Firereader Max, y se cuantificó el diámetro de inhibición de crecimiento con el programa Fiji-ImageJ para calcular el área de inhibición del crecimiento. El análisis estadístico de dos grupos se realizó por t-test de dos colas, considerando como significativo un valor $p < 0,05$.

5.7. Cuantificación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)

Una colonia de las cepas de *E. coli* BW25113, $\Delta minC$ y $\Delta minCDE$ fueron cultivadas toda la noche en medio LB líquido a 37 °C con agitación constante. Los cultivos fueron diluidos en una razón 1:1000 en medio LB líquido fresco suplementado con distintas concentraciones de CdCl₂. Los cultivos se incubaron durante 48 horas a 37 °C con agitación. El crecimiento se evaluó de forma visual, reportando crecimiento positivo o negativo.

5.8. Enriquecimiento de minicélulas

Para generar una fracción enriquecida en minicélulas, se utilizó el método descrito por Lai et al. (2004) y Jivrajani et al. (2013), con modificaciones. Pellets de las cepas $\Delta minC$ y $\Delta minCDE$ obtenidos después de realizar biosíntesis en un volumen de 200 mL, fueron resuspendidos en 40 mL de medio LB líquido. Las suspensiones se centrifugaron a 1000 g por 10 minutos a 4 °C. El pellet obtenido corresponde a una fracción enriquecida en células bacilares, mientras que el sobrenadante se encuentra enriquecido en minicélulas. Para incrementar la pureza de la fracción de minicélulas el sobrenadante fue incubado a 37 °C con agitación constante durante 45 minutos. Luego, se agregaron 150 µg/mL de ampicilina y se volvió a incubar durante 2 horas. Para eliminar los restos celulares, el cultivo se centrifugó a 400 g durante 5 minutos a 4 °C. Finalmente, la fracción fue centrifugada a 7690 g durante 30 minutos a 4 °C y las minicélulas se lavaron con buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7,4. Para incrementar la pureza de la fracción de células bacilares el pellet enriquecido en células bacilares se resuspendió en 40 ml de buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7,4 y se centrifugó a 1000 g por 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue descartado. Este proceso fue repetido una segunda vez. El análisis de pureza y emisión de fluorescencia se realizó por microscopía, según lo descrito previamente. Para la cuantificación de emisión de fluorescencia relativa se utilizó el programa Fiji-ImageJ. Se seleccionaron células/minicélulas y se calculó la densidad total de píxeles, y se normalizó por el área de la célula respectiva. El análisis estadístico de dos grupos se realizó por t-test de dos colas, considerando como significativo un valor $p < 0,05$. Para cuantificación de cadmio por espectroscopía de absorción atómica a la llama (FAAS), las fracciones enriquecidas fueron liofilizadas, pesadas y luego digeridas en un digestor de microondas. 0,05 gramos de cada muestra fueron traspasados a un vaso de teflón en conjunto con 5 mL de ácido nítrico 60% y 4 mL de H₂O₂. Una vez terminado el programa, las muestras fueron filtradas usando un filtro Whatmann N°42 y se aforaron a 25 mL con

agua destilada. Las muestras fueron cuantificadas usando un espectroscopio de absorción atómica Perkin Elmer 3110 midiendo absorción a 228,8 nm, slit 0,7 nm. Los datos de absorbancia se compararon con una curva de calibración con un rango entre 0,028 y 2 mg/L, elaborada usando el estándar de cadmio 1000 mg/l Cd Certipur®. Con el peso seco de la muestra, se estimó la cantidad de células presentes considerando un peso aproximado de 0.4 pg para células bacilares y extrapolando a minicélulas según su tamaño. Además, midiendo un tamaño promedio de células y minicélulas, se calculó un volumen promedio para cada tipo celular. La cantidad de cadmio obtenida por FAAS fue tabulada y normalizada por el volumen de una célula.

6. Resultados

6.1. Inducción y sobreexpresión de la proteína GshA

Como modelo de biosíntesis intracelular de QDs en *E. coli*, se utilizó un sistema desarrollado por nuestro grupo basado en el aumento de los niveles de GSH intracelular (Monrás et al., 2012). Este sistema involucra la cepa *E. coli* AG1/pCA24NgshA, la cual sobreexpresa la proteína glutamato-cisteína ligasa (GshA), al inducir con IPTG. Esta proteína es la enzima limitante en la vía de biosíntesis de glutatión (GSH) y su sobreexpresión permite un aumento del contenido intracelular de GSH. Previamente, se evaluó que la inducción durante 4 horas genera una máxima expresión de la enzima, relacionada a un máximo nivel de GSH intracelular (Monrás et al., 2012). Para comprobar la expresión de la proteína en la cepa, se realizó una cinética de inducción en presencia de 0,5 mM de IPTG y se analizó el perfil de proteínas totales mediante SDS-PAGE. Después de la inducción con IPTG, se observa una banda de aproximadamente 58 kDa, la cual correspondería a la proteína GshA (Figura 5B). Además, a medida que se extiende el tiempo de inducción con IPTG, se incrementa la inducción de la proteína, evidenciado por el aumento del tamaño de la banda correspondiente. Al realizar el mismo ensayo en la cepa *E. coli* AG1/pCA24N, la cual presenta un vector vacío, no se observa la aparición de la banda correspondiente a la proteína (Figura 5A). Este resultado indica que la cepa *E. coli* AG1/pCA24NgshA es capaz de sobreexpresar la proteína GshA, lo que comprueba su validez para la biosíntesis de QDs de CdS y CdTe.

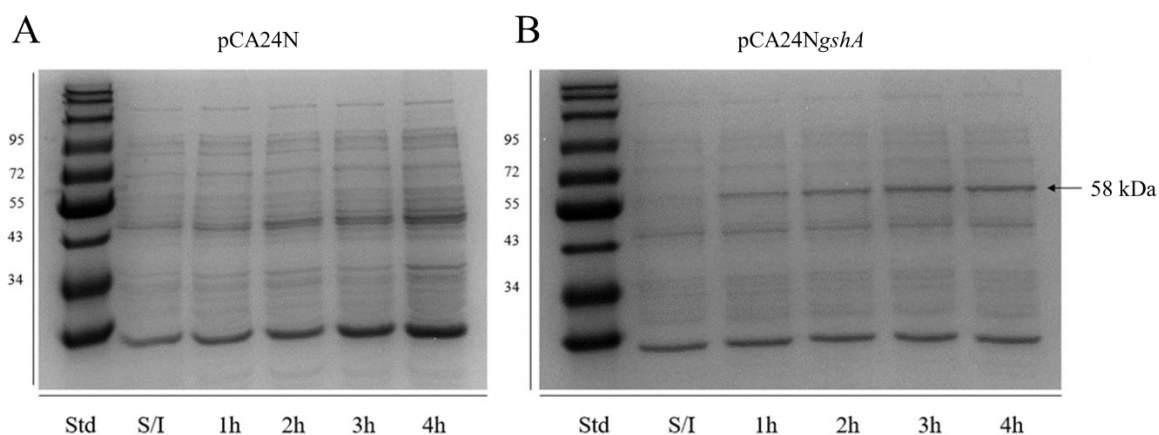


Figura 5: Cinética de inducción de la proteína GshA. Análisis de proteínas totales por SDS-PAGE de las cepas las cepas de *E. coli* AG1/pCA24N (A), AG1/pCA24NgshA (B) después de la exposición a IPTG (0,5 mM) por los tiempos indicados (S/I: Sin inducción). Los pesos de cada banda se indican en kilodalton (kDa). La flecha negra indica la banda de ~58 kDa correspondiente a la proteína GshA. Std: Estándar de peso molecular “Blue Prestained Protein Standard, Broad Range (11-250 kDa)”, New England BioLabs P7718S.

6.2. Biosíntesis intracelular de QDs de CdS y CdTe

Una vez comprobada la expresión de la proteína GshA se utilizó esta cepa para la biosíntesis de QDs de CdS y CdTe, de acuerdo con lo descrito en la sección 5 de “Métodos”. Por las propiedades de fluorescencia intrínsecas de estas nanopartículas, la síntesis fue evaluada exponiendo los pellets bacterianos post-biosíntesis a luz UV (365 nm). Los pellets de la cepa *E. coli* AG1/pCA24NgshA muestran emisión de fluorescencia luego de ser tratados con CdCl₂ o CdCl₂ y K₂TeO₃ (Figura 6, fila superior). En comparación, no se observa emisión de fluorescencia cuando no se adicionan precursores metálicos. Además, al exponer la cepa *E. coli* AG1/pCA24N con el vector vacío a las mismas condiciones de biosíntesis, no se observa emisión de fluorescencia (Figura 6, fila inferior). Estos resultados indican que bajo estas condiciones ocurre biosíntesis de QDs de CdS y CdTe en la cepa *E. coli* AG1/pCA24NgshA, la cuál sería dependiente de la sobreexpresión de la proteína GshA y el subsecuente aumento de la concentración de GSH intracelular.

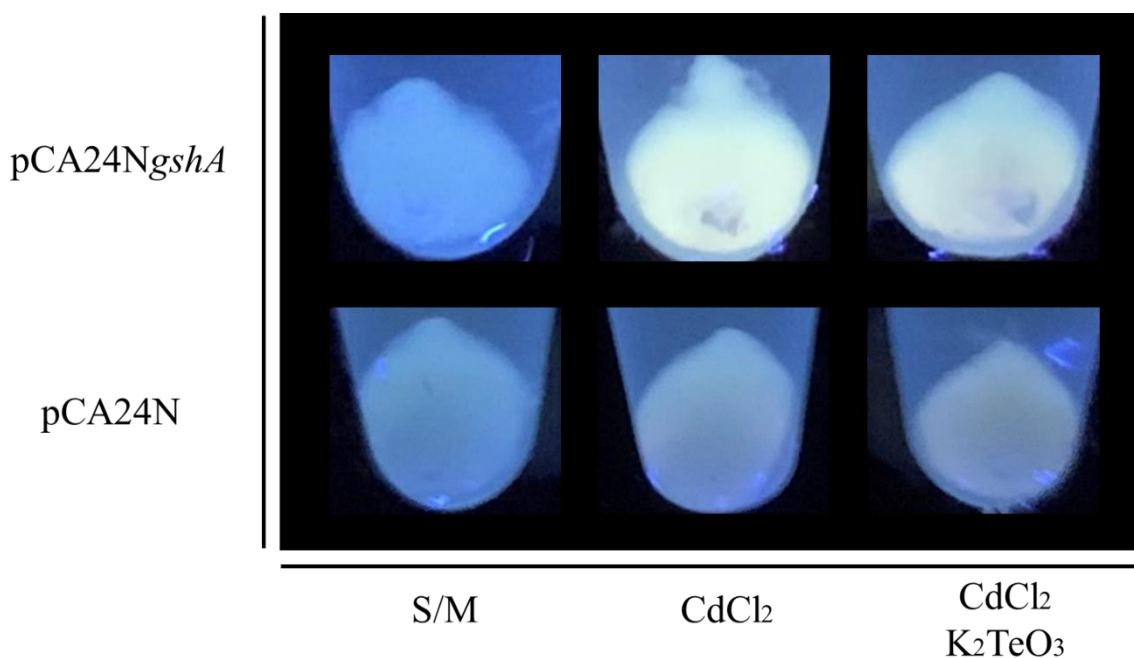


Figura 6: Biosíntesis intracelular de QDs de CdS y CdTe en *E. coli*. Emisión de fluorescencia de pellets de las cepas de *E. coli* AG1/pCA24NgshA y la cepa control AG1/pCA24N luego de tratamiento con CdCl₂ o CdCl₂ y K₂TeO₃ durante 18 horas. Los pellets fueron expuestos a luz UV (365 nm) para evaluar la fluorescencia.

Para confirmar que la emisión de fluorescencia corresponde a la síntesis de QDs, estas se purificaron desde los pellets bacterianos y se caracterizó sus propiedades ópticas de absorción

y emisión de fluorescencia mediante espectrofotometría UV-visible. Los espectros de absorción (Figura 7A) y emisión de fluorescencia (Figura 7B) evidenciaron señales características de QDs de cadmio (Bao et al., 2010; Monrás et al., 2012; Bruna et al., 2019). El espectro de absorbancia muestra picos de absorción entre 300 y 400 nm. Los espectros de emisión de fluorescencia muestran amplios rangos de emisión, con picos entre 500 y 550 nm. Estos resultados confirman que se están sintetizando QDs basados en cadmio.

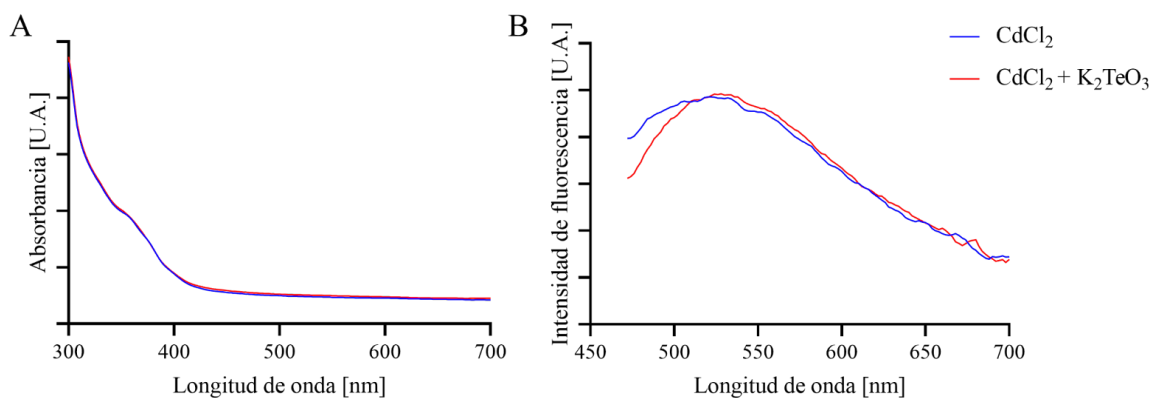


Figura 7: Propiedades ópticas de QDs sintetizados en *E. coli*. Espectros de absorción (A) y emisión (B) de fluorescencia de QDs purificados de CdS y CdTe biosintetizados por *E. coli* AG1/pCA24NgshA. Los espectros de absorción se registraron entre 300 y 700 nm, y los de emisión de fluorescencia entre 390 y 700 nm, excitando a 360 nm.

6.3. Estudios morfológicos de *E. coli* en condiciones de biosíntesis

Para determinar como la biosíntesis de QDs de CdS y CdTe afectan la morfología de *E. coli*, células de la cepa *E. coli* AG1/pCA24NgshA fueron analizadas por microscopía de fluorescencia, excitando con luz UV (330-380 nm). Luego de la exposición a metales se observó que las células expuestas a CdCl₂ o CdCl₂/K₂TeO₃ muestran emisión de fluorescencia (Figura 8B, 8C), lo que se relaciona con la emisión de los pellets expuestos a luz UV (Figura 6). La emisión de fluorescencia de las células se solapa con las células en campo claro, lo que sugiere que las nanopartículas sintetizadas se encuentran en el espacio citosólico o asociados a la membrana celular. En contraste, no se observa emisión de fluorescencia cuando las células se incuban sin precursores metálicos (Figura 8A). Al exponer la cepa control AG1/pCA24N a las condiciones de biosíntesis, se detectan escasas células con emisión de fluorescencia de baja intensidad (Figura 8E, 8F). Esto indica que en

las condiciones de biosíntesis usadas, la sobreexpresión de la proteína GshA favorece la biosíntesis de QDs.

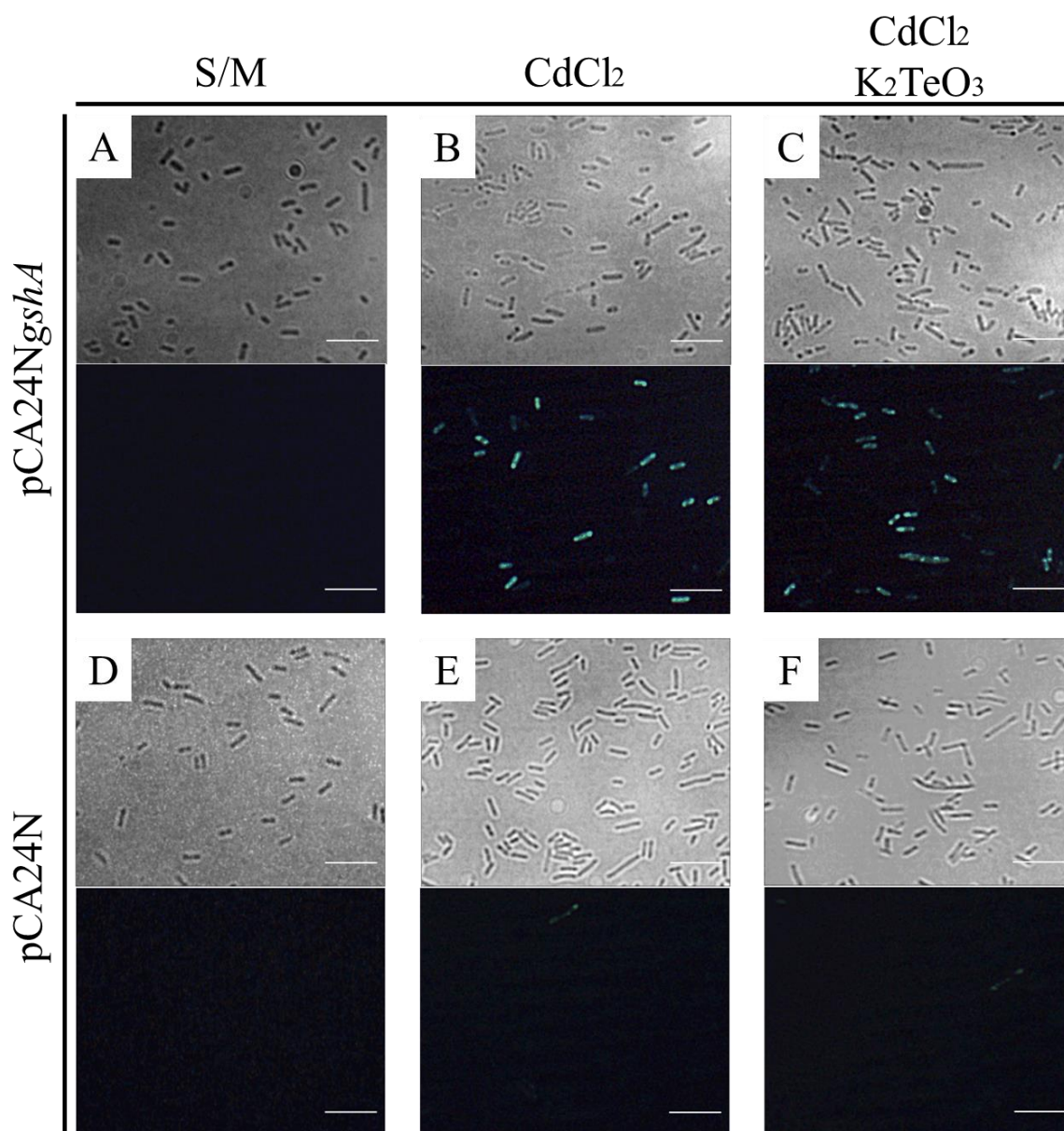


Figura 8: Emisión de fluorescencia de células individuales. Imágenes representativas de microscopía óptica (fila superior) y de fluorescencia (fila inferior) de las cepas de *E. coli* AG1/pCA24NgshA (A, B y C) y la cepa control AG1/pCA24N (D, E y F), luego del tratamiento con CdCl₂ (B y E), CdCl₂ y K₂TeO₃ (C y F), o sin tratamiento (A y D). Las imágenes fueron capturadas con un objetivo 40X (NA: 0,65). Las imágenes de fluorescencia fueron capturadas con un filtro de excitación UV (330-380 nm). Barra de escala = 10 μm.

Un análisis mediante microscopía de las células fue realizado para determinar la localización de la emisión de fluorescencia y la acumulación de nanopartículas. Se detectó la fluorescencia desde células esféricas (Figura 9A, 9E), y un gran porcentaje de la población

celular presentó acumulación polar de fluorescencia (Figura 9B, 9C, 9F, 9G), tanto en uno, como en ambos polos. Además, se detectó que en células filamentosas existe una distribución aleatoria de la emisión de fluorescencia a lo largo de la célula (Figura 9D, 9H). Parte de estos elementos habían sido descritos previamente para este sistema de biosíntesis (Monrás et al., 2012). En este caso, se puede sugerir que las células esféricas con emisión de fluorescencia son derivadas de células bacilares, lo que indica que su generación es dependiente de la división celular o de fragmentación. En este sentido, es posible que la acumulación polar vista en la mayoría de las células corresponda a un “intermediario” de este proceso. Interesantemente, los fenotipos de emisión de fluorescencia se repiten entre la síntesis de nanopartículas de CdS y CdTe, lo que indica que este fenómeno ocurre de forma general para este sistema de biosíntesis.

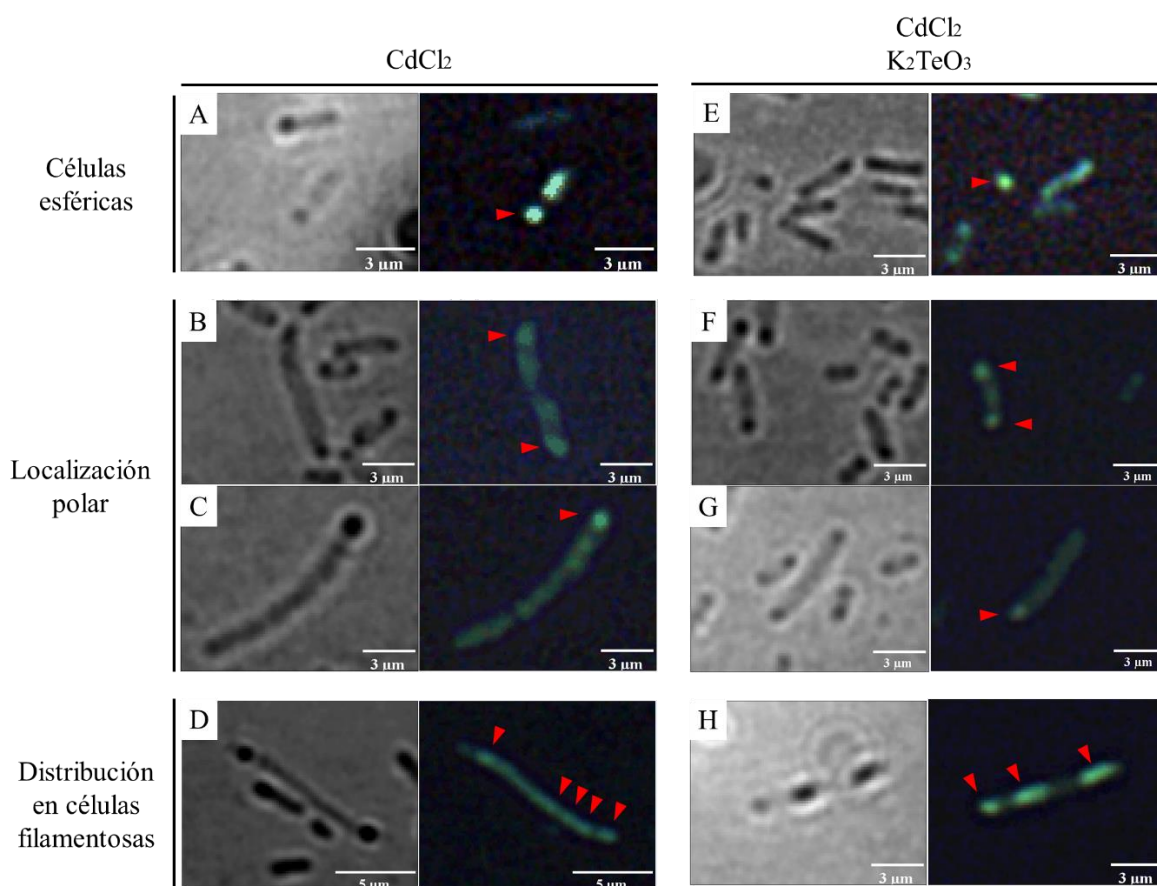


Figura 9: Análisis de patrones de emisión de fluorescencia en la cepa AG1/pCA24NgshA. Regiones de interés representativas de células de la cepa AG1/pCA24NgshA luego de condiciones de biosíntesis. Las flechas rojas indican zonas de acumulación de la emisión de fluorescencia. Las imágenes fueron capturadas con un objetivo 40X (NA: 0,65). Las imágenes de fluorescencia fueron capturadas con un filtro de excitación UV (330-380 nm).

A pesar de que elementos como la filamentación ya han sido descritos como un efecto derivado de la exposición a cadmio en *E. coli* (Hossain et al., 2012), la aparición de minicélulas no es un elemento descrito a la fecha. Para analizar la variación de tamaño celular generado por las condiciones de biosíntesis, evaluamos a nivel de población general la distribución de tamaños de células luego de biosíntesis de QDs. Para esto, se cuantificó la longitud de células luego de la exposición a las condiciones de biosíntesis. La cepa AG1/pCA24N*gshA* luego de la biosíntesis con CdCl₂, presenta un aumento del número de células en el rango de tamaño entre 0,5 y 1 μm de longitud respecto al control sin precursores metálicos (comparar figuras 10A y 10B), rango de tamaño característico de minicélulas (Burt et al., 2020). Específicamente, cuando la reacción se lleva a cabo sin precursores metálicos, la población de este rango de células corresponde a un 1.1%, mientras que en una reacción llevada a cabo en presencia de CdCl₂ incrementa a un 5.2% (Tabla 1). Esto sugiere que la biosíntesis de QDs de CdS en este sistema se relaciona a la formación de minicélulas. Curiosamente, este aumento no se observa cuando la reacción es llevada a cabo en presencia de CdCl₂ y K₂TeO₃ (Figura 10C), a pesar de que si se pueden detectar células esféricas con emisión de fluorescencia en la condición (Figura 9E). Es posible que la adición de K₂TeO₃ a la reacción induzca un daño mayor a la célula, con lo que se esté inhibiendo la formación de minicélulas, las cuáles requieren un proceso de división activa para formarse (Rang et al., 2018). Además, tampoco se observa aumento en la proporción de células entre 0,5 y 1 μm de longitud cuando se utiliza la cepa control AG1/pCA24N (Figura 10E, 10F; Tabla 1). Esto sugiere que la formación de minicélulas es dependiente de la biosíntesis de QDs o de la expresión de la proteína GshA.

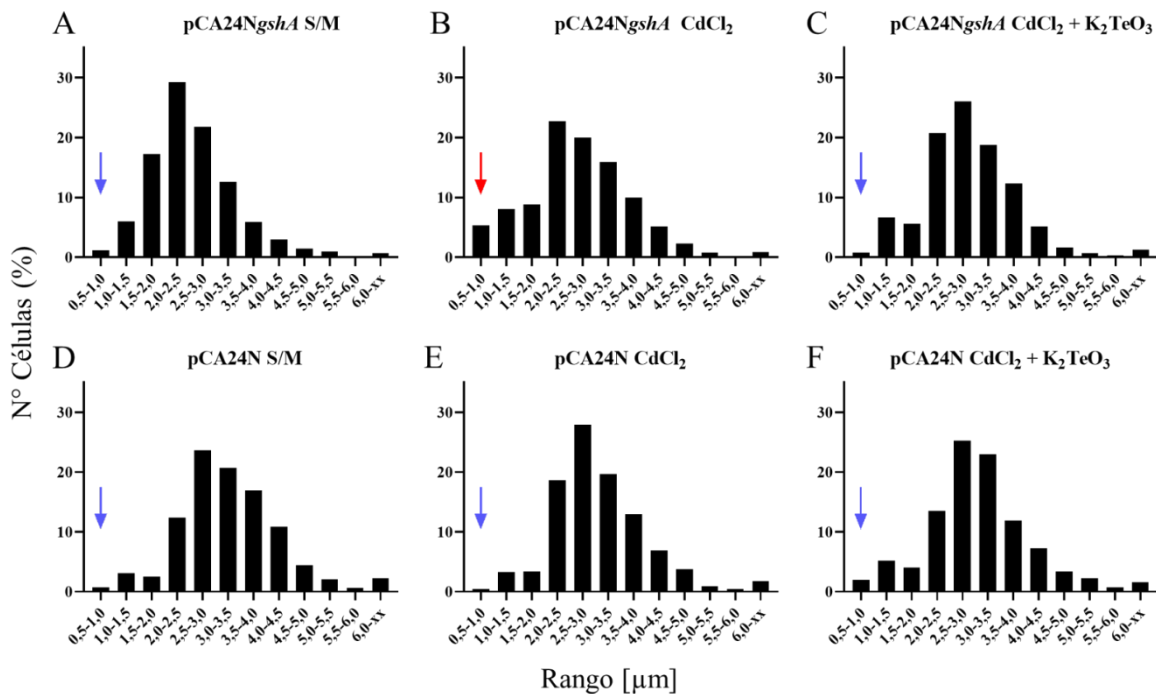


Figura 10: Distribución de tamaño celular bajo condiciones de biosíntesis. Histogramas de tamaño celular de las cepas AG1/pCA24NgshA (A, B y C) y AG1/pCA24N luego de tratamiento con CdCl₂ (B y E), CdCl₂ y K₂TeO₃ (C y F) o sin tratamiento (S/M, A y D). Las flechas indican la población celular de rango 0,5-1,0 μm. Número de células: A = 841; B = 888; C = 941; D = 1062; E = 1021; F = 984.

Tabla 1: Porcentaje de estructuras celulares de tamaño 0,5-1,0 μm

Cepa de <i>E. coli</i> AG1	Sin metal	CdCl ₂	CdCl ₂ + K ₂ TeO ₃
pCA24NgshA	1,1	5,2	0,8
pCA24N	0,7	0,5	1,9

Los resultados se expresan como el porcentaje de la población celular de rango 0,5-1,0 μm (indicada por flechas en la figura 10).

6.4. Estudios morfológicos por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para continuar el análisis de la morfología de las células después de las condiciones de biosíntesis, así como también evaluar la localización de las nanopartículas biosintetizadas, células de las distintas condiciones fueron estudiadas por medio de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las micrografías de la cepa AG1/pCA24NgshA luego de las condiciones de biosíntesis muestran células bacilares con cuerpos electrondensos de entre 0,2 a 0,5 μm de tamaño, que se ubican en los polos de las células o a lo largo de células

filamentosas (Figura 11B, 11C). Este resultado se relaciona con la emisión de fluorescencia vista previamente por microscopía de fluorescencia (Figura 9). Interesantemente, estos cuerpos electrondensos también se observan en células no expuestas a metales, pero en un menor número de células y con menor tamaño (Figura 10A) Considerando su forma, ubicación, y la sobreexpresión de la proteína GshA por la adición de IPTG, es posible que estas estructuras electrondensas correspondan a cuerpos de inclusión, y que, bajo la exposición a precursores metálicos, las nanopartículas sintetizadas se asocien a estos. En contraste, en la cepa control AG1/pCA24N, las células muestran puntos electrondensos con mayor dispersión (Anexo 1), lo que sugiere que los precursores metálicos ingresan a la célula y no se ven organizados en cuerpos de inclusión.

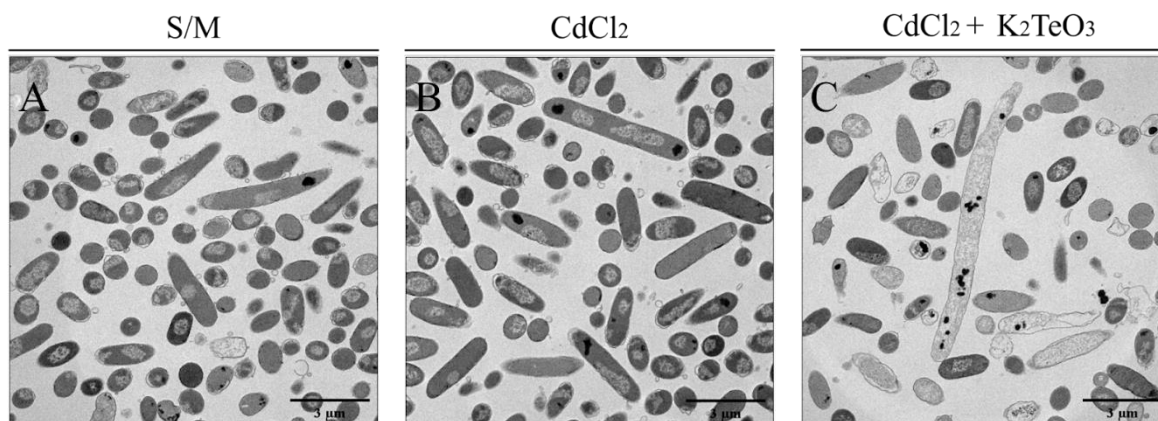


Figura 11: Morfología celular en condiciones de biosíntesis. Micrografías obtenidas por TEM de la cepa AG1/pCA24N*gshA* luego de condiciones de biosíntesis con exposición a CdCl₂ (B), CdCl₂ y K₂TeO₃ (C) o sin tratamiento (A).

Se cuantificó el número de células con estos cuerpos electrondensos de la cepa AG1/pCA24N*gshA*, y también de la cepa AG1/pCA24N. Efectivamente, no solo existe un aumento del porcentaje promedio de células en la cepa AG1/pCA24N*gshA* en comparación al control, sino que además existe un aumento frente a la exposición a los precursores metálicos. Es sabido que la exposición a metales como cadmio y telurio induce el mal plegamiento de proteínas en *E. coli* (Helbig et al., 2008; Sharma et al., 2008), por lo que este resultado sugiere que estos cuerpos electrondensos corresponden a cuerpos de inclusión, los cuales podrían estar asociados a las nanopartículas sintetizadas.

Tabla 2: Recuento de cuerpos electrondensos generados en condiciones de biosíntesis

Exposición	pCA24NgshA Células con cuerpos electrondensos (%)	pCA24N Células con cuerpos electrondensos (%)
Sin metal	16,3 ± 0,9	10,4 ± 2,9
CdCl ₂	25,4 ± 2,1	17,0 ± 3,4
CdCl ₂ + K ₂ TeO ₃	27,8 ± 9,1	20,6 ± 6,3

Para la cuantificación se analizó tres micrografías obtenidas por TEM a una magnificación de 4300X de cada tratamiento. Los resultados se expresan como porcentaje promedio ± SD.

Para corroborar que la expresión de la proteína GshA tiene efecto en la agregación de proteínas y la subsecuente formación de cuerpos de inclusión, se analizó la fracción insoluble de proteínas luego de la inducción con IPTG en la cepa AG1/pCA24NgshA por medio de SDS-PAGE (Dubey et al., 1992). Luego del tratamiento con IPTG en la cepa AG1/pCA24NgshA, se observa la inducción de la proteína GshA, dado el aumento de tamaño de la banda respectiva de ~58 kDa. Una banda de peso similar se observa en la fracción insoluble obtenida luego del tratamiento con IPTG (Figura 12). Esto sugiere que parte de la proteína GshA se está agregando bajo las condiciones de inducción. Este fenómeno no se observa cuando la cepa no es tratada con IPTG o en la cepa control pCA24N. Este resultado, en conjunto a las observaciones por TEM (Figura 11; Tabla 2), sugieren que la sobreexpresión de la proteína GshA induce la formación de cuerpos de inclusión en *E. coli*, los cuáles estarían asociados a los QDs biosintetizados.

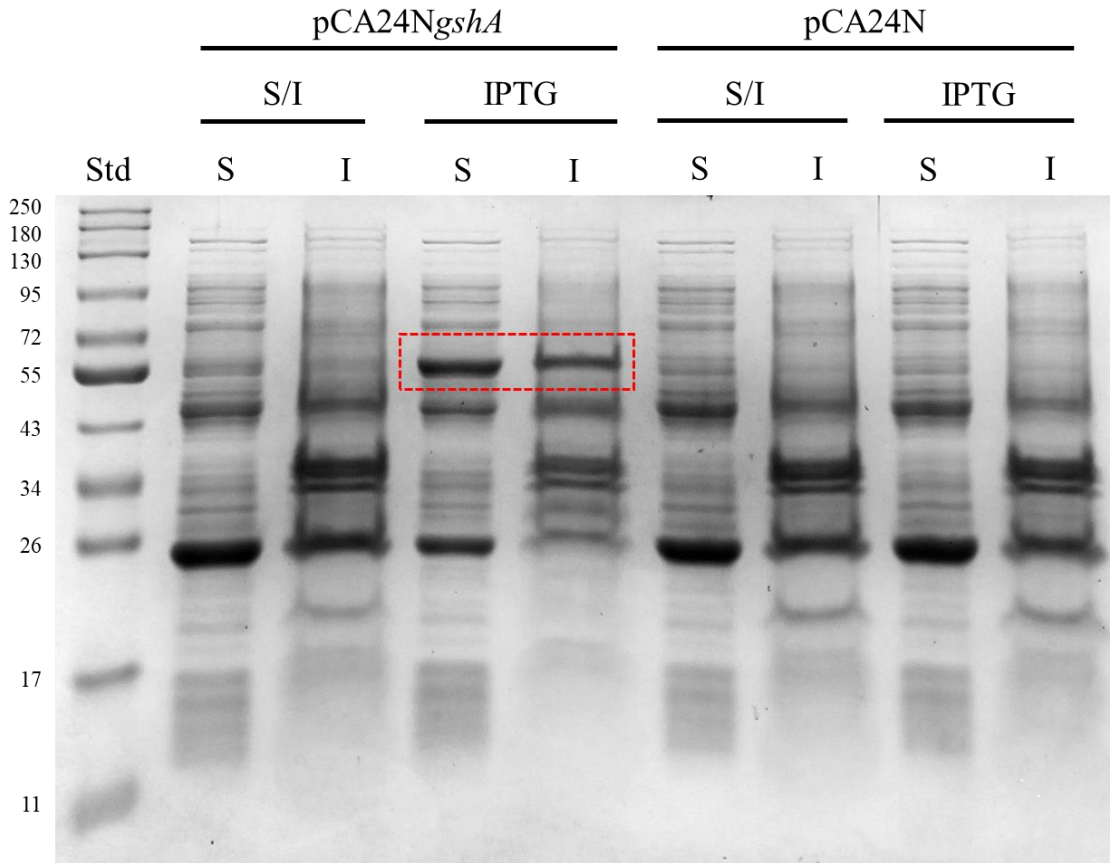


Figura 12: Formación de agregados en la cepa AG1/pCA24NgshA. Análisis por SDS-PAGE de fracciones de proteínas solubles (S) e insolubles (I) de las cepas de *E. coli* AG1/pCA24NgshA y la cepa control pCA24N luego de tratamiento con IPTG (IPTG) o sin inducción (S/I). Los pesos de cada banda se indican en kDa. El recuadro rojo indica las bandas de ~58 kDa correspondientes a la proteína GshA. Std: Estándar de peso molecular “Blue Prestained Protein Standard, Broad Range (11-250 kDa)”, New England BioLabs P7718S.

El análisis de las células en condiciones de biosíntesis reveló acumulación de cuerpos electrondensos en patrones que se relacionan con la división celular, así también con los patrones de emisión de fluorescencia descritos previamente (Figura 9): Se observa la acumulación polar de material electrondenso en uno (Figura 13C) o ambos (Figura 13A) polos de la célula. Esto se relaciona directamente con lo observado por microscopía de fluorescencia, donde la mayor parte de las células muestra acumulación polar de fluorescencia (Figura 9B, 9C, 9F, 9G). A su vez, esto sugiere que las nanopartículas sintetizadas estarían asociadas a los cuerpos electrondensos que podrían corresponder a cúmulos de proteínas mal plegadas. Se detectó también la presencia de células en división que acumulan las nanopartículas sintetizadas en una de las células hijas (Figura 13B). Esto sugiere que una de las razones de la existencia de distintos patrones de emisión de

fluorescencia va de la mano a la segregación de los QDs sintetizados en células hijas. Finalmente, se detectaron células filamentosas con una alta densidad de cuerpos electrodensos (Figura 13D), un patrón que también se puede relacionar a lo observado por microscopía de fluorescencia (Figura 9D, 9H). Es posible que la filamentación se dé como una respuesta de tolerancia al metal, según sugieren reportes previos (Hossain et al., 2012). En conjunto, estos resultados indican que los patrones de acumulación de QDs en este sistema de biosíntesis se asocian a la división de la célula.

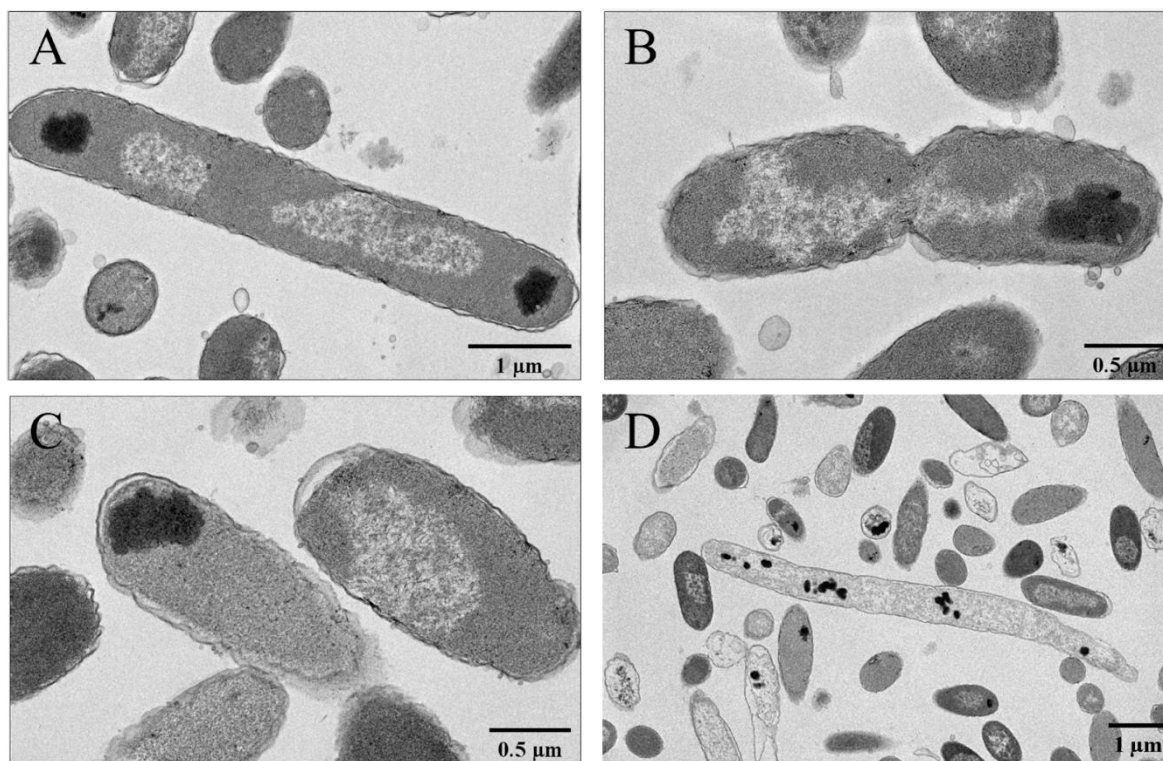


Figura 13: Patrones de acumulación de material electrodensos relacionados a la división celular. Regiones de interés de micrografías obtenidas por TEM, correspondientes a células de la cepa AG1/pCA24NgshA luego de condiciones de biosíntesis con exposición a CdCl₂ (A, B) o CdCl₂ y K₂TeO₃ (C, D).

Además de los patrones relacionados a la división celular, se detectó el fenotipo clásico de formación de minicélulas en las dos condiciones de biosíntesis utilizadas. Este fenotipo corresponde a la formación polar de células esféricas (Figura 14A, 14D). En nuestro caso, las células presentan un diámetro de aproximadamente 0,5 μm, lo que corresponde al tamaño reportado para minicélulas (Burt et al., 2020). Además, se observa la segregación del ADN cromosomal a la célula madre y no en la célula esférica, un elemento importante en la descripción de minicélulas (Adler et al., 1967). Interesantemente, estas estructuras

encapsulan los cuerpos electrondensos generados en condiciones de biosíntesis (Figura 14B, 14E). Al analizar estos cuerpos, se observa la presencia de puntos electrondensos de menor tamaño en su interior. Estos puntos presentan un tamaño predominante entre 5 a 10 nm (Figura 14C, 14F), lo que indica que corresponden a QDs. Esto se relaciona a los resultados anteriores donde se observó la presencia de células esféricas con emisión de fluorescencia (Figura 9A, 9B) y un aumento del porcentaje de células con tamaño correspondiente a minicélulas (Figura 10; Tabla 1). El conjunto de estos resultados sugiere que, frente a la biosíntesis de QDs de CdS y CdTe en el sistema basado en la cepa AG1/pCA24NgshA, se forman minicélulas como un sistema de encapsulación de las nanopartículas sintetizadas. Analizamos puntos electrondensos dentro de los cuerpos de inclusión en la condición sin precursores metálicos, y estos muestran un tamaño superior a 20 nm (Anexo 2), lo que sugiere que podrían corresponder a arreglos de proteínas dentro del cuerpo de inclusión.

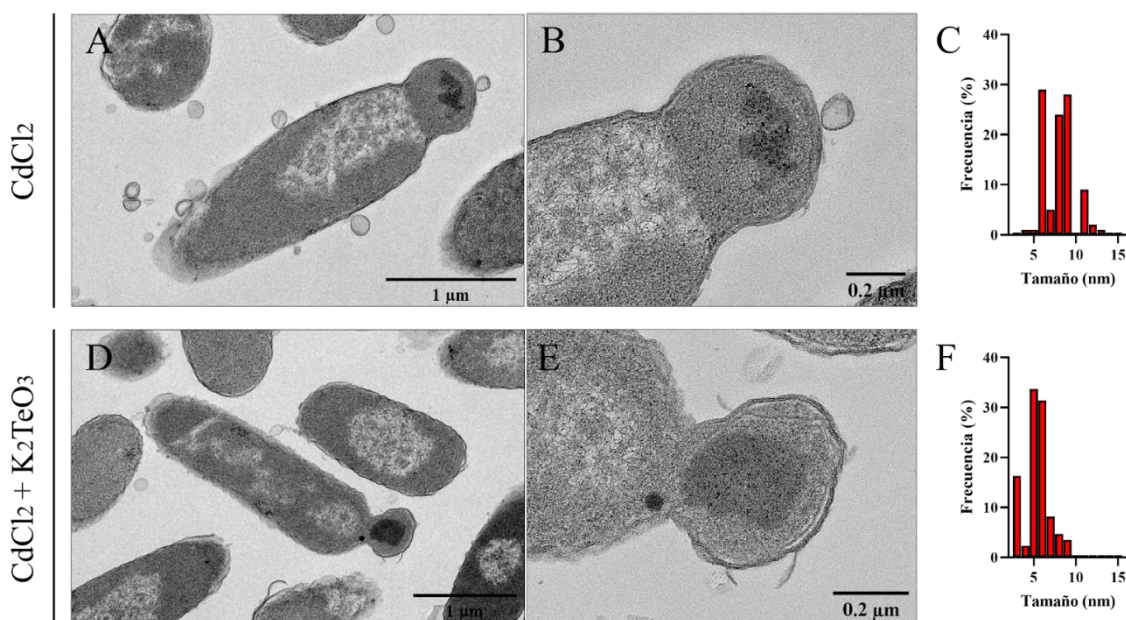


Figura 14: Formación de minicélulas en la cepa AG1/pCA24NgshA. Regiones de interés de micrografías obtenidas por TEM correspondientes a células de la cepa AG1/pCA24NgshA luego de condiciones de biosíntesis con exposición a CdCl₂ (A, B) o CdCl₂/K₂TeO₃ (D, E). (C) Histograma de tamaño de puntos electrondensos presentes en (B). (F) Histograma de tamaño de puntos electrondensos presentes en (E).

6.5. Tolerancia a cadmio en cepas mutantes del sistema Min

Debido a los resultados obtenidos que indican que la exposición a condiciones de biosíntesis genera la formación de minicélulas en *E. coli*, decidimos estudiar cepas de *E. coli* con

mutaciones en el sistema de división Min, las cuales inducen la producción constitutiva de minicélulas. Particularmente, seleccionamos las mutaciones en los genes *minC* y *minCDE*, este último correspondiente al operón completo. Anteriormente, se ha descrito como cepas con delección en *minC* presentan tolerancia a estresores e inhibidores de crecimiento (Adler et al., 1967; Rang et al., 2018). Por su parte, cepas con delección en el operón *minCDE* han sido ampliamente usadas como fuente de minicélulas para estudios morfológicos o de entrega de drogas (Burt et al., 2020; Ni et al., 2021), entre otros. Estas delecciones fueron realizadas en la cepa parental *E. coli* BW25113 por el método de Datsenko y Wanner (Datsenko & Wanner, 2000). Para determinar que las cepas obtenidas presentan el fenotipo de formación de minicélulas, la morfología de las distintas cepas fue observada y comparada por microscopía óptica. La cepa BW25113 muestra una morfología bacilar, característica de *E. coli* (Figura 15A). Las células muestran un tamaño uniforme, con células de aproximadamente 2 μm de longitud. En contraste, tanto la cepa $\Delta\textit{minC}$ como $\Delta\textit{minCDE}$ presentan células altamente filamentosas, sin un tamaño definido. Además, se observan múltiples cuerpos esféricos por campo, correspondientes a minicélulas (Figura 15B, 15C; flechas negras). Estas minicélulas se pueden observar de forma independiente, o asociadas a los polos de células bacilares. Esta morfología indica que las delecciones realizadas a los genes del sistema Min inducen la formación constitutiva de minicélulas.

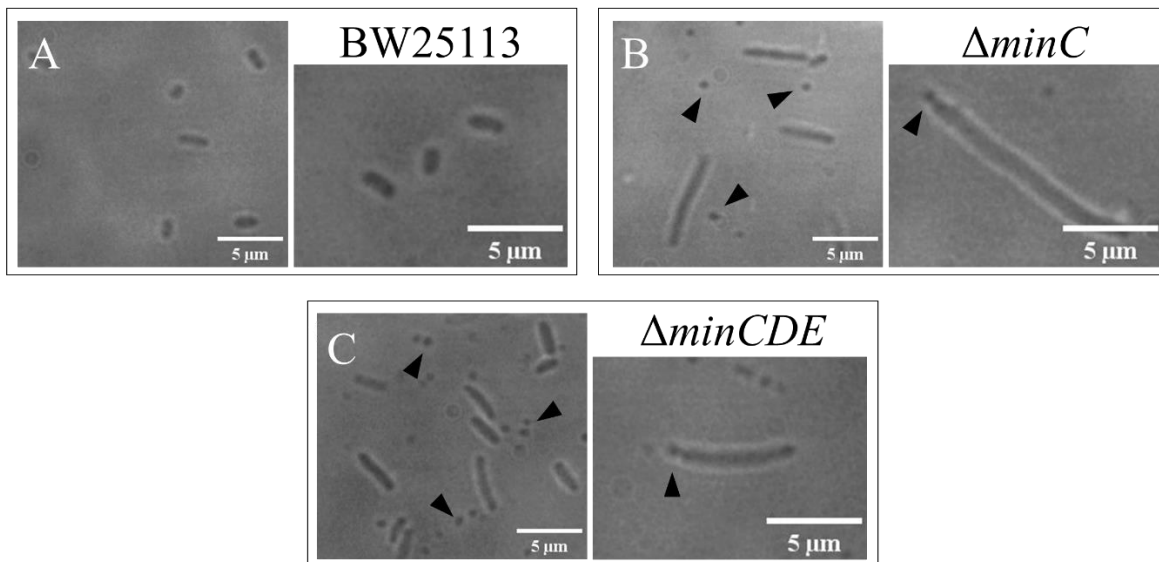


Figura 15: Morfología de cepas mutantes del sistema Min. Imágenes de microscopía óptica de cultivos de las cepas de *E. coli* BW25113 (A), $\Delta\textit{minC}$ (B) y $\Delta\textit{minCDE}$ (C) luego de crecimiento toda la noche. Las flechas negras muestran minicélulas en el campo. Las imágenes fueron capturadas con un objetivo 100X (NA: 1,25).

Como menciono anteriormente, la producción de minicélulas se ha relacionado con tolerancia al estrés celular e inhibidores de crecimiento. No obstante, a la fecha no se ha reportado este fenómeno frente a metales pesados. Considerando que el compuesto CdCl_2 es usado para la biosíntesis de QDs de CdS, quisimos evaluar la tolerancia de las cepas mutantes a esta sal. Para ello, se realizó un ensayo de difusión en placa en medio LB agar, cuantificando el área de inhibición de crecimiento luego de incubación a 37°C . Ambas cepas mutantes presentan áreas de inhibición significativamente mayores que la cepa BW25113 (Figura 16). Esto es indicativo de una menor tolerancia al metal. Para confirmar que este resultado fuese consecuencia de la tolerancia de las cepas al metal y no por el crecimiento más lento entregado por las mutaciones al sistema Min (Rang et al., 2018), se cuantificó la concentración mínima inhibitoria (MIC) de las tres cepas en medio LB, con crecimiento a 37°C . Concordante con los resultados obtenidos por el ensayo de difusión en placa, se determinó que ambas cepas mutantes presentan valores menores de MIC en comparación a la cepa BW25113, con la cepa ΔminCDE presentando un valor levemente menor a ΔminC (Tabla 3). Este resultado es interesante, considerando los reportes anteriores. Particularmente, el trabajo de Rang et al. (2018), reportó una mayor tolerancia de la cepa ΔminC a concentraciones subletales de estreptomycin, por medio de la eliminación de cuerpos de inclusión en minicélulas. A pesar de que la exposición a cadmio también genera agregados de proteínas en *E. coli*, sus efectos deletéreos en la célula son más amplios, mediados principalmente por su unión a tioles celulares (Helbig et al., 2008), lo que se asocia también a problemas de división y filamentación celular (Hossain et al., 2012), mal plegamiento de proteínas (Sharma et al., 2008) y una disminución general de la expresión de proteínas junto a la generación de superóxido (Thomas et al., 2018) por lo que no es sorprendente que las cepas mutantes del sistema Min sean más sensibles a la sal de cadmio.

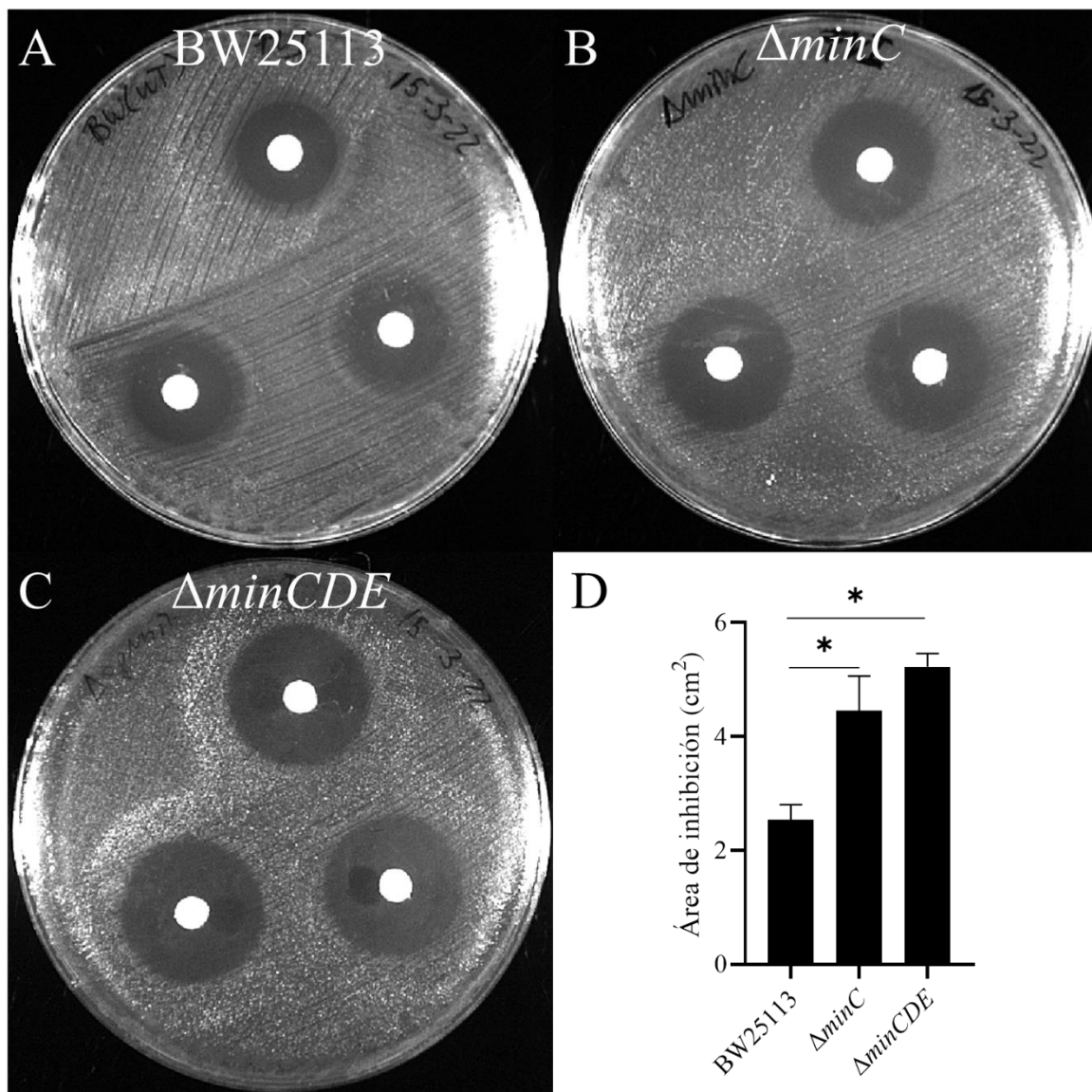


Figura 16: Ensayo de difusión en placa de $CdCl_2$. Áreas de inhibición de crecimiento de las cepas de *E. coli* BW25113 (A), $\Delta minC$ (B) y $\Delta minCDE$ (C) en presencia de $CdCl_2$. Se sembraron céspedes de cada cepa en medio LB-agar. Luego, se colocaron discos de papel filtro cargados con 550 μg de $CdCl_2$ y se incubaron a 37° C toda la noche. (D) Cuantificación del área de inhibición. * $p < 0,05$.

Tabla 3: Concentración mínima inhibitoria de $CdCl_2$

Cepa de <i>E. coli</i>	MIC de $CdCl_2$ ($\mu g/ml$)
BW25113	260
$\Delta minC$	220
$\Delta minCDE$	200

6.6. Biosíntesis intracelular de QDs de CdS en cepas mutantes del sistema Min

Se evaluó si las cepas mutantes son capaces de realizar biosíntesis de QDs de CdS. Para esto, se utilizó un protocolo de biosíntesis intracelular previamente descrito (Venegas et al., 2017), usando medio M9-glucosa e incubando a 37° C durante 14 horas. Esta reacción se realizó con dos concentraciones reportadas para la síntesis de QDs: 10 µg/ml de CdCl₂ (Monrás et al., 2012; Gallardo et al., 2014) y 60 µg/ml (Venegas et al., 2017). Después de la incubación, pellets bacterianos de las cepas *ΔminC*, *ΔminCDE* y la cepa control BW25113 fueron expuestos a luz UV para evaluar la síntesis de QDs. Con la exposición a 60 µg/ml, las tres cepas presentaron emisión de fluorescencia, lo que indica que todas sintetizan QDs bajo estas condiciones (Figura 17). Curiosamente, cuando la reacción fue llevada a cabo con 10 µg/ml de CdCl₂, solo las cepas mutantes mostraron una leve emisión de fluorescencia.

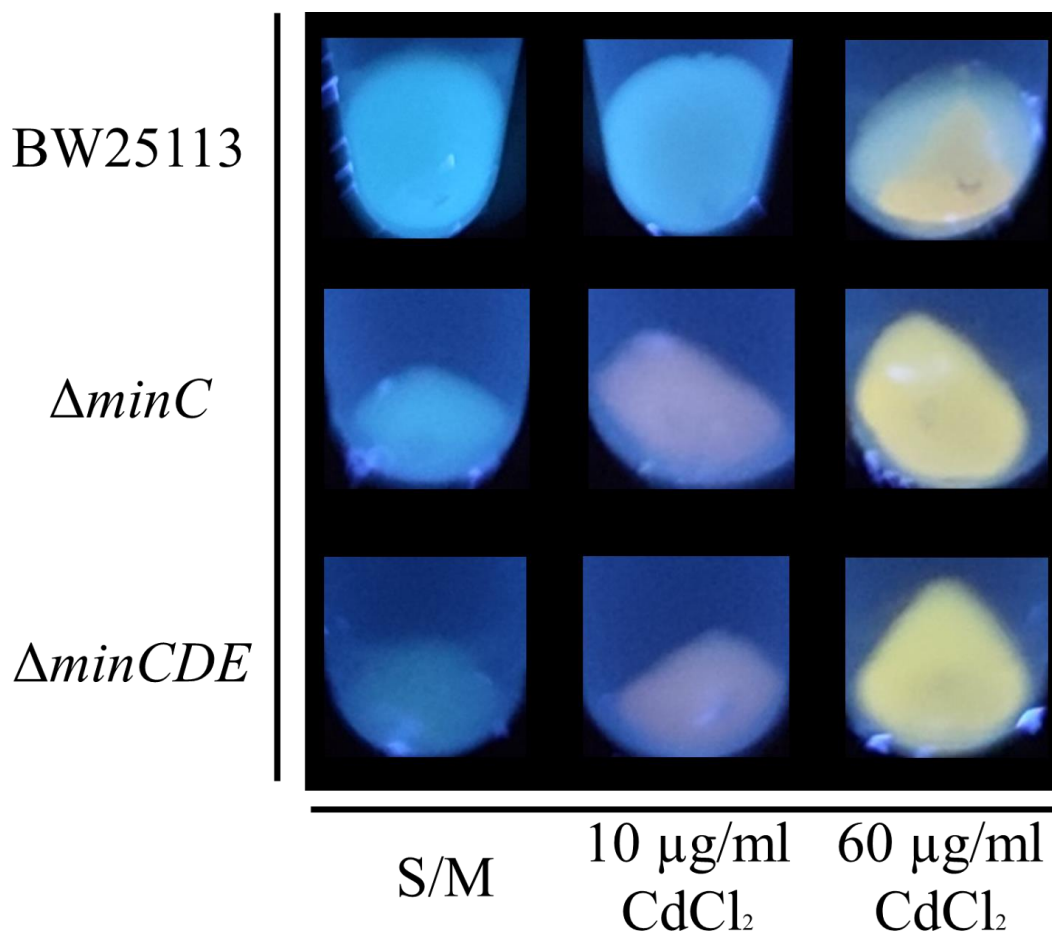


Figura 17: Biosíntesis intracelular en cepas mutantes del sistema Min. Emisión de fluorescencia de pellets de las cepas de *E. coli* BW25113 y las cepas mutantes *ΔminC* y *ΔminCDE*, expuestas a condiciones de biosíntesis de QDs y luego a luz UV (365 nm) para evaluar fluorescencia. S/M: sin metal.

6.7. Análisis morfológico de cepas mutantes del sistema Min en condiciones de biosíntesis

Para comprobar el estado morfológico y el comportamiento de emisión de fluorescencia de las tres cepas bajo condiciones de biosíntesis, se analizaron células en condiciones de biosíntesis mediante microscopía de fluorescencia. La emisión de fluorescencia de la cepa BW25113 desde células individuales es limitada (Figura 18A), y se concentra en conglomerados de células (Figura 18B). En contraste, en las cepas mutantes se observa la emisión de fluorescencia desde células bacilares individuales (Figura 18C, 18D). Además, en las cepas mutantes se observa la emisión de fluorescencia desde minicélulas (Figura 19). Esto indica que parte de los QDs biosintetizados en las células son cargados en las minicélulas producidas por la cepa. Más aun, considerando la intensidad de la emisión de fluorescencia, se puede especular una alta cantidad de QDs presente en el volumen relativamente pequeño de las minicélulas.

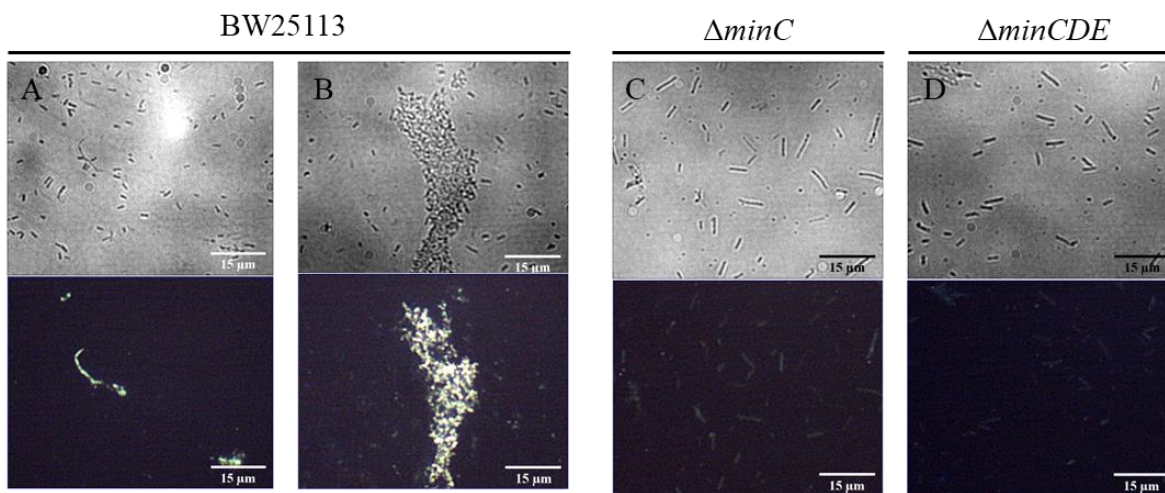


Figura 18: Emisión de fluorescencia intracelular en mutantes del sistema Min. Imágenes representativas de microscopía óptica (fila superior) y de fluorescencia (fila inferior) de las cepas BW25113 (A, B), $\Delta minC$ (C) y $\Delta minCDE$ (D) luego de la exposición a condiciones de biosíntesis durante 14 horas. Las imágenes de fluorescencia fueron obtenidas con un filtro de excitación de 330-380 nm. Las imágenes fueron capturadas con un objetivo 40X (NA: 0,65).

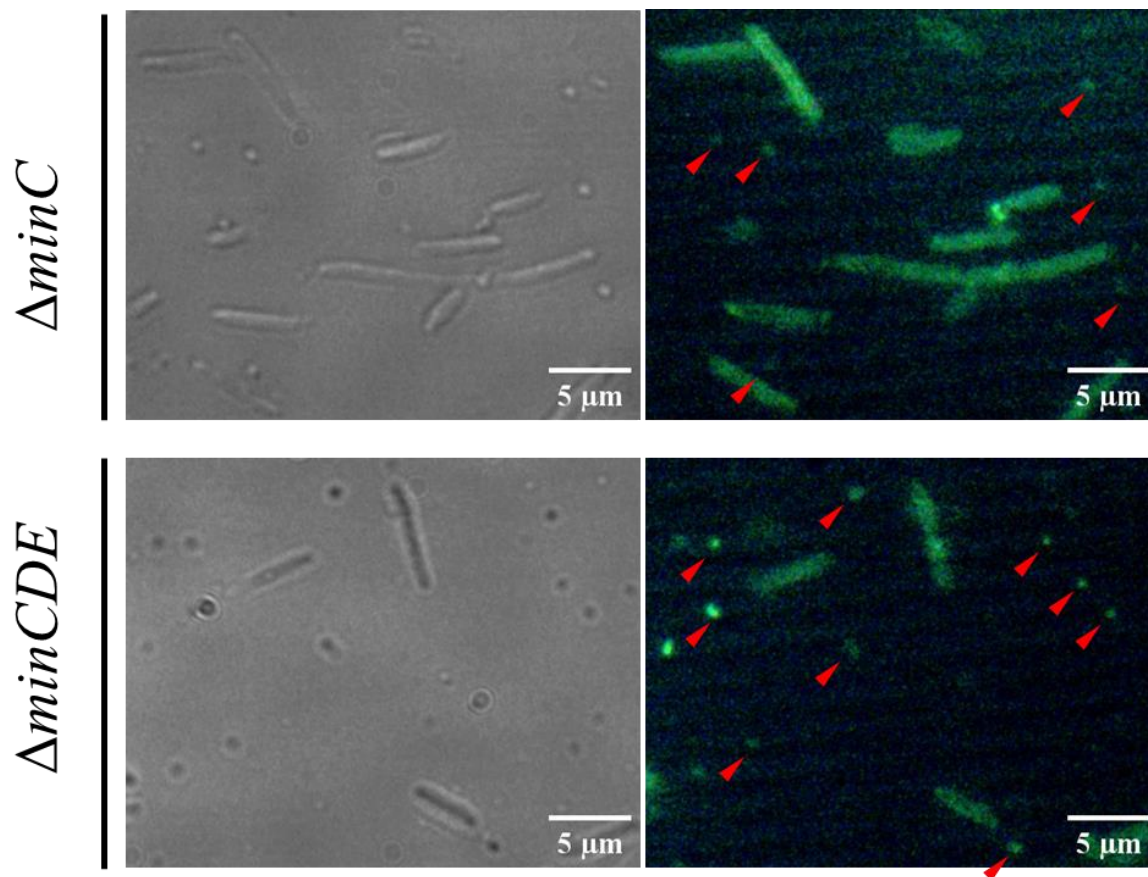


Figura 19: Emisión de fluorescencia desde minicélulas. Imágenes representativas de microscopía óptica (columna izquierda) y de fluorescencia (columna derecha) de las cepas $\Delta minC$ y $\Delta minCDE$ luego de la exposición a condiciones de biosíntesis durante 14 horas. Las imágenes de fluorescencia fueron obtenidas con un filtro de excitación de 330-380 nm. Las flechas rojas indican minicélulas con emisión de fluorescencia. Las imágenes fueron capturadas con un objetivo 100X (NA: 1,25).

6.8. Cinética de biosíntesis en cepas mutantes del sistema Min

Los resultados previos sugieren que el mecanismo de biosíntesis ocurre de manera distinta en las cepas $\Delta minC$ y $\Delta minCDE$, en comparación a la cepa BW25113. Para determinar cómo estos cambios afectan a las nanopartículas sintetizadas en el tiempo, se realizó una cinética de biosíntesis analizando los cambios en la emisión de fluorescencia en un rango de tiempo de 2 a 24 horas (Figura 20A). En la cepa BW25113, se observa el inicio de la biosíntesis a las 6 horas de reacción, iniciando con emisión de fluorescencia de color verde, cambiando a amarillo y anaranjado a las 8 y 10 horas, respectivamente. Luego, cambia a color rojo a las 14 horas y finalmente un apagamiento de la fluorescencia a partir de las 16 horas. Estos cambios en la coloración de la emisión de fluorescencia son indicativos del crecimiento de las nanopartículas biosintetizadas y del rompimiento del efecto de confinamiento cuántico alrededor de las 16 horas (Yang et al., 2015; Marusak et al., 2016; Ríos-Silva et al., 2022).

En las cepas mutantes se observa un inicio de la biosíntesis más tardío, iniciando a las 8 horas. A pesar de que también se observa el cambio de coloración indicativo del crecimiento de las nanopartículas, con el paso de verde a amarillo y luego a anaranjado, la coloración se mantiene a partir de las 14 horas, con QDs que mantienen su emisión de fluorescencia y coloración incluso hasta las 24 horas de incubación. Además de la coloración, se evaluó cómo cambia la intensidad de fluorescencia en las 3 cepas (Figura 20B), lo que fue evaluado como la intensidad de píxeles de los pellets, normalizado por el peso húmedo de células. Este análisis indica que la cepa BW25113 alcanza un pico de intensidad a las 6 horas, para luego disminuir hasta las 24 horas de reacción. En contraste, en las cepas mutantes se alcanza el pico de intensidad entre 8 y 10 horas de incubación, para luego estabilizarse hasta las 24 horas. Estos resultados sugieren que en las cepas mutantes las nanopartículas sintetizadas presentan un menor tamaño en comparación a las nanopartículas sintetizadas en la cepa BW25113. Además, se puede proponer que las nanopartículas se “estabilizan” al ser sintetizadas en estas cepas, y no rompen el efecto de confinamiento cuántico incluso luego de 24 horas de incubación. Para comprobar que los QDs biosintetizados en las cepas mutantes presentan propiedades ópticas indicativas de un menor tamaño, se purificaron las nanopartículas a partir de pellets obtenidos tras 10 horas de incubación y se analizaron sus espectros de absorción y emisión de fluorescencia. A pesar de que todos los espectros de absorbancia muestran un pico característico por sobre los 400 nm (Figura 21A), lo que indica que son QDs de características similares, los picos de emisión de fluorescencia indican una diferencia en tamaño con la cepa BW25113 mostrando un pico por sobre los 650 nm (Figura 21B), mientras que las cepas mutantes muestran un pico entre los 550 y 650 nm, sugiriendo una diferencia en el tamaño de las nanopartículas.

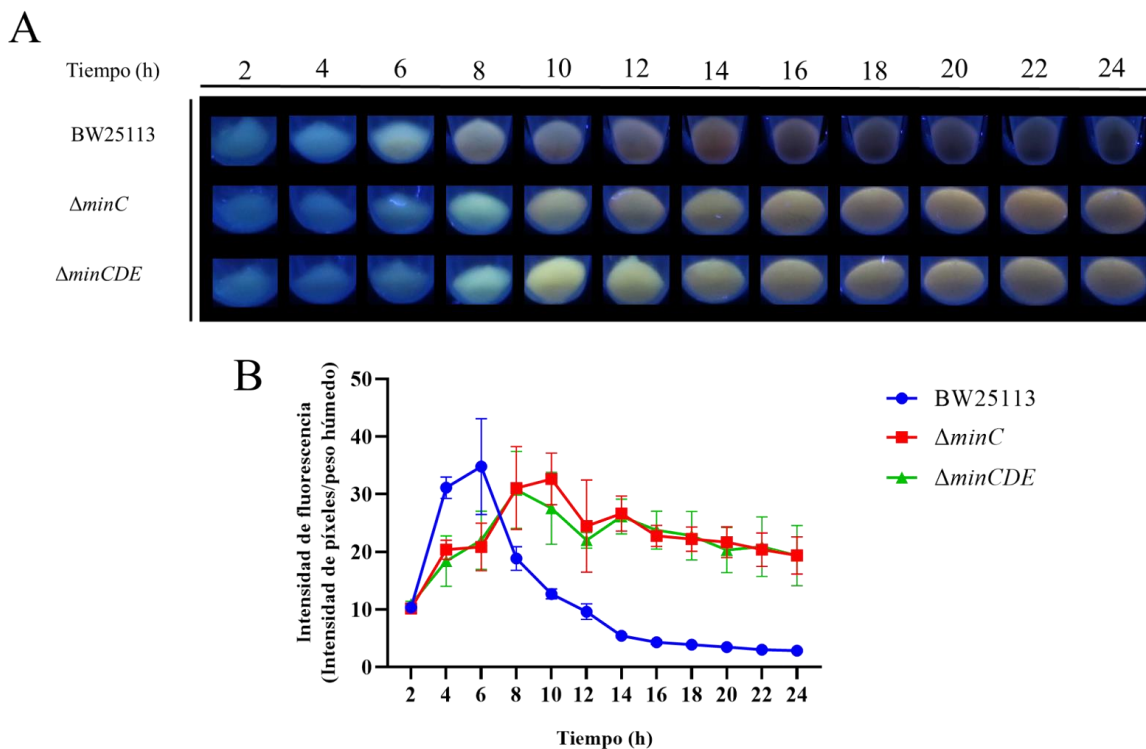


Figura 20: Cinética de biosíntesis de QDs de CdS en cepas de *E. coli*. (A) Emisión de fluorescencia de pellets de las cepas BW25113, $\Delta minC$ y $\Delta minCDE$ luego de exposición a condiciones de biosíntesis durante las horas indicadas. Los pellets fueron irradiados con luz UV (365 nm) para la detección de la emisión de fluorescencia. (B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia relativa de pellets, expresada como la intensidad de píxeles, normalizado por el peso húmedo (mg) del pellet.

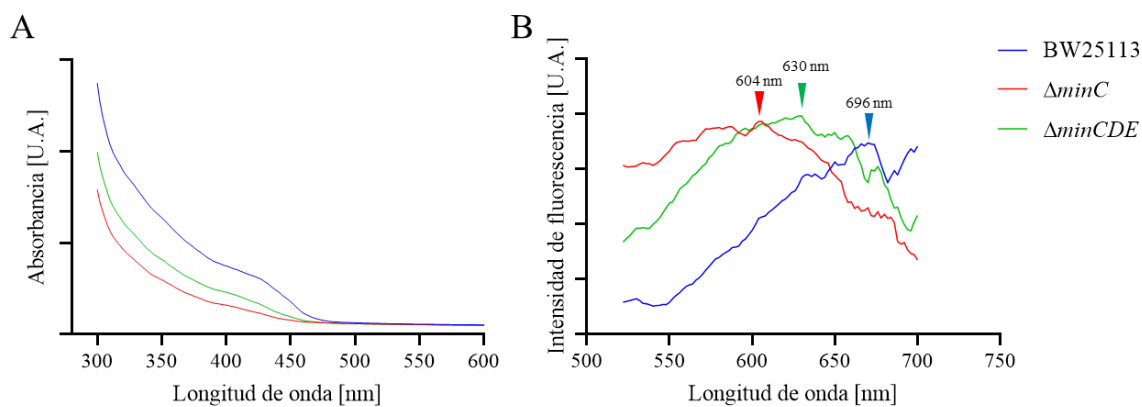


Figura 21: Propiedades ópticas de QDs biosintetizados por cepas mutantes del sistema Min. Espectros de absorción (A) y emisión (B) de fluorescencia de QDs purificados de CdS, biosintetizados por las cepas de *E. coli* BW25113, $\Delta minC$ y $\Delta minCDE$ tras 10 horas de incubación. Se indica en el gráfico los picos de cada espectro respectivo. Los espectros de absorción se registraron entre 300 y 700 nm, y los de emisión de fluorescencia entre 390 y 700 nm, excitando a 360 nm.

6.9. Análisis de localización de nanopartículas por TEM

Como una forma de extender nuestro entendimiento del mecanismo de biosíntesis de QDs de CdS en las cepas mutantes del sistema Min, se realizó un análisis por TEM de células de las cepas BW25113, $\Delta minC$ y $\Delta minCDE$ luego de la exposición a condiciones de biosíntesis durante 10 horas. Las micrografías de TEM revelaron que la cepa BW25113 presenta material electrondenso, correspondiente a las nanoestructuras biosintetizadas, asociado a la membrana interna y al espacio periplásmico, así como ubicado por fuera de la membrana externa (Figura 22A). Se observan corpúsculos electrondensos compuestos de cúmulos de cristales individuales (Anexo 3). Estos corpúsculos se organizan ampliamente por fuera de la membrana externa, generando una matriz que encapsula los QDs sintetizados. Esta forma de organización explicaría el comportamiento de emisión de fluorescencia observado previamente, donde la emisión de fluorescencia se concentra en cúmulos de células o zonas de interacción entre células (Figura 18A, 18B). En contraste, las cepas mutantes muestran una distribución más dispersa de puntos electrondensos, de menor tamaño a los presentados en la cepa BW25113 (Figura 22B, 22C), que podría relacionarse con la diferencia de emisión de fluorescencia (Figura 20). Estos puntos, correspondientes a los QDs, se ubican a lo largo de la célula, predominantemente asociado a la membrana interna, y no forman una matriz por fuera de la membrana externa, lo que explicaría la emisión de fluorescencia directamente desde células individuales (Figura 18C, 18D). Finalmente, se observa la presencia de material nanoparticulado electrondenso en minicélulas (Figura 22D). Se observa que este material se acumula por la zona que corresponde al polo de la célula bacilar previo a la generación de la minicélula, lo que sugiere que las nanopartículas que son cargadas dentro de minicélulas provienen del polo de la célula.

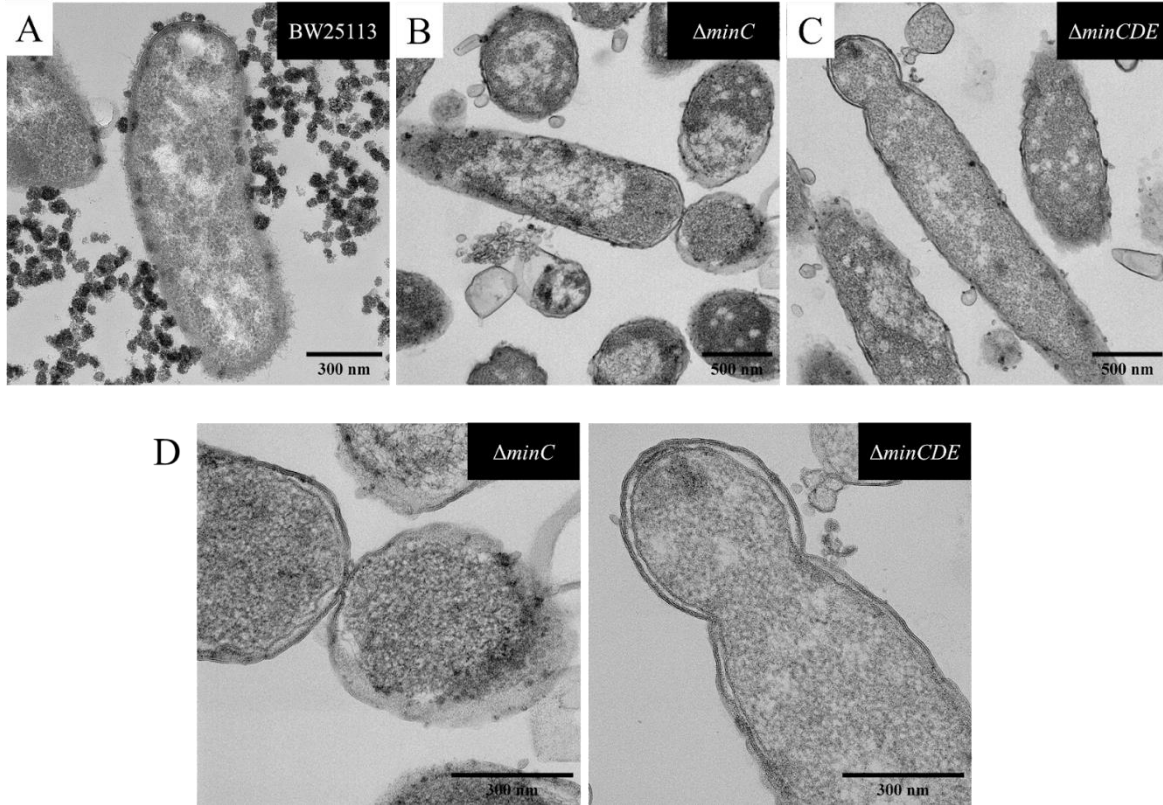


Figura 22: Localización de QDs de CdS en cepas mutantes del sistema Min. Micrografías obtenidas por TEM de las cepas de *E. coli* BW25113 (A), $\Delta minC$ (B) y $\Delta minCDE$ (C) luego de condiciones de biosíntesis durante 10 horas. (D) Zoom digital de (B) y (C), mostrando minicélulas en formación por las cepas $\Delta minC$ y $\Delta minCDE$.

6.10. Estudios comparativos de minicélulas y células bacilares

Los resultados obtenidos indican que las minicélulas generadas en las cepas mutantes son cargadas con QDs al realizar biosíntesis. Como tal, se caracterizó la capacidad de acumulación de QDs de las minicélulas. Se prepararon fracciones enriquecidas en minicélulas y células bacilares de las mutantes $\Delta minC$ y $\Delta minCDE$ luego de 10 horas de biosíntesis, utilizando un método combinado de centrifugación diferencial y tratamiento con ampicilina (Lai et al., 2004; Jivrajani et al., 2013). Las distintas fracciones fueron centrifugadas y se analizó su emisión de fluorescencia por exposición a luz UV (365 nm). Se observa la emisión de fluorescencia desde ambas fracciones (Figura 23), lo que indica que los QDs mantienen su emisión incluso posterior al proceso de separación.

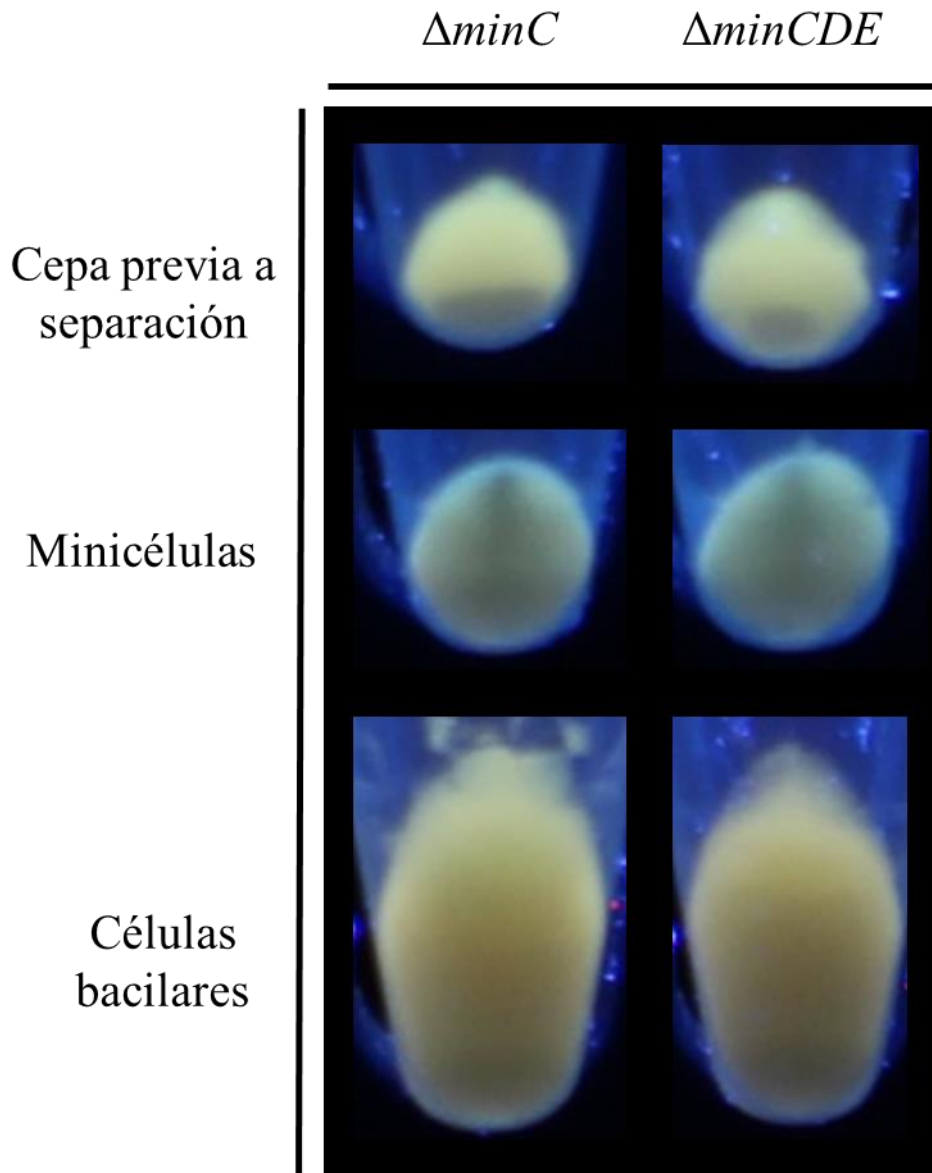


Figura 23: Enriquecimiento de minicélulas y células bacilares. Emisión de fluorescencia de pellets de las cepas $\Delta minC$ y $\Delta minCDE$ luego de biosíntesis intracelular de QDs y enriquecimiento diferencial de minicélulas y células bacilares. Los pellets fueron expuestos a luz UV (365 nm) para la detección de fluorescencia.

Luego, ambas fracciones se analizaron por microscopía de fluorescencia. Se observa en el campo claro que las fracciones de minicélulas y de células bacilares de ambas cepas se encuentran altamente enriquecidas en el tipo celular respectivo (Figura 24, fila superior). Un elemento importante se puede notar cuando las fracciones se observan luego de excitación con luz UV (330-380 nm). A pesar de que se observa emisión de fluorescencia tanto de minicélulas como de células bacilares, existe una alta emisión desde minicélulas, considerando su volumen reducido (Figura 24, fila inferior). Esta observación puede

relacionarse a las micrograffías obtenidas por TEM, que evidencian una distribución de nanopartículas a lo largo de células bacilares, con una presencia más densa de nanopartículas en minicélulas, provenientes del polo de la célula.

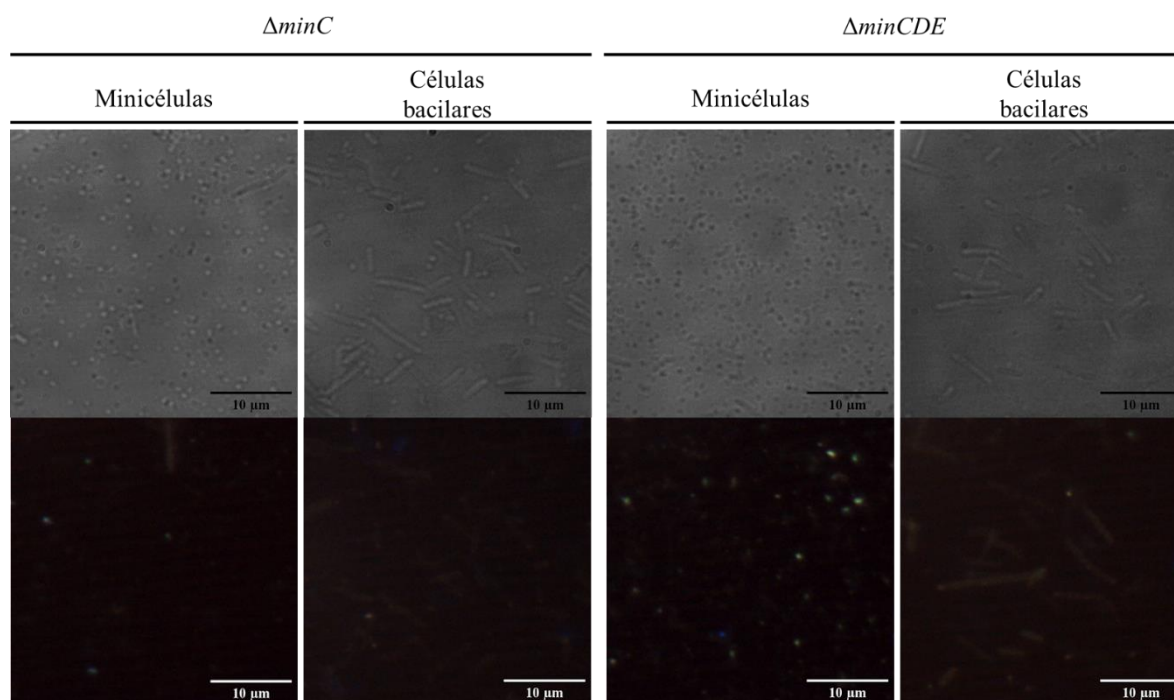


Figura 24: Análisis de pureza luego de enriquecimiento diferencial. Imágenes representativas de microscopía óptica (fila superior) y de fluorescencia (fila inferior) de fracciones enriquecidas en minicélulas y células bacilares de las cepas $\Delta minC$ y $\Delta minCDE$. Las imágenes de fluorescencia fueron obtenidas con un filtro de excitación de 330-380 nm. Las imágenes fueron capturadas con un objetivo 100X (NA: 1,25).

Para evidenciar la diferencia de la cantidad de QDs fluorescentes relacionado al tamaño de minicélulas y células bacilares, se cuantificó la intensidad relativa de emisión de fluorescencia de células y minicélulas y se normalizó por el área de la célula respectiva, por medio del software Fiji-ImageJ. En ambas cepas $\Delta minC$ y $\Delta minCDE$, existe una mayor emisión de fluorescencia relativa en minicélulas en comparación a las células bacilares (Figura 25). Esto sugiere que las minicélulas generadas acumulan QDs bajo condiciones de biosíntesis, con lo que probablemente contribuya a mantener el *fitness* de las células bacilares. La presencia de cadmio en minicélulas fue verificada por FAAS, donde se estimó que las minicélulas acumulan más cadmio por volumen que las células bacilares (Anexo 4).

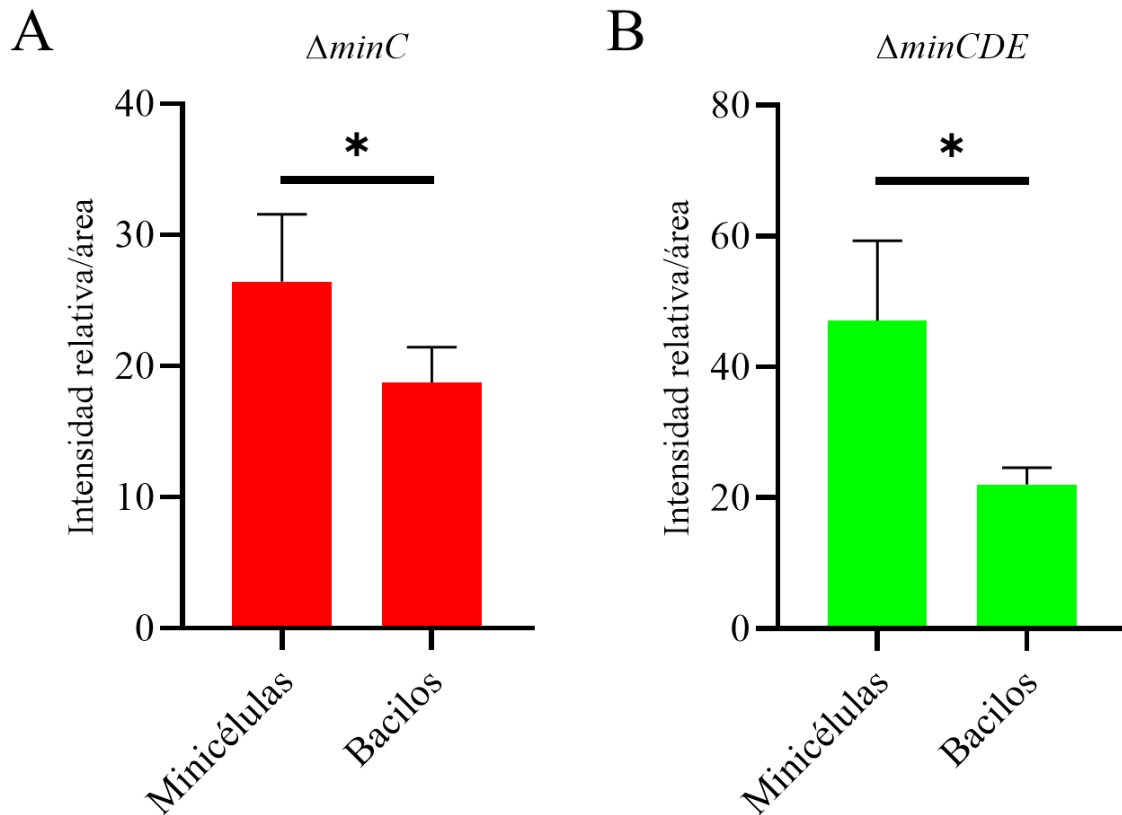


Figura 25: Comparación de emisión de fluorescencia de micicélulas y células bacilares. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia relativa de micicélulas y bacilos de las cepas $\Delta minC$ (A) y $\Delta minCDE$ (B). * $p < 0,05$.

El resumen, el conjunto de resultados obtenidos sugieren que la biosíntesis de QDs de cadmio se relaciona con la producción de micicélulas en *E. coli*. Las nanopartículas sintetizadas se acumulan en los polos de la célula y son encapsuladas en micicélulas para su eliminación de la célula bacilar. Esto también se observa en cepas productoras constitutivas de micicélulas, donde los QDs se acumulan en las micicélulas generadas y podrían ayudar a eliminar el metal de la célula.

7. Discusión

En el presente trabajo, se relacionó por primera vez la biosíntesis de QDs en *E. coli* con la producción de minicélulas. En el modelo de biosíntesis de la cepa AG1/pCA24NgshA, se evidenció la presencia de células esféricas con emisión de fluorescencia junto a un aumento de la población celular de tamaño de 0,5-1,0 μm . Se confirmó el fenotipo de formación de minicélulas por medio de TEM, evidenciando la formación de protuberancias polares que no contienen ADN y que contienen material nanoparticulado electrondenso. Por su parte, al realizar biosíntesis en cepas mutantes del sistema Min, se observa la acumulación de nanopartículas fluorescentes en las minicélulas generadas, a pesar de presentar una menor tolerancia a cadmio como cepa.

7.1. Cambios morfológicos de la cepa AG1/pCA24NgshA en condiciones de biosíntesis

Para entender cuáles serían las moléculas involucradas en la síntesis de QDs, previamente, nuestro grupo desarrolló un sistema de biosíntesis intracelular basado en la cepa de *E. coli* AG1/pCA24NgshA (Monrás et al., 2012). Este sistema permite la biosíntesis de QDs de CdS y CdTe por medio de una mayor concentración intracelular de GSH. Morfológicamente, la emisión de fluorescencia se observaba concentrada en estructuras polares, presentes por dentro de la célula o asociadas directamente a los polos. Este antecedente dio indicios de que en este sistema la biosíntesis de QDs se encontraba mediada por fragmentación de la célula o la formación de minicélulas.

A la fecha, no se ha descrito directamente la formación de minicélulas en bacterias relacionando la exposición a metales o la biosíntesis de nanopartículas metálicas. No obstante, se han descrito ejemplos de regulación génica relacionada a la división celular y a proteínas del sistema Min. En *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, por ejemplo, se ha descrito la regulación transcripcional del gen *minC* por medio de la proteína Fur, donde se reduce su expresión en presencia de hierro (Haraszthy et al., 2006). En la misma línea, en *Neisseria gonorrhoeae*, la expresión del gen *minD* es regulada por la proteína OxyR, y células deficientes de OxyR sufren divisiones en zonas distintas al punto medio de la célula (Parti et al., 2013). Finalmente, en *E. coli* se ha reportado la disminución de la expresión de la proteína FtsZ frente a la exposición prolongada a concentraciones subletales de cadmio, lo que lleva a la formación de células filamentosas (Hossain et al., 2012). Estos antecedentes

dieron paso a la idea de que las condiciones de reacción requeridas para la biosíntesis de QDs de CdS y CdTe en la cepa AG1/pCA24NgshA podrían promover un fenotipo *minicell-like* por medio de elementos como filamentación y división aberrante, estrés por proteínas mal plegadas o estrés oxidativo.

Se realizó biosíntesis en la cepa AG1/pCA24NgshA por medio de la exposición a CdCl₂ o CdCl₂/K₂TeO₃ (Figura 6). Las nanopartículas sintetizadas fueron purificadas y se analizaron sus propiedades de absorción y emisión de fluorescencia. Los espectros obtenidos indican propiedades características de los QDs basados en cadmio (Monrás et al., 2012; Venegas et al., 2017; Moradi Alband et al., 2019), con picos de absorbancia bajo los 400 nm (Figura 7A) y espectros de emisión amplios con picos entre 500 y 550 nm (Figura 7B). Al analizar morfológicamente las células de este sistema por microscopía de fluorescencia pudimos determinar la presencia de células esféricas con emisión de fluorescencia (Figura 9A, 9E), lo que sugiere que una respuesta a la biosíntesis de QDs en este sistema corresponde a la formación de minicélulas. Además, observamos la presencia de células bacilares con emisión de fluorescencia polar (Figura 9B, 9C, 9F, 9G) y la distribución aleatoria en células filamentosas (Figura 9D, 9H). Al analizar la distribución de tamaños de células luego de las condiciones de biosíntesis, con la exposición a CdCl₂, detectamos un aumento de ~4% en la cantidad de células de un rango de 0,5 a 1,0 μm (Figura 10; Tabla 1), correspondiente con el tamaño aproximado reportado para minicélulas (Adler et al., 1967; Burt et al., 2020). No obstante, este aumento no ocurre frente a la exposición a CdCl₂ y K₂TeO₃ (Figura 10C). El análisis por TEM indicó la presencia de cuerpos electrondensos que posiblemente correspondan a cuerpos de inclusión generados por la sobreexpresión de la proteína GshA, y cuya localización se asocia a los focos de emisión de fluorescencia desde las células (Figura 11). Los análisis de conteo de células con cuerpos electrondensos (Tabla 2) y SDS-PAGE (Figura 12) sugieren que la expresión de la proteína GshA tiene un efecto en las proteínas agregadas en el sistema. También por medio de TEM, se detectaron patrones relacionados a la división celular (Figura 13). Esto incluye células en división que acumulan las nanopartículas en una de las células hijas (Figura 13B) y células filamentosas que no son capaces de dividirse y que acumulan una alta cantidad de material electrondenso (Figura 13D). Finalmente, se pudo detectar un fenotipo de producción de minicélulas, que consiste

en la formación de células esféricas desde el polo de una célula bacilar, que no contiene ADN, y que cargan material electrodensito que podría corresponder a los QDs sintetizados (Figura 14).

Estos patrones pueden relacionarse a reportes que asocian la exposición de *E. coli* a cadmio y a fenotipos asociados a cambios en las proteínas del sistema Min. Se ha descrito previamente la acumulación polar de cuerpos de inclusión y proteínas mal plegadas en *E. coli* (Rang et al., 2018; Shi et al., 2020). Este descubrimiento ha permitido proponer un modelo donde distintos elementos de daño en la célula son movilizados a la zona polar de la célula para su eliminación en divisiones posteriores (Figura 4C). Esto podría estar ocurriendo frente a la biosíntesis de QDs, donde las nanopartículas son movilizadas a los polos de la célula (Figura 9B, 9C, 9F, 9G, 13A). Si esta proposición fuese correcta, se abre la pregunta de cómo se logra esta movilización. Se ha descrito ampliamente la presencia de una recubierta de compuestos orgánicos y proteínas en QDs sintetizadas por bacterias, las cuales tendrían un rol en su formación y estabilización (Ishii et al., 2003, Bao et al., 2010, Monras et al., 2012, Bruna et al., 2022). De la misma forma, se ha reportado la localización polar de distintas proteínas en *E. coli* (Li & Young, 2012), lo cual podría ocurrir por medio de la interacción directa o indirecta con las proteínas del sistema Min (Lee et al., 2016) o por sus oscilaciones (Yang et al., 2017). Estos antecedentes podrían dar luces de que la localización polar de los QDs sintetizados por la cepa AG1/pCA24NgshA ocurra por la movilización de las proteínas y moléculas orgánicas unidas a estas. Esto se ve apoyado por los cuerpos electrodensos visualizados por TEM, que sugieren que las nanopartículas sintetizadas se encuentran asociadas a cuerpos de inclusión generados por la sobreexpresión de la proteína GshA. Considerando que proteínas chaperonas como IbpA (Rang et al., 2018) y GroEL (Li & Young, 2012) son capaces de moverse a los polos, se podría proponer su papel en este fenómeno, dada también su posible rol en la formación de nanopartículas (Ishii et al., 2003).

Con respecto a la formación de células filamentosas; se ha reportado que la exposición prolongada a concentraciones subletales de CdCl₂ en *E. coli* induce la disminución de la expresión de la proteína FtsZ, filamentando a las células (Hossain et al., 2012). Esta proteína

es parte del complejo de proteínas del divisoma encargada de generar la estructura conocida como “Z-ring” al centro de la célula para localizar su división (Dai & Lutkenhaus, 1992).

Con respecto a nuestra observación de la formación de minicélulas, las razones de que este fenómeno ocurra en este sistema son aún inciertas. Se puede especular que en las células que generan minicélulas hay cambios en la expresión de los componentes del sistema Min. No obstante, es posible que la formación de minicélulas también pueda ser mediada por otros componentes del divisoma de *E. coli*. Por ejemplo, resultados de nuestro laboratorio indican la disminución de la expresión de la proteína ZapB en condiciones de biosíntesis de QDs de CdS (Resultados no publicados). Se ha reportado que la ausencia de esta proteína, junto a una disminución de la expresión de FtsZ induce el fenotipo de producción de minicélulas (Galli & Gerdes 2012), lo que podría ser otra explicación a este fenómeno. Al analizar la distribución de tamaños de las células de la cepa AG1/pCA24NgshA luego de las condiciones de biosíntesis con CdCl₂, se observa un aumento de ~4% en la cantidad de células de un rango de 0,5 a 1,0 μm (Figura 10B). Esto no ocurre al realizar el ensayo en la cepa control AG1/pCA24N (Figura 10E), lo que sugiere que este fenómeno depende de la biosíntesis de QDs de CdS y/o de la expresión de la proteína GshA. Curiosamente, este fenómeno tampoco ocurre luego de la biosíntesis con CdCl₂ y K₂TeO₃ (Figura 10C), lo que es interesante si consideramos que el fenotipo de producción de minicélulas si fue detectado en estas condiciones por medio de microscopía de fluorescencia (Figura 9) y TEM (Figura 14). A pesar de que algunos efectos de toxicidad del oxianión telurito son similares a los efectos de toxicidad reportados para cadmio, como la unión a tioles celulares, desarme de centros hierro-azufre y un efecto a nivel del correcto plegamiento de proteínas (Helbig et al., 2008), existe un efecto pronunciado del telurito por la formación de superóxido mediado por la reducción del ión TeO₃⁻² a Te⁰ (Pérez et al., 2007) lo que lleva a daño en la membrana por peroxidación de lípidos y oxidación de proteínas (Chasteen et al., 2009). En contraste, los efectos de producción de ROS y daño a la membrana por exposición a cadmio se han reportado por medio de la exposición prolongada (Hossain et al., 2012), mientras que su efecto principal se asocia a daño y mal plegamiento en proteínas (Helbig et al., 2008; Sharma et al., 2008). Esto permite hipotetizar de que la razón de que no exista un aumento en la proporción de células de rango 0,5 a 1,0 μm, es por los efectos tóxicos relacionados a la exposición a telurito. Esto

se puede avalar por las micrografías obtenidas por TEM, donde se observan células altamente estresadas, con mayor daño a nivel de la membrana plasmática (Figura 11C).

Después del análisis, se abre la pregunta de cómo ocurren los cambios morfológicos observados en nuestro sistema de biosíntesis. A juzgar por la baja proporción de células que generan minicélulas bajo las condiciones de síntesis de QDs, se puede inferir que esto no es un mecanismo promovido fisiológicamente. Más aun considerando la aparente necesidad de la sobreexpresión de GshA para ser detectado. En el trabajo de Hoffman y Frank (1963), la exposición de varios cultivos de *E. coli* a un aumento de temperatura (43.5° C) sólo entregó una minicélula a partir de “varios miles” de células. Por su parte, en el reporte de Parti y colaboradores (2013), se indujo un fenotipo *minicell-like* en *N. gonorrhoeae* por la mutación del gen codificante para OxyR y la subsecuente disminución de expresión de MinD, lo que generó un aumento al 4% de células con división fuera del eje central, en comparación a un 1% en la condición control. Estos resultados son concordantes con lo observado en nuestro trabajo, donde solo se observa un aumento de ~4% en la cantidad de células que corresponden a minicélulas. Por la parte de las células filamentosas, se sabe que los puntos de división en estas células son finamente definidos por el sistema MinCDE, y que en su ausencia la célula se divide de forma completamente estocástica (Wehrens et al., 2018).

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten proponer un modelo de los cambios morfológicos que ocurren en la cepa AG1/pCA24NgshA después de las condiciones de biosíntesis. Inicialmente, se induce la expresión de la proteína GshA en la cepa AG1/pCA24NgshA, lo que en conjunto a la adición de precursores metálicos como CdCl₂ y K₂TeO₃ llevaría a la formación de QDs, los que probablemente se encuentren asociados a cuerpos de inclusión (Figura 26A). Los QDs asociados a proteínas se movilizarían a los polos de la célula de acuerdo con el modelo propuesto por Shi y colaboradores (2020). Esta correspondería a una forma “intermediaria”, donde la célula podría pasar por tres caminos dependiendo de la respuesta de cada célula (Figura 26B). Primero (1), si la célula mantiene su capacidad de división, ocurriría un sesgo de las nanopartículas a las células hijas. A su vez, las células hijas también entrarían en división, generando hijas libres de QDs, con lo cual se pueda mantener el *fitness* del linaje. Como segunda posibilidad (2), la célula no sería

capaz de dividirse. Esto podría deberse a cambios en la expresión de proteínas relacionadas con la división celular que se han asociado a filamentación, como FtsZ (Hossain et al., 2012), proteínas accesorias como ZapB (Galli & Gerdes, 2012) o las mismas proteínas del sistema Min (Wehrens et al., 2018). Esto a su vez, se asociaría a la acumulación adicional de cúmulos de nanopartículas. Finalmente (3), una porción de células sería capaz de entrar en una división polar para la formación de minicélulas y la respectiva eliminación de QDs. Esto podría ser mediado a cambios de expresión similares a los propuestos para la filamentación.

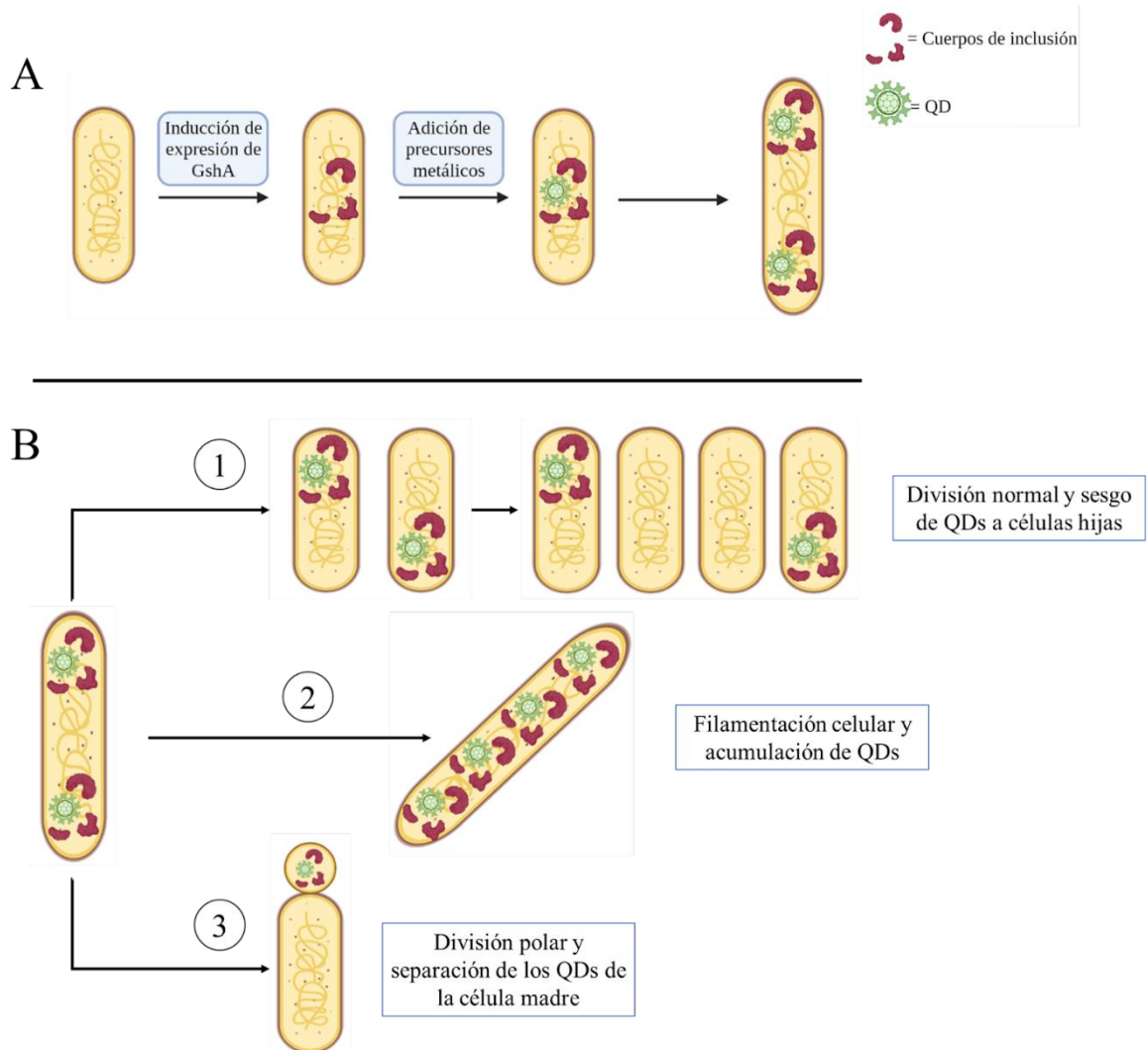


Figura 26: Modelo morfológico de la biosíntesis de QDs de cadmio en *E. coli* AG1/pCA24NgshA. (A) Esquema representativo de la biosíntesis intracelular de QDs mediada por la expresión de la proteína GshA. (B) Caminos posibles de morfología tomada por la célula luego de la biosíntesis de QDs.

Con todo, estos resultados dan cuenta de los procesos que ocurrirían en el sistema de biosíntesis de la cepa de *E. coli* AG1/pCA24NgshA, que incluye cambios a nivel de la

división celular, acumulación polar de QDs, filamentación y la formación de minicélulas. Esto da cuenta de lo dinámico que es el proceso, lo que se traduce en diferentes cambios morfológicos. Más aun, esto representa un nuevo eje de estudio en la relación de la división celular, la biosíntesis de QDs y la respuesta de la célula frente a metales pesados.

Aún queda en duda cuál sería el tipo de respuesta requerida para cada uno de estos tres casos. Además, si es que para filamentación y la formación de minicélulas se requieren cambios similares de expresión en genes relacionados a la división, queda la pregunta de cómo se separan ambos fenómenos. Un estudio en detalle podría permitir dilucidar la participación de intermediarios en el proceso, así como los cambios de expresión de proteínas involucradas en el desarrollo de la biosíntesis.

7.2. Biosíntesis de QDs en cepas productoras constitutivas de minicélulas

El modelo actual propuesto por Shi y colaboradores (2020) con respecto a envejecimiento celular en *E. coli* fue estudiado también en la cepa $\Delta minC$ (Rang et al., 2018). En este trabajo, se evaluó un número de elementos que sugieren que la producción de minicélulas podría ser un mecanismo de eliminación de elementos de daño celular, usando como modelo los cuerpos de inclusión generados por la exposición a estreptomycin. Tomando en cuenta este antecedente, quisimos comprobar qué ocurre en cepas de *E. coli* productoras constitutivas de minicélulas frente a la biosíntesis de QDs. Para esto, se utilizó un protocolo de biosíntesis en fase exponencial. Este protocolo permite la biosíntesis de QDs durante el crecimiento de la bacteria. El uso del medio mínimo M9-glucosa facilita la entrada de cadmio a la célula por medio de la formación de complejo $CdHPO_4$, previamente descrito por Venegas y colaboradores (2017). Se evaluó la síntesis usando dos concentraciones de $CdCl_2$, reportadas previamente para la biosíntesis de QDs de CdS: 10 $\mu g/ml$ (Monrás et al., 2012; Plaza et al., 2016) y 60 $\mu g/ml$ (Venegas et al., 2017). Se utilizaron las cepas $\Delta minC$ y $\Delta minCDE$, derivadas de la cepa WT BW25113 de *E. coli*. Como ya se mencionó, se ha relacionado un fenotipo de tolerancia a estrés celular a la delección del gen *minC* (Adler et al., 1967; Rang et al., 2018). Por su parte, cepas con delección en el operón completo *minCDE* han sido utilizadas principalmente para la obtención de minicélulas para fines biotecnológicos (Farley et al., 2016). A diferencia de los estudios con respecto a la delección del gen *minC*, los efectos

fisiológicos con respecto a estrés celular de la delección en el operón *minCDE* no han sido descritos a la fecha. No obstante, sí se ha podido estudiar la localización preferencial de proteínas (Li & Young, 2012) y el control de la ubicación del anillo Z (Weherens et al., 2018) usando mutantes de este operón. Se sabe que la presencia de las oscilaciones generadas por las proteínas MinD y MinE son suficientes para reorganizar las concentraciones locales de algunas proteínas en *E. coli*, como FtsZ por ejemplo (Yang et al., 2017). Además, se sabe que varias proteínas de la célula pueden interaccionar con distintos componentes del sistema Min, lo que promovería su ubicación diferencial en la célula (Lee et al., 2016). Esto sugiere que, de haber diferencias entre las mutantes $\Delta minC$ y $\Delta minCDE$, estas podrían deberse a la presencia o ausencia de las oscilaciones del sistema Min, respectivamente.

Nuestros resultados indican que tanto $\Delta minC$ como $\Delta minCDE$ son más sensibles a $CdCl_2$ en comparación a la cepa BW25113. Este análisis se realizó inicialmente por medio de un ensayo de difusión en placa (Figura 16), el cuál ha sido reconocido por su alta sensibilidad para determinar diferencias en la tolerancia de bacterias a distintos compuestos (Santiviago et al., 2002). Es importante notar que ambas mutantes crecen más lento en comparación a la cepa BW25113 (Rang et al., 2018). Al mismo tiempo, el tamaño de las colonias en placa es menor, mostrando una morfología irregular, en comparación a la forma circular de la cepa BW25113 (no mostrado). Este fenotipo se ha descrito como “enfermo” (Galli & Gerdes, 2012) y da cuenta de los problemas de división de estas cepas. Para corroborar que el resultado obtenido en el ensayo de difusión en placa no se debió al crecimiento más lento de las cepas mutantes, se cuantificó la MIC de todas las cepas a $CdCl_2$ en medio líquido (Tabla 3). Nuevamente, tanto $\Delta minC$ como $\Delta minCDE$ resultaron ser más sensibles, con valores de MIC correspondientes a 220 y 200 $\mu g/ml$ de $CdCl_2$, respectivamente, en comparación a los 260 $\mu g/ml$ de la cepa BW25113. Este resultado sugiere que el fenotipo de producción de minicélulas en estas cepas no permite mejorar el *fitness* de las células, en contraste a lo que ocurría en presencia de estreptomycin (Rang et al., 2018). Uno de los efectos tóxicos más importantes del cadmio sobre *E. coli* corresponde a un estrés de proteínas mal plegadas, que viene dada por su unión a cadenas laterales de proteínas, unión a grupos tiol, desplazamiento de centros hierro-azufre, y que conlleva un aumento de expresión de genes relacionados al plegamiento de proteínas o su degradación (Sharma et al., 2008; Helbig et al., 2008). Por lo

anterior, se esperaba que las cepas mutantes del sistema Min presentaran mayor tolerancia a CdCl_2 , considerando que la cepa ΔminC puede tolerar estreptomicina por medio de la eliminación de cuerpos de inclusión (Rang et al., 2018). De todas formas, es necesario considerar que el efecto tóxico del cadmio sobre la célula no se limita solamente al malplegamiento de proteínas. La afinidad del cadmio por el azufre puede llevar a un agotamiento del poder reductor de la célula por la unión a GSH (Helbig et al., 2008). Esto se ha relacionado con la generación de estrés oxidativo y la expresión de genes relacionados a este tipo de estrés como glutarredoxina o tiorredoxina reductasa, por mencionar algunas, lo que a su vez llevaría a otros efectos sobre la célula, a nivel de actividad enzimática o de membrana, por ejemplo (Helbig et al., 2008; Thomas & Benov, 2018). Luego, la mayor sensibilidad en cepas que presentan problemas en su división canónica no es sorprendente.

A pesar de los resultados de la tolerancia, quisimos determinar cómo se diferencia la biosíntesis en fase exponencial en estas cepas mutantes en comparación a la cepa BW25113. Todas las cepas son capaces de sintetizar QDs de CdS bajo la exposición a $60 \mu\text{g/ml}$ de CdCl_2 , visualizado por la emisión de fluorescencia (Figura 17). Al exponer las cepas a $10 \mu\text{g/ml}$, solo las cepas mutantes muestran una leve emisión de fluorescencia. Inicialmente se hipotetizó que estas cepas presentaban una mejor capacidad para la síntesis de QDs. No obstante, al observar las células por microscopía de fluorescencia, no se pudieron detectar células fluorescentes (no mostrado). Esto sugiere que utilizando $10 \mu\text{g/ml}$ de CdCl_2 , la biosíntesis de QDs ocurre a una tasa muy baja, y no permite la detección de la emisión de fluorescencia desde células individuales. Dado que las cepas mutantes también son capaces de biosintetizar QDs, un estudio de sensibilidad en condiciones de biosíntesis podría dar más respuestas en conjunto a los resultados de este trabajo, en medio LB (Figura 16; Tabla 3).

Al analizar las células expuestas a $60 \mu\text{g/ml}$ de CdCl_2 , se observa una diferencia en el comportamiento de la emisión de fluorescencia entre la cepa BW25113 y las cepas mutantes. La cepa BW25113 muestra una emisión de fluorescencia localizada en cúmulos de células, con pocas células individuales con emisión detectables (Figura 18A, 18B). Por su parte, en las cepas mutantes se observa emisión de fluorescencia a nivel de las células individuales (Figura 18C, 18D). Además, se observa emisión de fluorescencia desde las minicélulas

generadas (Figura 19). Esto sugiere que el proceso de biosíntesis ocurre con mecanismos distintos entre la cepa WT y las mutantes. Así también, en las cepas mutantes se promovería la eliminación de QDs en las minicélulas generadas, lo que podría llevar también a una diferencia en la cinética de biosíntesis. Estos resultados fueron respaldados por TEM. En la cepa BW25113, se observó la formación de cristales electrondensos asociados a la membrana interna, periplasma y en matrices complejas por fuera de las células (Figura 22A). En contraste, en las cepas mutantes, se observa una distribución de QDs de menor tamaño a lo largo de la célula (Figura 22B, 22C), y la presencia de material electrondenso en las minicélulas en generación (Figura 22D).

Reportes recientes sugieren que la biosíntesis de QDs de CdS en bacterias mesófilas como *Staphylococcus epidermidis* (Wu et al., 2015) o bacterias marinas como *Pseudoalteromonas* (Ma & Sun, 2021), inducen la generación de biopelículas como un mecanismo de respuesta al metal, y que permitiría mantener a las nanopartículas fuera de la célula. Lo que observamos en nuestro caso, es que en la cepa BW25113, se forma una especie de matriz compleja, donde las nanopartículas se acumulan en zonas de interacción entre células. El material electrondenso visualizado por TEM se observa en la membrana interna, el periplasma y finalmente en el espacio extracelular (Figura 22A). Esta ubicación sugiere que la matriz compleja estaría compuesta por exopolisacáridos (EPS), cuya síntesis en la célula inicia desde el citoplasma, para luego ser exportados al periplasma y finalmente al espacio extracelular (Whitfield et al., 2015). Los QDs sintetizados de esta forma presentan una emisión detectable por microscopía sólo cuando son parte de esta matriz, lo que podría deberse a una mayor cantidad de QDs acumulados, permitiendo su detección. Por su parte, en las cepas mutantes se observa la distribución de QDs en la célula bacilar y en minicélulas. Es probable que, dado que la célula elimina los QDs en minicélulas, éstas funcionen como mecanismo de salvataje/detoxificación, por lo que la célula no requeriría la generación de matrices de EPS para la inmovilización de QDs ya que estos están siendo eliminados directamente de la célula por otro medio. Esto también se relaciona con los modelos propuestos de envejecimiento celular (Rang et al., 2018; Shi et al., 2020), los que indican que la célula BW25113 acumula metal por la formación de QDs y disminuye su *fitness*, por lo que debe responder al cadmio por otro mecanismo. En el caso de las mutantes, el cadmio

presente en las células bacilares disminuye porque está siendo eliminado, lo que mejoraría su *fitness* y su respuesta al metal. Esto se podría apoyar cuantificando la concentración de metal intracelular durante la biosíntesis y analizando la sensibilidad al metal de estas cepas durante condiciones de biosíntesis.

La eliminación de QDs en minicélulas producidas por las cepas mutantes podría tener un efecto en las propiedades ópticas de las nanopartículas sintetizadas. Esto fue evidenciado por la cinética de biosíntesis (Figura 20A). Se observa en la cepa BW25113 que la biosíntesis ocurre rápidamente, iniciando a las 6 horas de incubación. La emisión de fluorescencia cambia de coloración a anaranjado a las 8-10 horas, para finalmente pasar a rojo a las 14 horas y apagarse desde las 16 horas en adelante. Este fenómeno es un comportamiento ya descrito de la biosíntesis de QDs de CdS, y representa el crecimiento del cristal con el tiempo de incubación, por lo que el color de la emisión de fluorescencia va evolucionando en el rango visible de acuerdo al tamaño de la nanopartícula, para finalmente apagarse por romper el efecto de confinamiento cuántico (Yang et al., 2015; Marusak et al., 2016; Ríos-Silva et al., 2022). Por otro lado, ambas cepas mutantes mostraron un comportamiento similar, con una biosíntesis que ocurre de forma más lenta (iniciando a las 8 horas de incubación) y con un cambio de coloración más claro, pasando de verde a amarillo a las 10 horas y de amarillo a anaranjado a las 14 horas. Curiosamente, luego del paso al color anaranjado, los QDs no mostraron el mismo apagamiento observado en la cepa BW25113, incluso luego de 24 horas de incubación. Además, los pellets mantuvieron la intensidad de emisión de fluorescencia hasta finalizar el ensayo (Figura 20B). Esto sugiere que los QDs sintetizados por las cepas mutantes crecen más lento en comparación a la cepa control BW25113. Esto se puede evidenciar por los espectros de absorción y emisión de nanopartículas biosintetizadas a un mismo punto temporal, donde, a pesar de que presentan un pico similar en el espectro de absorción (Figura 21A), lo que sugiere que son QDs con propiedades similares, los espectros de emisión de las cepas mutantes se encuentran bajo los 650 nm, mientras que la cepa BW25113 muestra un pico sobre los 650 nm (Figura 21B). Estos resultados nos permiten proponer que la biosíntesis intracelular de QDs de CdS en las cepas mutantes entrega un mejor control de las propiedades ópticas de las nanopartículas sintetizadas por la bacteria. Una explicación de esto viene dada por la carga de QDs en minicélulas. Es posible que los

QDs sean eliminados constantemente de la célula dentro de las minicélulas. Por ende, los cristales generados tardan más tiempo de incubación para crecer. No obstante, esto no explica por qué los pellets mantienen su emisión de fluorescencia con la incubación continuada. Dado que existe un enriquecimiento preferencial de algunas proteínas en polos en comparación a otras partes de la célula (Li & Young, 2012), es posible que en las minicélulas generadas por las cepas falte algún factor proteico que permita el crecimiento de los cristales. Como el comportamiento de emisión de fluorescencia se replica entre las cepas $\Delta minC$ y $\Delta minCDE$, se puede especular que la localización de este factor dentro de la célula no sea dependiente de las oscilaciones del sistema Min.

Dado el tamaño de las minicélulas, estas pueden ser separadas de las células bacilares, de mayor tamaño. En nuestro caso, realizamos un protocolo combinado con centrifugación diferencial, que separa en gran medida las células bacilares de las minicélulas en cultivo (Lai et al., 2004), y luego un tratamiento con ampicilina, que permite eliminar células bacilares contaminantes de la preparación de minicélulas y obtener altos rendimientos de separación (Jivrajani et al., 2013). Al exponer los pellets de las fracciones de minicélulas y células bacilares a luz UV se observa que ambas presentan emisión de fluorescencia (Figura 23), consistente con lo observado previamente por microscopía donde ambos tipos celulares emitían fluorescencia. La observación por microscopía de campo claro de ambas fracciones indica un enriquecimiento del tipo celular respectivo (Figura 24, fila superior). Curiosamente, al observar las fracciones por microscopía de fluorescencia se observa una alta emisión desde las minicélulas en comparación a las células bacilares (Figura 24, fila inferior). Esto no es trivial, considerando el tamaño reducido de las minicélulas. Como una aproximación de la cantidad de QDs fluorescentes presentes en los distintos tipos celulares, se cuantificó la intensidad de fluorescencia relativa de minicélulas y bacilos a partir de imágenes de microscopía de fluorescencia, un método utilizado previamente para estimar la concentración intracelular de QDs (Tian et al., 2017). Las minicélulas producidas tanto por la mutante $\Delta minC$ como $\Delta minCDE$ presentan una mayor emisión de fluorescencia total en comparación a las células bacilares de la respectiva cepa (Figura 25). Esto sugiere que existe una tendencia fisiológica que lleva a la expulsión de los QDs por medio de las minicélulas generadas. Para ambas mutantes, el nivel de emisión relativo para células bacilares es similar, pero las

minicélulas de la cepa $\Delta minCDE$ presentan una mayor emisión promedio que la cepa $\Delta minC$. La razón de esto es poco clara, pero, como mencionamos anteriormente, podría sugerir que la localización polar de QDs en este sistema se ve afectada por las oscilaciones del sistema Min.

El conjunto de resultados obtenidos permite proponer un modelo de lo que ocurre en las cepas productoras de minicélulas durante la biosíntesis de QDs en fase exponencial. En la cepa BW25113, la biosíntesis ocurre de forma continua, y el tamaño de los cristales depende del tiempo de incubación (Figura 27A). La célula formaría una matriz extracelular que permitiría inmovilizar QDs de cadmio. Eventualmente, el tamaño de los cristales sería tal que el efecto de confinamiento cuántico no tendría efecto y los QDs perderían su emisión de fluorescencia. En contraste, en las cepas $\Delta minC$ y $\Delta minCDE$, la biosíntesis de QDs también ocurriría de forma continua, pero a medida que los cristales se forman, estos serían expulsados de la célula por medio de las minicélulas formadas (Figura 27B). Esto tendría un efecto en el mecanismo de biosíntesis ya que, como fue evaluado por microscopía de fluorescencia y TEM, los QDs están presentes dentro de la célula y no en una matriz extracelular como es el caso de la cepa control. Además, existiría un efecto en las propiedades de las nanopartículas sintetizadas, donde estas crecerían en las células viables, pero mantendrían su tamaño una vez dentro de las minicélulas generadas (Figura 27C).

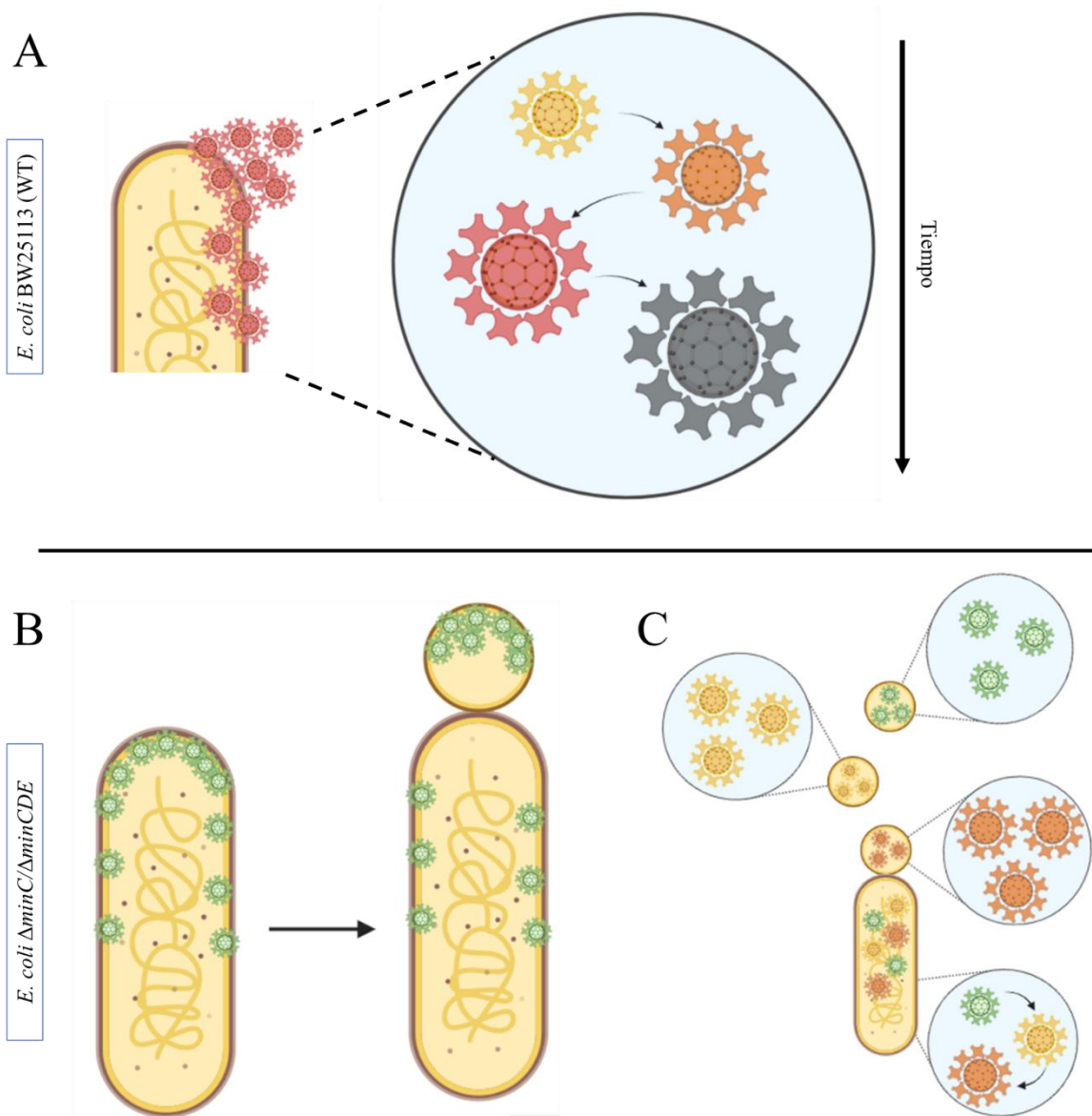


Figura 27: Modelo morfológico de la biosíntesis intracelular de QDs en cepas $\Delta minC$ y $\Delta minCDE$. (A) La biosíntesis en la cepa BW25113 se ve mediada por una matriz extracelular para acumulación de cadmio, donde las nanopartículas crecen con el tiempo de incubación hasta su apagamiento. (B) Los QDs sintetizados en las cepas mutantes del sistema Min se distribuyen en la célula, y pueden ser cargados en las minicélulas generadas. (C) Los QDs cargados en QDs mantienen su coloración y emisión de fluorescencia, permitiendo un mejor control de sus propiedades ópticas.

7.3. Rol fisiológico y proyecciones

A pesar de que los sistemas de biosíntesis utilizados en este trabajo son distintos, y conllevan la formación de QDs de cadmio por mecanismos diferentes, ambos conllevan modificaciones genéticas que, finalmente, llevan a la formación de minicélulas. Como fue reportado previamente, la formación de minicélulas en *E. coli* WT es un hecho sumamente raro (Hoffman & Frank, 1963), por lo que su estudio a nivel fisiológico no presenta una verdadera

relevancia. No obstante, en nuestro caso, la biosíntesis de QDs en cepas modificadas apuntan a un mismo efecto final. En el caso de la cepa AG1/pCA24NgshA, donde se sobreexpresa una proteína, se promueve la formación de células de tamaño menor a 1 μm frente a la exposición a CdCl_2 (Tabla 1). Así también, se observa la formación de estructuras polares *minicell-like*, que eliminarían los QDs sintetizados dentro de la célula (Figura 14). Por otro lado, en las cepas ΔminC y ΔminCDE , al realizar biosíntesis en fase exponencial, los QDs se dispersan en la célula y se acumulan en las minicélulas generadas (Figura 19), en contraste a la cepa WT, la cual genera una matriz extracelular para inmovilizar las nanopartículas (Figura 18B). A pesar de que las modificaciones genéticas realizadas en las cepas son distintas, todas llevan a un fenotipo similar al realizar biosíntesis de QDs. Esto es interesante considerando que i) la formación de minicélulas ocurre de forma muy rara en cepas WT, y ii) que las cepas mutantes del sistema Min son menos tolerantes al precursor CdCl_2 (Figura 16). Considerando que el efecto común visto acá indica la localización polar de QDs y su eliminación en minicélulas, es posible que este mecanismo funcione como una respuesta de eliminación del metal. Recientemente, reportes han indagado en la localización de macromoléculas y su significado biológico para la célula. Varios de estos reportes han utilizado cepas productoras de minicélulas por su capacidad de sesgar elementos en el polo de la célula. Por ejemplo, se ha definido el enriquecimiento polar de proteínas asociadas a membrana en *E. coli*, evaluando un enriquecimiento de 36 proteínas principalmente en minicélulas (Lai et al., 2004), aunque la razón de por qué ocurría este enriquecimiento era desconocido. Luego, se evaluó que algunas proteínas como GroES o TnaA son capaces de relocalizar al polo de forma espontánea, pero este tráfico se veía inhibido en ausencia del sistema Min, lo que reforzaba su rol en la movilización de enzimas en la célula (Li & Young, 2012). Posteriormente, se determinó que las tres proteínas del sistema Min son capaces de interactuar directamente con las distintas proteínas ubicadas en los polos, ya fuera por reclutamiento o exclusión, e incluso se propuso que en cepas productoras de minicélulas, esto generaría una modulación metabólica basada en la localización de enzimas (Lee et al., 2016). Con esto, se estableció la idea de que el sistema Min es, al menos en parte, responsable de la movilización de proteínas post-traducción en la célula. No obstante, nuevos reportes indican que la localización de proteínas no ocurriría solamente después de la traducción, sino que también se podrían movilizar los mensajeros ARN, los cuales se traducirían directamente en el polo de la célula

(Kannaiah et al., 2019). Así también, existirían otros factores proteicos, distintos de las proteínas del sistema Min, los cuáles serían capaces del transporte de proteínas hacia los polos (Szoke et al., 2021). Todos estos antecedentes, junto a los modelos de envejecimiento celular de *E. coli* que apuntan a la acumulación de elementos de daño en la célula como proteínas mal plegadas (Shi et al., 2020), podrían indicar un rol fisiológico a la acumulación polar de QDs en nuestros sistemas, ya que estos se estarían movilizándose hacia los polos (o formándose directamente en los polos) gracias a factores intrínsecos de la célula. Además, si consideramos que ambos sistemas logran eliminar nanopartículas por medio de minicélulas, es plausible proponer que la formación de dichas minicélulas es una nueva respuesta frente a metales pesados. Una nueva línea de investigación puede ser establecida que apunte a cuáles son los elementos requeridos para la formación de minicélulas en cepas WT, tomando como posibilidad la formación de cuerpos de inclusión, filamentación, generación de estrés oxidativo, entre otros.

Con respecto a la utilización biotecnológica de estos sistemas, pudimos determinar que la biosíntesis de QDs en cepas mutantes del sistema Min mejora el control de las propiedades ópticas de las nanopartículas sintetizadas. Así también, se pueden generar fracciones enriquecidas en minicélulas, las cuales presentan una alta densidad de QDs fluorescentes. Ambos factores son sumamente relevantes en la aplicación de la síntesis biológica de QDs a sistemas reales. Por un lado, múltiples especies de bacterias han sido utilizadas para la biosíntesis de QDs de alta calidad, con múltiples cualidades únicas y con condiciones simples de reacción (Bruna et al., 2019, Gallardo et al., 2014, Ulloa et al., 2016, Plaza et al., 2016). No obstante, poder tener un mejor control de las propiedades de estas nanopartículas como el tamaño y, por consiguiente, sus propiedades ópticas, es un punto de estudio importante. Esto entonces podría lograrse por medio de la inducción de la formación de minicélulas en las cepas usadas para la biosíntesis de QDs, fenómeno que se ha podido reportar en gram-negativos y gram-positivos (Wang et al., 2022).

Al mismo tiempo, una de las mayores desventajas de los QDs corresponde a su biocompatibilidad y solubilidad en agua. Los QDs basados en metales pesados, como cadmio o telurio presentan una alta toxicidad, por lo que, a pesar de los avances realizados en la

obtención de estos materiales y su aplicación en líneas celulares (Bao et al., 2010; Pérez-Donoso et al., 2012; Díaz-García et al., 2018), aún no se han podido aplicar clínicamente. Lo mismo ocurre con otros tipos de nanopartículas de importancia clínica, como lo son las nanopartículas *Upconversion* en base a lantánidos, las cuáles han sido propuestas como una nueva forma de biomedicina, pero que, por sus características químicas, son pobremente biocompatibles (Chen et al., 2014). En este trabajo, se utilizó el modelo de QDs de CdS. No obstante, se podría proponer la obtención de nanopartículas de múltiples tipos por medio de biosíntesis bacteriana, con lo cual se produzcan nanopartículas de alta calidad, encapsuladas en minicélulas para mejorar su biocompatibilidad y sus usos en biomedicina e imágenes.

8. Conclusiones

- i) En el sistema de biosíntesis de QDs de cadmio en la cepa de *E. coli* AG1/pCA24NgshA, existe una acumulación de nanopartículas principalmente a nivel del polo de las células y en células esféricas.
- ii) Frente a la síntesis de QDs de CdS, existe un aumento del número de células de tamaño menor a 1 μm . Este comportamiento sería dependiente de la formación de QDs y de la sobreexpresión de la proteína GshA.
- iii) La formación intracelular de QDs de CdS y CdTe se encuentra asociada a eventos de división celular, donde se incluye el sesgo de QDs en células hijas, la formación de células filamentosas y un fenotipo de formación de minicélulas para acumulación de nanopartículas.
- iv) Parte de los QDs de CdS sintetizados en cepas mutantes del sistema Min se cargan en minicélulas, lo que podría corresponder a un sistema de respuesta al metal.
- v) Los QDs sintetizados en las cepas mutantes presentan propiedades distintas a la cepa WT, con mayor emisión de fluorescencia incluso tras 24 horas de biosíntesis.
- vi) Las minicélulas cargadas con QDs pueden ser separadas de las células bacilares, y presentan una alta densidad de fluorescencia.
- vii) Este trabajo es el primero en reportar la relación entre la formación de minicélulas y la biosíntesis de QDs, dando luces en la importancia fisiológica de ambos procesos. Además, recalca la oportunidad para el estudio de la generación de minicélulas cargadas con nanopartículas de interés de alta calidad y con alta emisión de fluorescencia para distintas aplicaciones.

9. Referencias

- Abbasi, S., Molaei, M., & Karimipour, M. (2017). CdSe and CdSe/CdS core-shell QDs: New approach for synthesis, investigating optical properties and application in pollutant degradation. *Luminescence*, 32(7), 1137–1144. <https://doi.org/10.1002/bio.3300>.
- Adler, H. I., Fisher, W. D., Cohen, A., & Hardigree, A. A. (1967). MINIATURE *ESCHERICHIA COLI* CELLS DEFICIENT IN DNA*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 57(2), 321–326. <https://doi.org/10.1073/pnas.57.2.321>.
- Aradská, J., Šmidák, R., Turkovičová, L., Turňa, J., & Lubec, G. (2013). Proteomic differences between tellurite-sensitive and tellurite-resistant *E. coli*. *PLoS ONE*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078010>.
- Awano, N., Wada, M., Mori, H., Nakamori, S., & Takagi, H. (2005). Identification and functional analysis of *Escherichia coli* cysteine desulfhydrases. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 4149–4152. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.4149-4152.2005>.
- Bao, H., Lu, Z., Cui, X., Qiao, Y., Guo, J., Anderson, J. M., & Li, C. M. (2010). Extracellular microbial synthesis of biocompatible CdTe quantum dots. *Acta Biomaterialia*, 6(9), 3534–3541. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.03.030>.
- Briolay, T., Petithomme, T., Fouet, M., Nguyen-Pham, N., Blanquart, C., & Boisgerault, N. (2021). Delivery of cancer therapies by synthetic and bio-inspired nanovectors. *Molecular Cancer*, 20(1), 1–24. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01346-2>.
- Bruna, N., Collao, B., Tello, A., Caravantes, P., Díaz-Silva, N., Monrás, J. P., Órdenes-Aenishanslins, N., Flores, M., Espinoza-Gonzalez, R., Bravo, D., & Pérez-Donoso, J. M. (2019). Synthesis of salt-stable fluorescent nanoparticles (quantum dots) by polyextremophile halophilic bacteria. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38330-8>.
- Bruna, N., Galliani, E., Oyarzún, P., Bravo, D., Fuentes, F., & Pérez-Donoso, J. M. (2022). Biomineralization of lithium nanoparticles by Li-resistant *Pseudomonas rodhesiae* isolated from the Atacama salt flat. *Biological Research*, 55(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40659-022-00382-6>.
- Burt, A., Cassidy, C. K., Ames, P., Bacia-Verloop, M., Baulard, M., Huard, K., Luthey-Schulten, Z., Desfosses, A., Stansfeld, P. J., Margolin, W., Parkinson, J. S., & Gutsche, I. (2020). Complete structure of the chemosensory array core signalling unit in an *E. coli* minicell strain. *Nature Communications*, 11(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14350-9>.
- Carrasco, V., Amarelle, V., Lagos-Moraga, S., Quezada, C. P., Espinoza-González, R., Faccio, R., Fabiano, E., & Pérez-Donoso, J. M. (2021). Production of cadmium sulfide quantum dots by the lithobiontic Antarctic strain *Pedobacter* sp. UYP1 and their application as photosensitizer in solar cells. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01531-4>.

- Chasteen, T. G., Fuentes, D. E., Tantaleán, J. C., & Vásquez, C. C. (2009). Tellurite: History, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance: Review article. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(4), 820–832. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00177.x>.
- Chen, G., Qiu, H., Prasad, P. N., & Chen, X. (2014). Upconversion nanoparticles: Design, nanochemistry, and applications in Theranostics. *Chemical Reviews*, 114(10), 5161–5214. <https://doi.org/10.1021/cr400425h>.
- Crisp, R. W., Pach, G. F., Kurley, J. M., France, R. M., Reese, M. O., Nanayakkara, S. U., Macleod, B. A., Talapin, D. V., Beard, M. C., & Luther, J. M. (2017). Tandem Solar Cells from Solution-Processed CdTe and PbS Quantum Dots Using a ZnTe-ZnO Tunnel Junction. *Nano Letters*, 17(2), 1020–1027. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.6b04423>.
- Dabbousi, B. O., Rodriguez-Viejo, J., Mikulec, F. V., Heine, J. R., Mattoussi, H., Ober, R., Jensen, K. F., & Bawendi, M. G. (1997). (CdSe)ZnS core-shell quantum dots: Synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites. *Journal of Physical Chemistry B*, 101(46), 9463–9475. <https://doi.org/10.1021/jp971091y>.
- Dai, K., & Lutkenhaus, J. (1992). The proper ratio of FtsZ to FtsA is required for cell division to occur in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 174(19), 6145–6151. <https://doi.org/10.1128/jb.174.19.6145-6151.1992>.
- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6640–6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>.
- de Vasconcelos Lima, M., de Andrade Pereira, M. I., Cabral Filho, P. E., Nascimento de Siqueira, W., Milca Fagundes Silva, H. A., de França, E. J., Saegesser Santos, B., Mendonça de Albuquerque Melo, A. M., & Fontes, A. (2019). Studies on Toxicity of Suspensions of CdTe Quantum Dots to *Biomphalaria glabrata* Mollusks. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38(10), 2128–2136. <https://doi.org/10.1002/etc.4525>.
- Díaz-García, V. M., Guerrero, S., Díaz-Valdivia, N., Lobos-González, L., Kogan, M., Pérez-Donoso, J. M., & Quest, A. F. G. (2018). Biomimetic quantum dot-labeled B16F10 murine melanoma cells as a tool to monitor early steps of lung metastasis by in vivo imaging. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 6391–6412. <https://doi.org/10.2147/IJN.S165565>.
- Dubey, A. K., Mollet, B., & Roberts, R. J. (1992). Purification and characterization of the MspI DNA methyltransferase cloned and overexpressed in *E. coli*. *Nucleic Acids Research*, 20(7), 1579–1585. <https://doi.org/10.1093/nar/20.7.1579>.
- Dunleavy, R., Lu, L., Kiely, C. J., McIntosh, S., & Berger, B. W. (2016). Single-enzyme biomineralization of cadmium sulfide nanocrystals with controlled optical properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(19), 5275–5280. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523633113>.
- Farley, M. M., Hu, B., Margolin, W., & Liu, J. (2016). Minicells, back in fashion. *Journal of Bacteriology*, 198(8), 1186–1195. <https://doi.org/10.1128/JB.00901-15>.

- Fernandes, S. O., Surya Prakash, L., Balan Binish, M., Padinchati Krishnan, K., & John Kurian, P. (2018). Changes in morphology and metabolism enable Mn-oxidizing bacteria from mid-oceanic ridge environment to counter metal-induced stress. *Journal of Basic Microbiology*, 58(5), 390–402. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700580>.
- Gallardo, C., Monrás, J. P., Plaza, D. O., Collao, B., Saona, L. A., Durán-Toro, V., Venegas, F. A., Soto, C., Ulloa, G., Vásquez, C. C., Bravo, D., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.07.017>.
- Galli, E., & Gerdes, K. (2012). FtsZ-ZapA-ZapB interactome of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 194(2), 292–302. <https://doi.org/10.1128/JB.05821-11>.
- Haraszthy, V. I., Jordan, S. F., & Zambon, J. J. (2006). Identification of Fur-regulated genes in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Microbiology*, 152(3), 787–796. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28366-0>.
- Helbig, K., Bleuel, C., Krauss, G. J., & Nies, D. H. (2008). Glutathione and transition-metal homeostasis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 190(15), 5431–5438. <https://doi.org/10.1128/JB.00271-08>.
- Helbig, K., Grosse, C., & Nies, D. H. (2008). Cadmium toxicity in glutathione mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 190(15), 5439–5454. <https://doi.org/10.1128/JB.00272-08>.
- Hoffman, H., & Frank, M. E. (1963). TIME-LAPSE PHOTOMICROGRAPHY OF THE FORMATION OF A FREE SPHERICAL GRANULE IN AN *ESCHERICHIA COLI* CELL END. *Journal of bacteriology*, 86(5), 1075–1078. <https://doi.org/10.1128/jb.86.5.1075-1078.1963>.
- Hossain, S. T., Mallick, I., & Mukherjee, S. K. (2012). Cadmium toxicity in *Escherichia coli*: Cell morphology, Z-ring formation and intracellular oxidative balance. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 86, 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.09.017>.
- Hulkoti, N. I., & Taranath, T. C. (2014). Biosynthesis of nanoparticles using microbes-A review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 121, 474–483. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.05.027>.
- Ishii, D., Kinbara, K., Ishida, Y., Ishii, N., Okochi, M., Yohda, M., & Aida, T. (2003). Chaperonin-mediated stabilization and ATP-triggered release of semiconductor nanoparticles. *Nature*, 423(6940), 628–632. <https://doi.org/10.1038/nature01663>.
- Jahangir, M. A., Gilani, S. J., Muheem, A., Jafar, M., Aslam, M., Ansari, M. T., & Barkat, M. A. (2019). Quantum Dots: Next Generation of Smart Nano-Systems. *Pharmaceutical Nanotechnology*, 7(3), 234–245. <https://doi.org/10.2174/2211738507666190429113906>.
- Jivrajani, M., Shrivastava, N., & Nivsarkar, M. (2013). A combination approach for rapid and high yielding purification of bacterial minicells. *Journal of Microbiological Methods*, 92(3), 340–343. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.12.002>.

- Kannaiah, S., Livny, J., & Amster-Choder, O. (2019). Spatiotemporal Organization of the *E. coli* Transcriptome: Translation Independence and Engagement in Regulation. *Molecular Cell*, 76(4), 574–589.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.08.013>.
- Khan, Z., Nisar, M. A., Hussain, S. Z., Arshad, M. N., & Rehman, A. (2015). Cadmium resistance mechanism in *Escherichia coli* P4 and its potential use to bioremediate environmental cadmium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(24), 10745–10757. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6901-x>.
- Kitagawa, M., Ara, T., Arifuzzaman, M., Ioka-Nakamichi, T., Inamoto, E., Toyonaga, H., & Mori, H. (2005). Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (A complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Research*, 12(5), 291–299. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsi012>.
- Lai, E. M., Nair, U., Phadke, N. D., & Maddock, J. R. (2004). Proteomic screening and identification of differentially distributed membrane proteins in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 52(4), 1029–1044. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04040.x>.
- Lee, H. L., Chiang, I. C., Liang, S. Y., Lee, D. Y., Chang, G. D., Wang, K. Y., Lin, S. Y., & Shih, Y. L. (2016). Quantitative proteomics analysis reveals the Min system of *Escherichia coli* modulates reversible protein association with the inner membrane. *Molecular and Cellular Proteomics*, 15(5), 1572–1583. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.053603>.
- Li, G., & Young, K. D. (2012). Isolation and identification of new inner membrane-associated proteins that localize to cell poles in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 84(2), 276–295. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08021.x>.
- Ma, N., & Sun, C. (2021). Cadmium sulfide nanoparticle biomineralization and biofilm formation mediate cadmium resistance of the deep-sea bacterium *Pseudoalteromonas* sp. MT33b. *Environmental Microbiology Reports*, 13(3), 325–336. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12933>.
- Mansur, H. S. (2010). Quantum dots and nanocomposites. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2(2), 113–129. <https://doi.org/10.1002/wnan.78>.
- Marusak, K. E., Feng, Y., Eben, C. F., Payne, S. T., Cao, Y., You, L., & Zauscher, S. (2016). Cadmium sulphide quantum dots with tunable electronic properties by bacterial precipitation. *RSC Advances*, 6(80), 76158–76166. <https://doi.org/10.1039/c6ra13835g>.
- Mi, C., Wang, Y., Zhang, J., Huang, H., Xu, L., Wang, S., Fang, X., Fang, J., Mao, C., & Xu, S. (2011). Biosynthesis and characterization of CdS quantum dots in genetically engineered *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 153(3–4), 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.03.014>.
- Monrás, J. P., Díaz, V., Bravo, D., Montes, R. A., Chasteen, T. G., Osorio-Román, I. O., Vásquez, C. C., & Pérez-Donoso, J. M. (2012). Enhanced Glutathione Content Allows the In Vivo Synthesis of Fluorescent CdTe Nanoparticles by *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 7(11), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048657>.
- Moradi Alvand, Z., Rajabi, H. R., Mirzaei, A., Masoumiasl, A., & Sadatfaraji, H. (2019). Rapid and green synthesis of cadmium telluride quantum dots with low toxicity based on a

plant-mediated approach after microwave and ultrasonic assisted extraction: Synthesis, characterization, biological potentials and comparison study. *Materials Science and Engineering C*, 98(December 2018), 535–544. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.010>.

Murray, C. B., Norris, D. J., & Bawendi, M. G. (1993). Synthesis and Characterization of Nearly Monodisperse CdE (E = S, Se, Te) Semiconductor Nanocrystallites. *Journal of the American Chemical Society*, 115(19), 8706–8715. <https://doi.org/10.1021/ja00072a025>.

Ni, B., Colin, R., & Sourjik, V. (2021). Production and Characterization of Motile and Chemotactic Bacterial Minicells. *ACS Synthetic Biology*, 10(6), 1284–1291. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00012>.

Nikazar, S., Sivasankarapillai, V. S., Rahdar, A., Gasmi, S., Anumol, P. S., & Shanavas, M. S. (2020). Revisiting the cytotoxicity of quantum dots: an in-depth overview. *Biophysical Reviews*, 12(3), 703–718. <https://doi.org/10.1007/s12551-020-00653-0>.

Órdenes-Aenishanslins, N., Anziani-Ostuni, G., Monrás, J. P., Tello, A., Bravo, D., Toro-Ascuy, D., Soto-Rifo, R., Prasad, P. N., & Pérez-Donoso, J. M. (2020). Bacterial synthesis of ternary cdsag quantum dots through cation exchange: Tuning the composition and properties of biological nanoparticles for bioimaging and photovoltaic applications. *Microorganisms*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050631>.

Parti, R. P., Horbay, M. A., Liao, M., & Dillon, J. A. R. (2013). Regulation of minD by oxyR in *Neisseria gonorrhoeae*. *Research in Microbiology*, 164(5), 406–415. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.02.002>.

Pérez, J. M., Calderón, I. L., Arenas, F. A., Fuentes, D. E., Pradenas, G. A., Fuentes, E. L., Sandoval, J. M., Castro, M. E., Elías, A. O., & Vásquez, C. C. (2007). Bacterial toxicity of potassium tellurite: Unveiling an ancient enigma. *PLoS ONE*, 2(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000211>.

Pérez-Donoso, J. M., Monrás, J. P., Bravo, D., Aguirre, A., Quest, A. F., Osorio-Román, I. O., Aroca, R. F., Chasteen, T. G., & Vásquez, C. C. (2012). Biomimetic, mild chemical synthesis of Cdte-GSH quantum dots with improved biocompatibility. *PLoS ONE*, 7(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030741>.

Pichoff, S., Vollrath, B., Touriol, C., & Bouché, J. P. (1995). Deletion analysis of gene minE which encodes the topological specificity factor of cell division in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 18(2), 321–329. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_18020321.x.

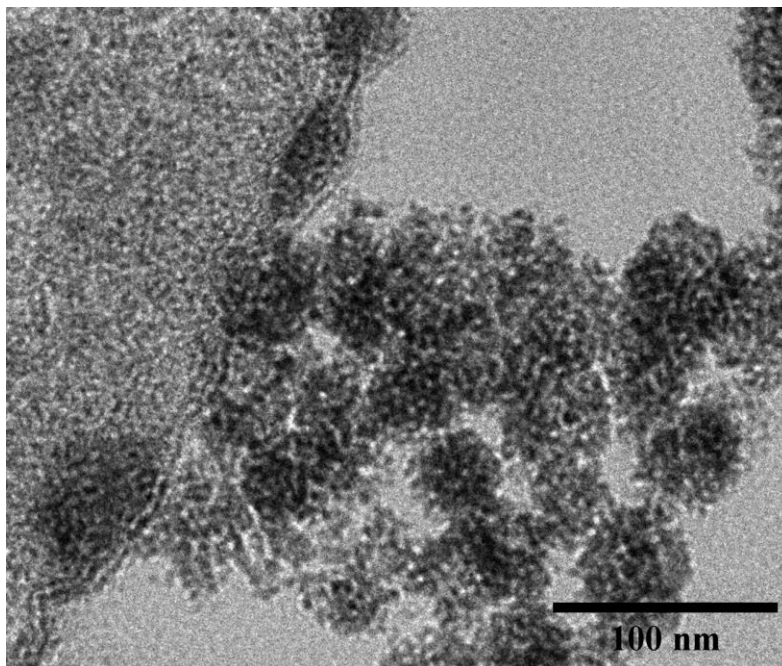
Plaza, D. O., Gallardo, C., Straub, Y. D., Bravo, D., & Pérez-Donoso, J. M. (2016). Biological synthesis of fluorescent nanoparticles by cadmium and tellurite resistant Antarctic bacteria: Exploring novel natural nanofactories. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0477-8>.

Pleskova, S., Mikheeva, E., & Gornostaeva, E. (2018). Using of quantum dots in biology and medicine. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1048, 323–334. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72041-8_19.

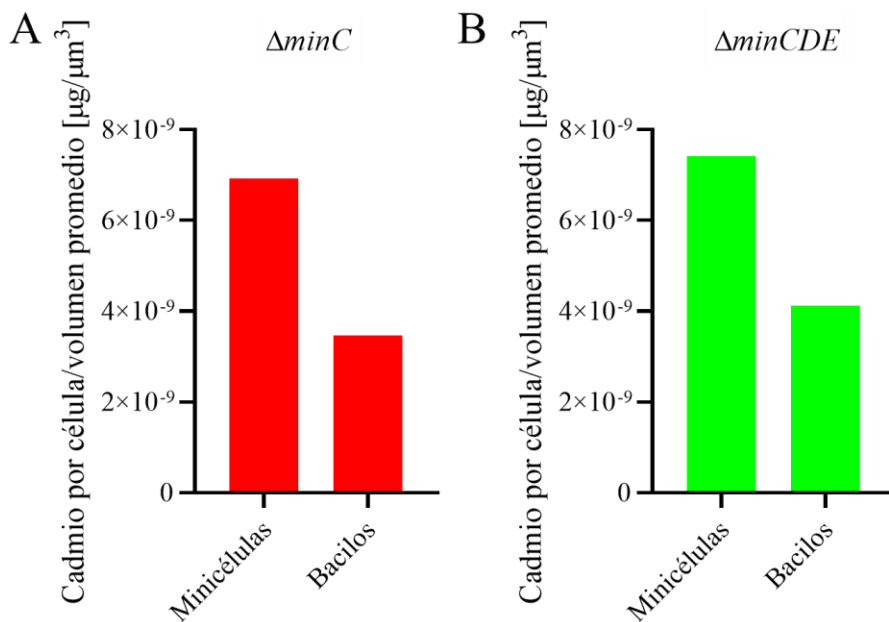
- Qin, Z., Yue, Q., Liang, Y., Zhang, J., Zhou, L., Hidalgo, O. B., & Liu, X. (2018). Extracellular biosynthesis of biocompatible cadmium sulfide quantum dots using *Trametes versicolor*. *Journal of Biotechnology*, 284, 52–56. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.08.004>.
- Ramm, B., Heermann, T., & Schwille, P. (2019). The *E. coli* MinCDE system in the regulation of protein patterns and gradients. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(21), 4245–4273. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03218-x>.
- Rang, C. U., Proenca, A., Buetz, C., Shi, C., & Chao, L. (2018). Minicells as a Damage Disposal Mechanism in *Escherichia coli*. *MSphere*, 3(5), 1–16. <https://doi.org/10.1128/msphere.00428-18>.
- Ríos-Silva, M., Pérez, M., Luraschi, R., Vargas, E., Silva-Andrade, C., Valdés, J., Sandoval, J. M., Vásquez, C., & Arenas, F. (2022). Anaerobiosis favors biosynthesis of single and multi-element nanostructures. *PLoS ONE*, 17(10 October), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0273392>.
- Santiviago, C. A., Fuentes, J. A., Bueno, S. M., Trombert, A. N., Hildago, A. A., Socias, L. T., Youderian, P., & Mora, G. C. (2002). The *Salmonella enterica* sv. Typhimurium smvA, yddG and ompD (porin) genes are required for the efficient efflux of methyl viologen. *Molecular Microbiology*, 46(3), 687–698. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03204.x>.
- Saravanan, A., Kumar, P. S., Karishma, S., Vo, D. V. N., Jeevanantham, S., Yaashikaa, P. R., & George, C. S. (2021). A review on biosynthesis of metal nanoparticles and its environmental applications. *Chemosphere*, 264, 128580. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128580>.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
- Sharma, S. K., Goloubinoff, P., & Christen, P. (2008). Heavy metal ions are potent inhibitors of protein folding. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 372(2), 341–345. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.05.052>.
- Shi, C., Chao, L., Proenca, A. M., Qiu, A., Chao, J., & Rang, C. U. (2020). Allocation of gene products to daughter cells is determined by the age of the mother in single *Escherichia coli* cells. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 287(1926). <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.0569>.
- Szoke, T., Albocher, N., Govindarajan, S., Nussbaum-Shochat, A., & Amster-Choder, O. (2021). Tyrosine phosphorylation-dependent localization of TmaR that controls activity of a major bacterial sugar regulator by polar sequestration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(2). <https://doi.org/10.1073/pnas.2016017118>.

- Tanaka, M., Kageyama, T., Sone, H., Yoshida, S., Okamoto, D., & Watanabe, T. (2016). Synthesis of lithium metal oxide nanoparticles by induction thermal plasmas. *Nanomaterials*, 6(4). <https://doi.org/10.3390/nano6040060>.
- Thomas, M., & Benov, L. (2018). The Contribution of Superoxide Radical to Cadmium Toxicity in *E. coli*. *Biological Trace Element Research*, 181(2), 361–368. <https://doi.org/10.1007/s12011-017-1048-5>.
- Tian, L. J., Min, Y., Li, W. W., Chen, J. J., Zhou, N. Q., Zhu, T. T., Li, D. B., Ma, J. Y., An, P. F., Zheng, L. R., Huang, H., Liu, Y. Z., & Yu, H. Q. (2019). Substrate Metabolism-Driven Assembly of High-Quality CdS_xSe_{1-x} Quantum Dots in *Escherichia coli*: Molecular Mechanisms and Bioimaging Application. *ACS Nano*, 13(5), 5841–5851. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b01581>.
- Tian, L. J., Zhou, N. Q., Liu, X. W., Liu, J. H., Zhang, X., Huang, H., Zhu, T. T., Li, L. L., Huang, Q., Li, W. W., Liu, Y. Z., & Yu, H. Q. (2017). A sustainable biogenic route to synthesize quantum dots with tunable fluorescence properties for live cell imaging. *Biochemical Engineering Journal*, 124, 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.05.011>.
- Ulloa, G., Collao, B., Araneda, M., Escobar, B., Álvarez, S., Bravo, D., & Pérez-Donoso, J. M. (2016). “Use of acidophilic bacteria of the genus *Acidithiobacillus* to biosynthesize CdS fluorescent nanoparticles (quantum dots) with high tolerance to acidic pH.” *Enzyme and Microbial Technology*, 95, 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.09.005>.
- van Veen, H. W., Abee, T., Kortstee, G. J. J., Konings, W. N., & Zehnder, A. J. B. (1994). Translocation of Metal Phosphate via the Phosphate Inorganic Transport System of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 33(7), 1766–1770. <https://doi.org/10.1021/bi00173a020>.
- Venegas, F. A., Saona, L. A., Monrás, J. P., Órdenes-Aenishanslins, N., Giordana, M. F., Ulloa, G., Collao, B., Bravo, D., & Pérez-Donoso, J. M. (2017). Biological phosphorylated molecules participate in the biomimetic and biological synthesis of cadmium sulphide quantum dots by promoting H₂S release from cellular thiols. *RSC Advances*, 7(64), 40270–40278. <https://doi.org/10.1039/c7ra03578k>.
- Wang, N., Zhang, T., Du, S., Zhou, Y., & Chen, Y. (2022). How Do MinC-D Copolymers Act on Z-Ring Localization Regulation? A New Model of *Bacillus subtilis* Min System. *Frontiers in Microbiology*, 13(April), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.841171>.
- Wang, Y., Li, X., Song, J., Xiao, L., Zeng, H., & Sun, H. (2015). All-Inorganic Colloidal Perovskite Quantum Dots: A New Class of Lasing Materials with Favorable Characteristics. *Advanced Materials*, 27(44), 7101–7108. <https://doi.org/10.1002/adma.201503573>.
- Wehrens, M., Ershov, D., Rozendaal, R., Walker, N., Schultz, D., Kishony, R., Levin, P. A., & Tans, S. J. (2018). Size Laws and Division Ring Dynamics in Filamentous *Escherichia coli* cells. *Current Biology*, 28(6), 972-979.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.02.006>.
- Whitfield, G. B., Marmont, L. S., & Howell, P. L. (2015). Enzymatic modifications of exopolysaccharides enhance bacterial persistence. *Frontiers in Microbiology*, 6(May), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00471>.

- Wu, X., Santos, R. R., & Fink-Gremmels, J. (2015). Cadmium Modulates Biofilm Formation by *Staphylococcus epidermidis*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(3), 2878–2894. <https://doi.org/10.3390/ijerph120302878>.
- Xu, J., Hu, R., Wang, Q., Wang, P., & Bao, H. (2019). Extracellular biosynthesis of biocompatible CdSe quantum dots. *IET Nanobiotechnology*, 13(9), 962–966. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2018.5432>.
- Yan, M., Zhang, Y., Qin, H., Liu, K., Guo, M., Ge, Y., Xu, M., Sun, Y., & Zheng, X. (2016). Cytotoxicity of CdTe quantum dots in human umbilical vein endothelial cells: The involvement of cellular uptake and induction of pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 529–542. <https://doi.org/10.2147/IJN.S93591>.
- Yan, M., Zhang, Y., Xu, K., Fu, T., Qin, H., & Zheng, X. (2011). An in vitro study of vascular endothelial toxicity of CdTe quantum dots. *Toxicology*, 282(3), 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.01.015>.
- Yang, X., Lyu, Z., Miguel, A., Mcquillen, R., & Huang, K. C. (2017). GTPase activity – coupled treadmilling of the bacterial tubulin FtsZ organizes septal cell wall synthesis. 747(February), 744–747.
- Yang, Z., Lu, L., Berard, V. F., He, Q., Kiely, C. J., Berger, B. W., & McIntosh, S. (2015). Biomanufacturing of CdS quantum dots. *Green Chemistry*, 17(7), 3775–3782. <https://doi.org/10.1039/c5gc00194c>.
- Yao, C., Lin, T., Lian, Z., Liao, S., Yan, Z., & Wu, S. (2020). Aggregation-Induced Emission Properties of Glutathione and L-Cysteine Capped CdS Quantum Dots and their Application as Zn(II) Probe. *Journal of Fluorescence*, 30(6), 1601–1609. <https://doi.org/10.1007/s10895-020-02596-x>.
- Yin, J., Cogan, N. M. B., Burke, R., Hou, Z., Sowers, K. L., & Krauss, T. D. (2019). Size dependence of photocatalytic hydrogen generation for CdTe quantum dots. *Journal of Chemical Physics*, 151(17). <https://doi.org/10.1063/1.5125000>.
- Yu, X.-C., & Margolin, W. (2000). Deletion of the min Operon Results in Increased Thermosensitivity of an ftsZ84 Mutant and Abnormal FtsZ Ring Assembly, Placement, and Disassembly. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (Vol. 182, Issue 21).
- Zhang, Y., Ji, W., He, L., Chen, Y., Ding, X., Sun, Y., Hu, S., Yang, H., Huang, W., Zhang, Y., Liu, F., & Xia, L. (2018). *E. coli* Nissle 1917-derived minicells for targeted delivery of chemotherapeutic drug to hypoxic regions for cancer therapy. *Theranostics*, 8(6), 1690–1705. <https://doi.org/10.7150/thno.21575>.
- Zhu, T. T., Tian, L. J., Yu, S. S., & Yu, H. Q. (2021). Roles of cation efflux pump in biomineralization of cadmium into quantum dots in *Escherichia coli*. *Journal of Hazardous Materials*, 412(October 2020). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125248>.



Anexo 3: Morfología de QDs de CdS biosintetizados por *E. coli*. Zoom digital de micrografía de TEM de QDs de CdS biosintetizados por *E. coli* BW25113, mostrando cristales individuales acumulados en una matriz extracelular.



Anexo 4: Cuantificación de cadmio en minicélulas. Cadmio intracelular en minicélulas y bacilos de las cepas $\Delta minC$ (A) $\Delta minCDE$ (B) cuantificado por FAAS. El resultado se expresa como el cadmio estimado por célula normalizado por el volumen promedio de cada tipo celular.

11. Otras actividades

-Publicaciones en revisión

Felipe Valenzuela-Ibaceta, Valentina Carrasco, Sebastián Lagos-Moraga, Claudio Dietz-Vargas, Claudio A. Navarro, José M. Pérez-Donoso. (2023). *Arthrobacter vasquezii* sp. nov., isolated from a soil sample from Union Glacier, Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. En revisión.

Claudio Dietz-Vargas, **Felipe Valenzuela-Ibaceta**, José M. Pérez-Donoso. (2023). Solid medium for the direct isolation of bacterial colonies growing with polycyclic aromatic hydrocarbons or 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) as the sole carbon source. *Archives of Microbiology*. En revisión. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2701846/v1>.

-Manuscritos en preparación

Felipe Valenzuela-Ibaceta, José M. Pérez-Donoso. Production of minicells by *Escherichia coli* biosynthesizing cadmium/tellurite fluorescent nanoparticles: A new mechanism for heavy metal disposal.

Felipe Valenzuela-Ibaceta, Javiera Ramos-Zúñiga, Nicolás Torres-Olea, Claudio Dietz-Vargas, Claudio A. Navarro, José M. Pérez-Donoso. Minicells as an *Escherichia coli* strategy for the accumulation and disposal of quantum dots biosynthesized in cells exposed to cadmium.

-Presentaciones en congresos nacionales

Felipe Valenzuela-Ibaceta, Javiera Ramos-Zúñiga, Nicolás Torres-Olea, Claudio Dietz-Vargas, José M. Pérez-Donoso. Producción de minicélulas por *Escherichia coli* como un mecanismo de encapsulación de nanopartículas fluorescentes de cadmio (Quantum dots). Congreso SOMICH 2022. La Serena - Chile. 29 de noviembre - 2 de diciembre 2022.

Javiera Ramos-Zúñiga, Nicolás Bruna, Nia Oetiker, **Felipe Valenzuela-Ibaceta**, Claudio Dietz-Vargas, José Ramón Lamas, Alberto Paradela, José M. Pérez-Donoso. Análisis proteómico cuantitativo TMT-plex de *Escherichia coli* en la biosíntesis de Quantum Dots de CdS: Nuevos hallazgos sobre el mecanismo de síntesis y su rol en la respuesta al metal. Congreso SOMICH 2022. La Serena - Chile. 29 de noviembre - 2 de diciembre 2022.

Claudio Dietz-Vargas, Nicolás F. Torres-Olea, Javiera Ramos-Zúñiga, Valentina Carrasco, Nicolás Bruna, **Felipe Valenzuela-Ibaceta**, José M. Pérez-Donoso. *Pseudomonas silesiensis*, una bacteria Antártica degradadora de hidrocarburos y tolerante a metales pesados con potencial de biorremediación. Congreso SOMICH 2022. La Serena - Chile. 29 de noviembre - 2 de diciembre 2022.

-Presentaciones en congresos internacionales

Dietz-Vargas, C., Torres-Olea, N., Ramos-Zúñiga, J., Carrasco, V., **Valenzuela-Ibaceta, F.**, Bruna, N., Pérez-Donoso, J. M. (2022). Novel *Pseudomonas silesiensis*, a heavy metal

tolerant and hydrocarbon-degrading Antarctic bacteria with bioremediation potential, selected using a new solid media capable of screening and isolation of hydrocarbon-degrading bacteria. 10th SCAR Open Science Conference. India (online).

Dietz-Vargas, C., Torres-Olea, N., Ramos-Zúñiga, J., Carrasco, V., Bruna, N., Valenzuela-Ibaceta, F., Lagos-Moraga, S., Pérez-Donoso, J. M. (2023). *Pseudomonas silesiensis*, hydrocarbon degrading and heavy-metal tolerant Antarctic bacteria capable of plastic and dibenzofuran biodegradation, with versatile bioremediation potential. BioRemid. Suecia.

-Actividades de difusión

Día de la Ciencia en familia 2022, Edición Antártica. BioNanotechnology and Microbiology Lab. Noviembre, 2022.