VOLUMEN 48
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

Construcción y Caracterización de un Biosensor para Analizar el Daño Promovido por Nanoplásticos Sobre la Envoltura Celular de *Bacillus subtilis*

Construction and Characterization of a Biosensor to Analyze the Cell Envelope Damage Response Promoted by Nanoplastics in *Bacillus subtilis*

Madelyn Melissa Zamudio Godínez[1], Beatriz Rufina González Pérez[1], Mario Pedraza Reyes*[1]
[1]División de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Biología, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N, Guanajuato, México.
*pedrama@ugto.mx

Resumen

Los nanoplásticos (NPs), con tamaños comprendidos entre 1-1000 nm, han sido encontrados en ecosistemas marinos, terrestres y atmosféricos, representando un serio problema ambiental debido a su acumulación y potencial impacto tóxico sobre los organismos. *Bacillus subtilis* es una bacteria Gram positiva capaz de proliferar en ambientes hostiles mediante la activación de respuestas de adaptación orquestadas por circuitos genéticos específicos. Estudios previos mostraron que los NPs son capaces de interactuar con la superficie celular de *B. subtilis* y afectar su viabilidad. Distintos factores, incluyendo algunos antibióticos que interfieren con la síntesis de la pared celular en esta bacteria, activan Respuestas de Daño a las Envolturas Celulares activadas por reguladores como LiaRS. En el presente estudio, i) se generó una cepa reportera de *B. subtilis* portando una fusión transcripcional *liaH-lacZ*, ii) se demostró que un antibiótico que daña la pared celular fue capaz de activar la expresión específica del gen reportero *lacZ*. En resumen, en el presente estudio se generó y caracterizó un biosensor microbiano que permitirá determinar el mecanismo de daño promovido por los NPs en la bacteria ambiental *B. subtilis*.

Palabras clave: *Bacillus subtilis*; nanoplásticos; estrés electrofílico; sistema LiaRS; *liaH*.

Introducción

Los plásticos, productos sintéticos fabricados generalmente con polímeros y otros aditivos químicos, se utilizan en diversos aspectos de la vida cotidiana debido a su bajo costo, fácil producción, versatilidad e hidrofobicidad. Sin embargo, debido a las malas prácticas adoptadas durante su procesamiento y/o desecho, estos materiales causan contaminación ambiental (Geyer *et al*., 2017) Se ha descrito que, en el medio ambiente distintos factores pueden contribuir a su degradación generando subproductos de menor tamaño. Estas partículas plásticas pequeñas, también están presentes en diferentes productos cosméticos y de uso industrial, los cuales pueden causar contaminación durante su desecho al medio ambiental. De acuerdo con su diámetro, las partículas plásticas se clasifican en microplásticos (MPs) y nanoplásticos (NPs), estos últimos poseen tamaños comprendidos entre 1-1000 nm (Sangkham *et al*., 2022). Ambos tipos de partículas han sido detectadas en ecosistemas marinos, terrestres y atmosféricos a nivel global, representando un serio problema ambiental debido a su acumulación y potencial impacto tóxico sobre los organismos que habitan en la biosfera (Jiang *et al*., 2020).

En particular, los NPs contaminantes han cobrado especial relevancia debido a su reducido tamaño que favorece la interacción con organismos superiores y microorganismos. En bacterias ambientales, estas partículas son capaces de generar respuestas adaptativas que promueven un cambio en las comunidades microbianas (Liu *et al*., 2024). *B. subtilis* es una bacteria Gram positiva capaz de proliferar en entornos hostiles mediante la activación de respuestas de estrés celular orquestadas por circuitos genéticos que regulan la expresión de factores involucrados en la protección y mantenimiento de la homeostasis celular (Hecker *et al*., 2001). Además, *B. subtilis* representa un modelo para investigar procesos de adaptación como la

mutagénesis asociada al estrés, la reparación del ADN y otros mecanismos que favorecen la supervivencia (Pedraza Reyes *et al*., 2024).

En un estudio previo, enfocado en entender el impacto de los NPs de poliestireno sobre la fisiología de las bacterias ambientales, se demostró que estos materiales se adhieren a la superficie de *B. subtilis*, pero, son incapaces de trasponer sus barreras celulares. Interesantemente, la adherencia de los NPs, en un efecto dosis-dependiente, afectó la viabilidad celular y promovió la mutagénesis en esta bacteria (Ramírez Mata, 2023). Estas evidencias permitieron postular que los NPs activan una respuesta de estrés asociada a daños sobre la envoltura celular de *B. subtilis*, el cual genera estrés electrofílico y promueve la formación de especies reactivas de oxígeno (Ramírez Mata, 2023).

Las respuestas al estrés de las envolturas celulares (Cell Envelope Stress Response, CESR) en *B. subtilis* son inducidas por antibióticos e involucran la expresión y síntesis de factores específicos que desintoxican o eliminan los compuestos antimicrobianos de su sitio de acción. La red CESR consta de sistemas de dos componentes (2CS) y factores sigma (σ) de función extra-citoplasmática (ECF). El sistema LiaRS constituye un sistema 2CS que participa en esta red reguladora, el cual detecta perturbaciones ocasionadas por agentes de daño que interfieren con la biosíntesis de la envoltura celular. Una vez activado, LiaRS induce la expresión de genes que favorecen la adaptación y protección de la envoltura celular, entre ellos el gen *liaH*. (Wolf *et al*., 2010; Radeck *et al*., 2016).

En consideración a estos antecedentes, el presente estudio se enfocó en la obtención de una cepa recombinante de *B. subtilis* portando una fusión transcripcional *liaH-lacZ* capaz de reportar los daños promovidos sobre las envolturas celulares por antibióticos y contaminantes tóxicos como los NPs.

Materiales y métodos

Las cepas y plásmidos utilizados en estudio se describen en la Tabla 1.

***Tabla 1**. Cepas y plásmidos utilizadas en este estudio.*

Cepa	Descripción	Referencia
Escherichia coli		
PERM2084	*Escherichia coli* XL10-GOLD conteniendo el plásmido pMUTIN-4-*cat* con un fragmento interno del gen *liaH* de *B. subtilis* de ~454 pb (Cm^R).	Stock del laboratorio de M. Pedraza-Reyes
Bacillus subtilis		
PERM 311 (168)	Trp^-	Stock de laboratorio
PERM2177	*Bacillus subtilis* 168, portando en el locus *liaH* la construcción pMUTIN-4-cat-*liaH* (Cm^R).	Este estudio
Plásmido		
pPERM2084	Vector integrativo pMUTIN-4-cat que porta la fusión transcripcional *liaH-lacZ* (Cm^R)	Stock del laboratorio de M. Pedraza-Reyes

Medios de cultivo

Las cepas se cultivaron en medio Luria-Broth (LB), líquido o sólido en placa, según lo requerido. Cuando fue necesario, el medio se suplementó con cloranfenicol (Cm, 5 µg/mL).

Para llevar la cepa de *B. subtilis* 168 a su estado de competencia se empleó el medio GMI, el cual se compone de Sales Spizizen 10X, Glucosa 50%, Extracto de levadura 10% y Casaminoácidos 5%; y medio GMII, conformado por el medio GMI suplementado con $CaCl_2$ 0.5 M y $MgCl_2$ 0.1 M (Boylan *et al*., 1972).

Obtención de células competentes y transformación de *B. subtilis* 168

Previo a la transformación, la cepa de *B. subtilis* 168 se llevó a su estado de competencia, mediante el siguiente protocolo (Spizizen, 1958). A partir del preinóculo de una colonia en medio GMI incubado a temperatura ambiente durante 12 h, se inocularon 25 mL de medio GMI en un matraz Erlenmeyer estéril el cual se incubó a 37°C/250 rpm. Se tomaron lecturas de DO a 600 nm (DO_{600}) en un espectrofotómetro (Biochrom WPA CO7500; Cambridge, UK) en intervalos de 15 min hasta localizar el punto T_0 (Etapa donde interceptan las fases de crecimiento exponencial y estacionaria). A partir de este punto, el cultivo se incubó bajo las mismas condiciones durante 90 min. Posteriormente, se realizó una dilución 1:10 en medio GMII en un matraz estéril y el cultivo diluido se incubó durante 1 h adicional. Una vez alcanzado el estado de competencia, las células se transformaron con la construcción PERM2084 (pMUTIN-4-cat-*liaH*) y se plaquearon en medio LB suplementado con Cm. De las transformantes resultantes, se seleccionó una colonia para su corroboración fenotípica mediante ensayos de actividad de β-galactosidasa en respuesta a la bacitracina.

Ensayos de actividad de β-galactosidasa

A partir de un pre-inóculo de la cepa de interés, incubado a 37 °C con agitación constante durante 12 h, se transfirieron 300 µL a un matraz estéril con 25 mL de medio LB suplementado con Cm. El cultivo se incubó bajo las mismas condiciones hasta alcanzar una DO_{600} de 0.5, punto en el que se colectaron muestras de 1 mL por duplicado. Posteriormente, el cultivo se repartió en volúmenes iguales en dos matraces estériles, uno de estos subcultivos, se suplementó con bacitracina (Bac) a una concentración final de 15 µg/mL, el otro se dejó como control sin tratamiento. Los cultivos se mantuvieron en incubación a 37ºC/250 rpm, colectándose ambas muestras celulares de 1 mL por duplicado a los 30, 60 y 90 min. Las muestras obtenidas se centrifugaron a 11 000 ×g durante 2 min y la pastilla resultante se lavó con Tris-HCl 25 mM. Posteriormente, se centrifugaron nuevamente y la pastilla se resuspendió en 640 µL de Buffer Z suplementado con β-mercaptoetanol (2.7µL/mL de Buffer Z). En seguida, se añadieron 160 µL de lisozima (2.5 mg/mL) gota a gota y las muestras se incubaron a 37 °C durante 20 min. Transcurrido este tiempo, se agregaron 8 µL de Triton 100 (10%; v/v) a cada muestra y se incubaron durante 5 min en baño de hielo. Posteriormente, las muestras se incubaron durante 2 min en un baño de agua a 30 °C y, sin retirarlas del baño, se les añadieron 160 µL de ONPG (4 mg/mL) hasta observar el desarrollo de una coloración amarilla. La reacción se detuvo mediante la adición de 400 µL de Na_2CO_3 (125 mg/mL) y, finalmente, se midió la absorbancia a 420 nm empleando el espectrofotómetro UV-Vis Jenway Genova Plus. Las lecturas obtenidas se utilizaron para calcular la actividad de β-galactosidasa expresada en unidades Miller (DO_{420nm} x 1000/t (min) x Vol de muestra x DO_{600} del cultivo) (Nicholson, & Setlow, 1990).

Resultados

Obtención de una cepa de *B. subtilis* 168 portando una fusión transcripcional *liaH-lacZ*

El plásmido pPERM2084, se introdujo por transformación a células competentes de *B. subtilis* 168. El evento de recombinación homóloga sencilla que da lugar a la integración de la construcción pMUTIN-4-cat-*liaH* en el locus *liaH* del cromosoma de *B. subtilis* se muestra en la Figura 1.

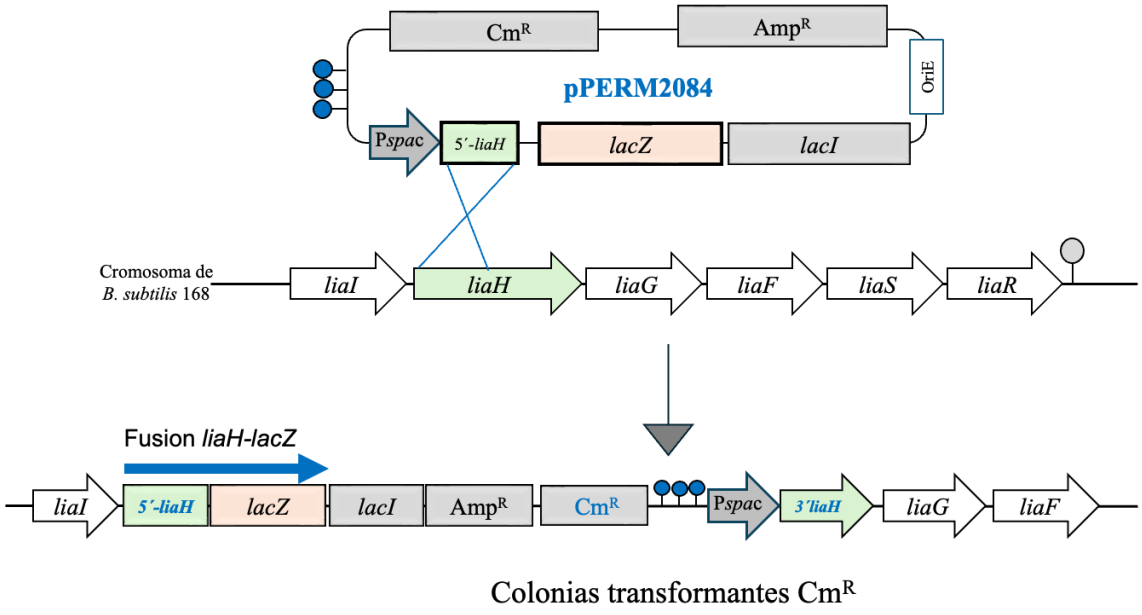


Figura 1. Evento de recombinación homóloga sencilla conducente a la integración de la construcción pPERM20284 en el locus liaH del cromosoma de B. subtilis 168. La integración genera colonias transformantes resistentes a cloranfenicol (Cm^R) que portan una fusión transcripcional en fase liaH-lacZ, la expresión de lacZ en las transformantes queda bajo el control de las regiones regulatorias nativas ubicadas río arriba de liaH

Se obtuvieron colonias transformantes en las tres placas de medio LB suplementadas con Cm (Figura 2A). Como se muestra en esta Figura, no se obtuvieron colonias en el medio sembrado con células competentes sin transformar (Control). Se seleccionaron 23 colonias con fenotipo Cm^R y se sembraron por estría en otra placa de medio LB para corroborar su resistencia a Cm (Figura 1B).

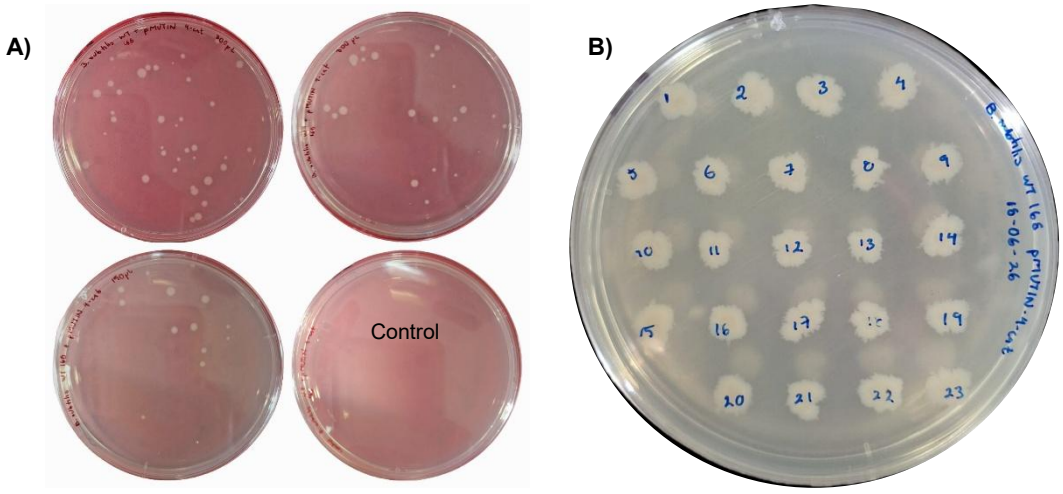


*Figura 2. Transformación de B. subtilis 168 con la construcción pPERM20284. (**A**) Colonias transformantes obtenidas en tres placas de medio LB suplementado con Cm. Como **control**, se sembró una placa con células competentes que no fueron transformadas con el plásmido pPERM2084, en esta placa no se observó crecimiento colonial. (**B**) Resiembra de colonias transformantes, donde se observan las 23 colonias seleccionadas y resembradas en medio LB suplementado con Cm*

Análisis de la activación de la respuesta de daño a las envolturas celulares en colonias de *B. subtilis* que portan una fusión *liaH-lacZ*

Para verificar la funcionalidad de la construcción reportera *liaH-lacZ*, se eligió 1 colonia transformante para analizar la inducción de la expresión del gen reportero *lacZ* por la bacitracina, un antibiótico que afecta la síntesis de la pared celular, activando la respuesta LiaRS e induciendo la expresión de *liaH* (Radeck *et al*., 2016). Para ello, un cultivo de esta transformante, propagado a una DO_{600} de 0.5, se trató, o no, con bacitracina (Bac); a continuación, se tomaron muestras celulares de ambos cultivos a distintos tiempos para determinar sus niveles de actividad de β-galactosidasa. Los resultados mostraron una ligera disminución en el crecimiento del cultivo tratado con Bac, así como un incremento significativo en los valores de β-galactosidasa respecto al cultivo control (Figura 3). El máximo nivel de expresión de la fusión *liaH-lacZ* ocurrió a los 60 min posteriores al tratamiento con la Bac, disminuyendo en los próximos 30 min, lo cual sugiere que las células activan la reparación de la pared celular disminuyendo la respuesta mediada por LiaRS (Figura 3).

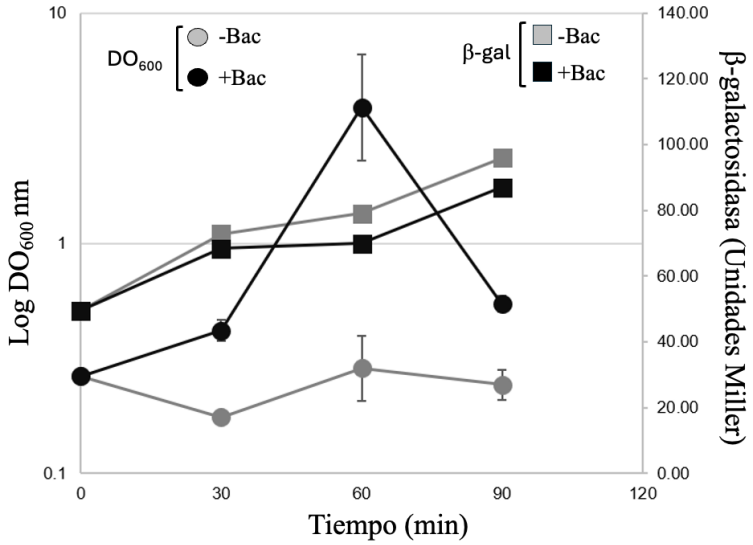


Figura 3. Niveles de expresión del gen reportero lacZ en una cepa de B. subtilis que porta una fusión transcripcional liaH-lacZ tratada o no con bacitracina. La cepa de interés se cultivó hasta una DO_{600} de 0.5, en este punto, el cultivo se dividió en dos subcultivos, uno de los cuales se trató con bacitracina. Se determinó el crecimiento mediante DO_{600} (cuadros) y actividad de β-galactosidasa (círculos) en muestras celulares colectadas a los 30, 60 y 90 min posteriores al tratamiento con el antibiótico.

Conclusiones

1) Se obtuvieron colonias de *B. subtilis* 168 transformadas con el plásmido pPERM2084, las cuales adquirieron resistencia a Cm y portan una fusión transcripcional *liaH-lacZ*.
2) La cepa reportera es capaz de expresar actividad de β-galactosidasa como respuesta al tratamiento con bacitracina, indicando que la construcción pMUTIN-4-cat-*liaH-lacZ* es funcional.
3) La exposición a la bacitracina de la cepa reportera mostró un aumento de ~4 veces en la actividad β-galactosidasa en referencia al control sin tratamiento a los 60 min.
4) La cepa reportera obtenida se utilizará para estudiar la activación de la respuesta de *B. subtilis* al daño inducido por los nanoplásticos a su envoltura celular.

Agradecimientos

Trabajo financiado por la Secretaría de Ciencias Humanidades Tecnologías e Innovación (SECIHTI; Subsidio, CBF2023-2024-708) y la Universidad de Guanajuato (Subsidio, CIIC 219/2026). Madelyn M. Zamudio Godínez agradece la beca otorgada por la DAIP. Beatriz R. González Pérez agradece la beca doctoral otorgada por la SECIHTI.

Referencias

Boylan, R. J., Mendelson, N. H., Brooks, D., & Young, F. E. (1972). Regulation of the bacterial cell wall: analysis of a mutant of Bacillus subtilis defective in biosynthesis of teichoic acid. *Journal of Bacteriology,* 110, 281–290.

Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7), e1700782. https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782.

Hecker, M., & Völker, U. (2001). General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 44, 35–91. https://doi.org/10.1016/S0065-2911(01)44011-2.

Jiang, B., Kauffman, A. E., Li, L., McFee, W., Cai, B., Weinstein, J., Lead, J. R., Chatterjee, S., Scott, G. I., & Xiao, S. (2020). Health impacts of environmental contamination of micro- and nanoplastics: a review. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 25(1), 29. https://doi.org/10.1186/s12199-020-00870-9.

Liu, L., Sun, Y., Du, S., Li, Y., & Wang, J. (2024). Nanoplastics promote the dissemination of antibiotic resistance genes and diversify their bacterial hosts in soil. *Eco-Environment & Health*, 3(1), 1–10. https://doi.org/10.1016/j.eehl.2023.09.005.

Nicholson, W. L., & Setlow, P. (1990). Sporulation, germination and outgrowth, p 391–450. In Harwood CR, Cutting SM (ed), *Molecular biological methods for Bacillus*. John Wiley & Sons, Sussex, England.

Pedraza-Reyes, M., Abundiz-Yañez, K., Rangel-Mendoza, A., Martínez, L. E., Barajas-Ornelas, R. C., Cuéllar-Cruz, M., Leyva-Sánchez, H. C., Ayala-García, V. M., Valenzuela-García, L. I., & Robleto, E. A. (2024). *Bacillus subtilis* stress-associated mutagenesis and developmental DNA repair. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 88(2). https://doi.org/10.1128/mmbr.00158-23.

Radeck, J., Fritz, G., & Mascher, T. (2017). The cell envelope stress response of *Bacillus subtilis*: from static signaling devices to dynamic regulatory network. *Current Genetics*, 63(1), 79–90. https://doi.org/10.1007/s00294-016-0624-0.

Ramírez Mata, M. A. (2023*).* Análisis de los efectos citotóxicos y genotóxicos promovidos por microplásticos en la bacteria ambiental Bacillus subtilis. *Tesis de Maestría en Ciencias*, Universidad de Guanajuato.

Sangkham, S., Faikhaw, O., Munkong, N., Sakunkoo, P., Arunlertaree, C., Chavali, M., Mousazadeh, M., & Tiwari, A. (2022). A review on microplastics and nanoplastics in the environment: Their occurrence, exposure routes, toxic studies, and potential effects on human health. *Marine Pollution Bulletin*, 181,113832. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.113832.

Spizizen, J. (1958). Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 44:1072–1078.

Wolf, D., Kalamorz, F., Wecke, T., Juszczak, A., Mäder, U., Homuth, G., Jordan, S., Kirstein, J., Hoppert, M., Voigt, B., Hecker, M., & Mascher, T. (2010). In-depth profiling of the LiaR response of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology,* 192(18), 4680-4693. doi: 10.1128/JB.00543-10.