

**PARTICIPACIÓN DE NITRATO Y NITRITO
REDUCTASAS EN LA RESISTENCIA DE
Escherichia coli A TELURITO**

Tesis

**Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De**

Doctor en Ciencias con mención en Microbiología

Facultad De Ciencias

Por

María Isabel Amaya Torres

Abril, 2019

Director de Tesis Dr. Claudio Vásquez G.

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

MARIA ISABEL AMAYA TORRES

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 6 de Marzo de 2019.

Director de Tesis:

Dr. Claudio Vásquez G

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Claudio Martínez

Dr. Alexis Aspeé

Dr. Ricardo Cabrera

Dra. Gloria Levicán

A mis abuelas Magdalena y Margarita

RESUMEN BIOGRÁFICO



Nació en Santiago de Chile en 1988, más tarde, tras terminar su Educación Media en el Liceo N°1 Javiera Carrera, ingresó a la carrera de Bioquímica de la Universidad de Chile el año 2006. Junto con su título profesional obtuvo el grado de Magíster en Bioquímica, en la mención Bioquímica Ambiental, el año 2012. El año siguiente ingresa al programa de Doctorado en Ciencias con mención en Microbiología, que imparten conjuntamente las Universidad de Santiago de Chile y Universidad de Chile. Ha participado en proyectos sociales y educativos, y ha trabajado en la Unidad de Ciencias de la Conservación del Centro Nacional de Conservación y Restauración.

Agradecimientos

La realización del doctorado y el desarrollo de la tesis que está en sus manos fueron posibles gracias a la contribución de diversas personas a quienes me sería imposible agradecer como se lo merecen en tan breve espacio. Sin embargo, no puedo dejar de mencionar el apoyo de los profesores Alexis Aspee, Ricardo Cabrera, Gloria Levican y Claudio Martínez, miembros de la comisión evaluadora. Así mismo la compañía y ayuda incondicional de los integrantes -presentes y pretéritos- del laboratorio de Microbiología Molecular de la Universidad de Santiago de Chile, dirigido por el profesor Claudio Vásquez. Quisiera dejar plasmada en estas palabras mi profunda y sincera gratitud a todos ellos y a quienes me brindaron una parte de sí mismos a lo largo de esta etapa.

El financiamiento que permitió el desarrollo de este trabajo fue otorgado por la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICYT) a través de la Beca de Doctorado Nacional 21130279 y sus beneficios complementarios, y con el apoyo de los proyectos FONDECYT 1130362 y 1160051.

Índice de Materias

Lista de Tablas	vi
Lista de Figuras	viii
Lista de símbolos, abreviaturas y nomenclatura	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	1
Telurito y especies reactivas de oxígeno	1
Efecto del telurito en el metabolismo de <i>E. coli</i>	2
Reducción y resistencia a telurito	5
Nitrato reductasa A y resistencia a telurito	8
Reducción de nitrato en <i>E. coli</i>	9
Óxido nítrico y estrés nitrosativo	11
Defensa contra el estrés nitrosativo	14
Resistencia a telurito y reducción de nitrato	19
Análisis del crecimiento bacteriano y área bajo la curva	20
Hipótesis y Objetivos	23
MATERIALES Y MÉTODOS	25
Cepas y condiciones de cultivo	25

Curvas de crecimiento	25
Análisis de curvas de crecimiento	26
Niveles de nitrito	29
RESULTADOS	31
Objetivo 1: Determinar el efecto del telurito en el crecimiento de las mutantes de <i>E. coli</i> $\Delta napA$, $\Delta nrfA$ y $\Delta nirB$	31
Objetivo 2: Evaluar el efecto del nitrito en el crecimiento de <i>E. coli</i> expuesta a telurito	39
Objetivo 3: Determinar la participación de los mecanismos de defensa contra óxido nítrico en la resistencia de <i>E. coli</i> a telurito	43
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIÓN	53
BIBLIOGRAFÍA	54
ANEXO	63

Lista de Tablas

Tabla 1. Parámetros determinados para el crecimiento de <i>E. coli</i> BW25113 en LB	33
Tabla 2. Parámetros determinados para el crecimiento de <i>E. coli</i> BW25113 en MD	36
ANEXO	
Tabla A 1. Parámetros determinados para el crecimiento de <i>E. coli</i> BW25113 en LB, LB con nitrato y LB con nitrito	64
Tabla A 2. Parámetros determinados para el crecimiento de <i>E. coli</i> BW25113 en MD, MD con nitrato y MD con nitrito	65
Tabla A 3. Área bajo la curva logística de cultivos de <i>E. coli</i> BW25113	66
Tabla A 4. Área bajo la curva de crecimiento de <i>E. coli</i> BW25113 y <i>E. coli</i> $\Delta napA$ en MD con nitrato 25 mM	67
Tabla A 5. . Área bajo la curva de crecimiento de <i>E. coli</i> BW25113 y <i>E. coli</i> $\Delta nrfA$ en MD con nitrato 25 mM	68
Tabla A 6. Área bajo la curva de crecimiento de <i>E. coli</i> BW25113 y <i>E. coli</i> $\Delta nirB$ en MD con nitrato 25 mM	69
Tabla A 7. Área bajo la curva de crecimiento de <i>E. coli</i> BW25113 y <i>E. coli</i> $\Delta napA$ en MD (sin nitrato)	70
Tabla A 8. Área bajo la curva de crecimiento de <i>E. coli</i> BW25113 y <i>E. coli</i> $\Delta nrfA$ en MD (sin nitrato)	71
Tabla A 9. Área bajo la curva de crecimiento de <i>E. coli</i> BW25113 y <i>E. coli</i> $\Delta nirB$ en MD (sin nitrato)	72
Tabla A 10. Área bajo la curva de crecimiento de <i>E. coli</i> BW25113 y <i>E. coli</i> $\Delta napA$ en MD con nitrito 5 mM	73

Tabla A 11. Área bajo la curva de crecimiento de <i>E. coli</i> BW25113 y <i>E. coli</i> $\Delta nrfA$ en MD con nitrito 5 mM	74
Tabla A 12. Área bajo la curva de crecimiento de <i>E. coli</i> BW25113 y <i>E. coli</i> $\Delta nirB$ en MD con nitrito 5 mM	75
Tabla A 13. Área bajo la curva de crecimiento de <i>E. coli</i> BW25113 y <i>E. coli</i> $\Delta norR$ en MD con nitrato 25 mM	76
Tabla A 14. Área bajo la curva de crecimiento de <i>E. coli</i> BW25113 y <i>E. coli</i> $\Delta nsrR$ en MD con nitrato 25 mM	77
Tabla A 15. Área bajo la curva de crecimiento de <i>E. coli</i> BW25113 y <i>E. coli</i> $\Delta norR$ en MD (sin nitrato)	78
Tabla A 16. Área bajo la curva de crecimiento de <i>E. coli</i> BW25113 y <i>E. coli</i> $\Delta nsrR$ en MD (sin nitrato)	79
Tabla A 17. Área bajo la curva de crecimiento de <i>E. coli</i> BW25113 y <i>E. coli</i> $\Delta norV$ en MD con nitrato 25 mM	80
Tabla A 18. Área bajo la curva de crecimiento de <i>E. coli</i> BW25113 y <i>E. coli</i> Δhmp en MD con nitrato 25 mM	81
Tabla A 19. Área bajo la curva de crecimiento de <i>E. coli</i> BW25113 y <i>E. coli</i> Δhcp en MD con nitrato 25 mM	82
Tabla A 20. Área bajo la curva de crecimiento de <i>E. coli</i> BW25113 y <i>E. coli</i> $\Delta norV$ en MD (sin nitrato)	83
Tabla A 21. Área bajo la curva de crecimiento de <i>E. coli</i> BW25113 y <i>E. coli</i> Δhmp en MD (sin nitrato)	84
Tabla A 22. Área bajo la curva de crecimiento de <i>E. coli</i> BW25113 y <i>E. coli</i> Δhcp en MD (sin nitrato)	85

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema de los principales efectos del telurito en <i>E. coli</i>	4
Figura 2. Reacciones del nitrato y nitrito en <i>E. coli</i>	10
Figura 3. Modelo propuesto para los efectos de la enzima NRA y telurito en <i>E. coli</i>	19
Figura 4. Curva de calibración para determinar la concentración de nitrito en el equipo NOA 280i	30
Figura 5. Efecto del nitrato y telurito en el crecimiento de <i>E. coli</i> BW25113 en medio LB con telurito	32
Figura 6. Efecto del nitrato y telurito en el crecimiento de <i>E. coli</i> BW25113 en medio MD con telurito	35
Figura 7. Efecto del nitrato y telurito en el crecimiento de <i>E. coli</i> $\Delta napA$, $\Delta nrfA$ y $\Delta nirB$	38
Figura 8. Concentración de nitrito en sobrenadantes de cultivo de <i>E. coli</i> y medio MD	40
Figura 9. Efecto del telurito en la concentración de nitrito en sobrenadantes de cultivos de <i>E. coli</i>	41
Figura 10. Efecto del nitrito y telurito en el crecimiento de <i>E. coli</i> BW25113 en medio MD y LB	42
Figura 11. Efecto de nitrito y telurito en el crecimiento de <i>E. coli</i> $\Delta napA$, $\Delta nrfA$ y $\Delta nirB$ respecto a la cepa parental	43
Figura 12. Efecto del nitrato y telurito en el crecimiento de <i>E. coli</i> $\Delta nsrR$ o $\Delta norR$ respecto a la cepa parental	44
Figura 13. Efecto del nitrato y telurito en el crecimiento de <i>E. coli</i> $\Delta norV$, Δhmp o Δhcp respecto a la cepa parental	45

Figura 14. Esquema resumen de los efectos del nitrato y telurito sobre el crecimiento de *E. coli* 52

ANEXO

Figura A1. Concentración de nitrito en sobrenadantes de cultivos de *E. coli* 86

Lista de símbolos, abreviaturas y nomenclatura

ABC	Área bajo la curva
GSH	Glutación
Nap	Nitrato reductasa periplasmática
NO [•]	Óxido nítrico
NR A	Nitrato reductasa A
NR Z	Nitrato reductasa Z
O ₂ ^{•-}	Superóxido
OD ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
OH [•]	Hidroxilo (radical)
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RSH	Tiol reducido
Te ⁰	Teluro elemental
TeO ₃ ²⁻	Telurito
TR	Telurito reductasa

RESUMEN

El telurito es un compuesto tóxico para *Escherichia coli* que genera un aumento de las especies reactivas de oxígeno, protoporfirina IX y en general un desbalance en el metabolismo celular. Genes del metabolismo del nitrato son inducidos en presencia de telurito, lo que se ha relacionado con la contribución de la nitrato reductasa A (NR A) en la resistencia al tóxico. Sin embargo, no se ha estudiado la implicancia de esta vía –reducción de nitrato y nitrito– en la resistencia a telurito. A pesar de la contribución de NR A en la resistencia al tóxico, la reducción de nitrato a nitrito puede ser perjudicial dados los efectos deletéreos del nitrito para la célula, llevando a proponer que las enzimas responsables de disminuir sus niveles en el citoplasma también contribuyen a la resistencia a telurito. Se estudió el crecimiento de cepas mutantes en los genes *napA*, *nirB* y *nrfA* en medio MD con nitrato y se encontró que las dos primeras son más afectadas por el tóxico que la cepa control. Esto sugiere que la nitrato reductasa periplasmática y la nitrito reductasa del citoplasma contribuyen a la resistencia a telurito por disminución de los niveles de nitrito en el citoplasma. Concordante con ello, mutantes carentes de genes que especifican las nitrito reductasas (*nirB* y *nrfA*) son más sensibles a la adición conjunta de nitrito y telurito que la cepa control. Para el análisis de los resultados se utilizó el área bajo la curva de crecimiento de cada cultivo, ya que esta métrica refleja en un único valor el tamaño inicial de la población, la velocidad de crecimiento y el crecimiento máximo del cultivo. Además, y dada la capacidad del nitrito de generar óxido nítrico, las cepas mutantes en genes de la maquinaria celular de detoxificación del radical –*norR*, *norV* y *hmp*– también son más sensibles a telurito que la cepa control en medio MD con nitrato. Esto sugiere que la generación de óxido nítrico y especies reactivas de nitrógeno podrían subyacer la toxicidad del telurito en cultivos que crecen en presencia de nitrato.

ABSTRACT

Tellurite is a toxicant for *Escherichia coli* which generates increased reactive oxygen species, protoporphyrin IX and in general, an unbalance in cellular metabolism. Genes involved in nitrate metabolism are induced in the presence of tellurite, which has been related to the contribution of nitrate reductase A (NR A) to the toxicant resistance. However, the involvement of this pathway –nitrate and nitrite reduction– in tellurite resistance has not been studied. Despite the contribution of NR A to the toxicant resistance, reduction of nitrate to nitrite can be harmful given the dangerous effects of nitrite inside the cell, thus allowing the proposal that the cytoplasmic enzymes responsible for decreasing its levels also contribute to tellurite resistance. Growth of mutants *napA*, *nirB* and *nrfA* was studied using MD medium containing nitrate, *E. coli* $\Delta napA$ and $\Delta nirB$ were more affected by the toxicant than the control strain. This suggests that periplasmic nitrate reductase and cytoplasmic nitrite reductase contribute to tellurite resistance by decreasing nitrite levels in the cytoplasm. In support of this, mutants lacking genes encoding nitrite reductases (*nirB* and *nrfA*) are more sensitive than controls regarding the addition of nitrite and tellurite. Results were expressed as area under the growth curve, since this metric reflects in a single value the initial population size, growth rate and the maximum growth of the culture. In addition, and in accordance with the nitrite's ability to generate nitric oxide, mutants in the cellular detoxification machinery of the radical –*norR*, *norV* and *hmp*– were also more sensitive to tellurite than the control strain in MD medium containing nitrate; thus suggesting that nitric oxide and reactive nitrogen species generation could help tellurite toxicity in the presence of nitrate.

INTRODUCCIÓN

Telurito y especies reactivas de oxígeno

El telurio es un metaloide que pertenece al grupo 16 de la Tabla Periódica, al igual que elementos biológicamente relevantes como oxígeno, azufre y selenio. Se utiliza en la fabricación de celdas solares, dispositivos termoeléctricos y aleaciones metálicas, entre otras aplicaciones industriales (U.S. Geological Survey, 2016). El telurio no posee una función biológica conocida y en estado elemental (Te^0) no presenta efectos tóxicos aparentes, a diferencia de su derivado oxidado telurito (TeO_3^{2-}), que exhibe una elevada toxicidad (Ba et al., 2010). Las propiedades bactericidas del telurito fueron descritas en la primera mitad del siglo XX por Alexander Fleming (Fleming, 1932), y en comparación a otros metal(oid)es (e.g. mercurio, cromo, plata, cadmio, cobre), el telurito es al menos diez veces más tóxico para *Escherichia coli* (Harrison et al., 2004).

Los mecanismos que gobiernan la toxicidad del telurito aún no se conocen a cabalidad, pero se ha establecido que ésta se debe principalmente a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por *reactive oxygen species*) (Fig. 1: 2) a tal nivel que superan las defensas antioxidantes celulares, es decir, generando estrés oxidativo

en *E. coli* (Pérez et al., 2007; Tantaleán et al., 2003), *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (Tremaroli et al., 2007, 2009) y *Rhodobacter capsulatus* (Borsetti et al., 2005). Observaciones realizadas en bacterias expuestas a concentraciones subletales de telurito mostraron, en particular, un incremento en los niveles de superóxido ($O_2^{\cdot -}$) (Fig. 1: 3) (Calderón et al., 2006; Pérez et al., 2007). Esto dependería de la presencia de oxígeno, ya que en cultivos de *E. coli* anaeróbicos el telurito presenta una toxicidad disminuida (Avazeri et al., 1997; Rojas y Vásquez, 2005; Tantaleán et al., 2003). Además, el telurito causa un aumento en los niveles de radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y acumulación de protoporfirina IX, intermediario de la biosíntesis del grupo hemo (Morales et al., 2017). Considerando que las porfirinas pueden generar $O_2^{\cdot -}$ (Miyamoto et al., 1991; Vatansever et al., 2013), es posible que el aumento de este radical se deba al menos en parte a la acumulación de protoporfirina IX causada por telurito. Posteriormente el $O_2^{\cdot -}$ podría ser dismutado a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que al reaccionar con ion ferroso llevaría a un aumento de OH^{\cdot} (Chasteen et al., 2009).

Efecto del telurito en el metabolismo de *E. coli*

Entre los daños generados por exposición a telurito se ha descrito un incremento en la oxidación de proteínas (Fig. 1: 10) (Contreras y Vásquez, 2010; Pérez et al., 2007) y peroxidación de lípidos, dañando de este modo la integridad de la membrana bacteriana (Fig. 1: 11) (Pérez et al., 2007, 2008, Pradenas et al., 2012, 2013). Esto a su vez afecta el normal funcionamiento de la cadena transportadora de electrones en condiciones aeróbicas (Díaz-Vásquez et al., 2014). Además de verse afectados el ciclo de los ácidos tricarbónicos y la glicólisis (Fig. 1: 13), se ha observado que en células expuestas al tóxico disminuye la actividad de enzimas como

fosfofructoquinasa (PFK), piruvato quinasa (PK) (Valdivia-González et al., 2012), piruvato deshidrogenasa (PDH) (Castro et al., 2008), α -cetoglutarato deshidrogenasa (α KGDH) (Reinoso et al., 2012), isocitrato deshidrogenasa (ICDH) y glutamato deshidrogenasa (GDH) (Reinoso et al., 2013). Como consecuencia de ello se acumulan ciertos metabolitos como piruvato, α -cetoglutarato (Reinoso et al., 2012), isocitrato (Reinoso et al., 2013) y algunos azúcares fosforilados (Sandoval et al., 2011; Valdivia-González et al., 2012). También se ve alterada la vía de las pentosas fosfato (Fig. 1: 13) (Sandoval et al., 2011) y se observa una disminución en los niveles de ATP (Lohmeier-Vogel et al., 2004).

El telurito afecta también el metabolismo del NADH y NADPH, produciendo una disminución en los niveles de NADH y aumento en los niveles de NADPH, sin variar los niveles de NAD^+ y NADP^+ (Sandoval et al., 2011). Además de los efectos en el estado redox celular ya mencionados, el $\text{O}_2^{\cdot -}$ generado en presencia de telurito daña los centros [4Fe-4S] de enzimas como aconitasa B, fumarasa A (Fig. 1: 14, 15 y 16) (Calderón et al., 2009) y NDH-I (Díaz-Vásquez et al., 2015). Una consecuencia adicional del desmantelamiento de los centros [4Fe-4S], es que el hierro liberado puede generar radicales hidroxilo a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss (Fig. 1: 18) (Chasteen et al., 2009). En concordancia con lo anterior, la adición de un quelante de hierro a cultivos con telurito aumenta la viabilidad celular; además, se produce una disminución de los niveles de hierro en presencia del tóxico, posiblemente como una respuesta defensiva de la célula (Fig.1 :17) (Morales et al., 2017).

Paralelamente, en presencia de telurito se induce la actividad superóxido dismutasa (SOD) (Aradská et al., 2013; Borsetti et al., 2005; Pérez et al., 2007;

Tremaroli et al., 2007), con lo que el $O_2^{\cdot-}$ es dismutado a H_2O_2 (Fig. 1: 19), que a su vez es posteriormente descompuesto por la catalasa a H_2O y O_2 (Fig. 1: 20). En concordancia, cepas de *E. coli* mutantes en las enzimas correspondientes, *sodAB* o *katG*, son más sensibles a telurito (Calderón et al., 2006; Tantaleán et al., 2003). En su conjunto, estos antecedentes indican que el abatimiento eficaz de ROS aumenta la resistencia a telurito en bacterias.

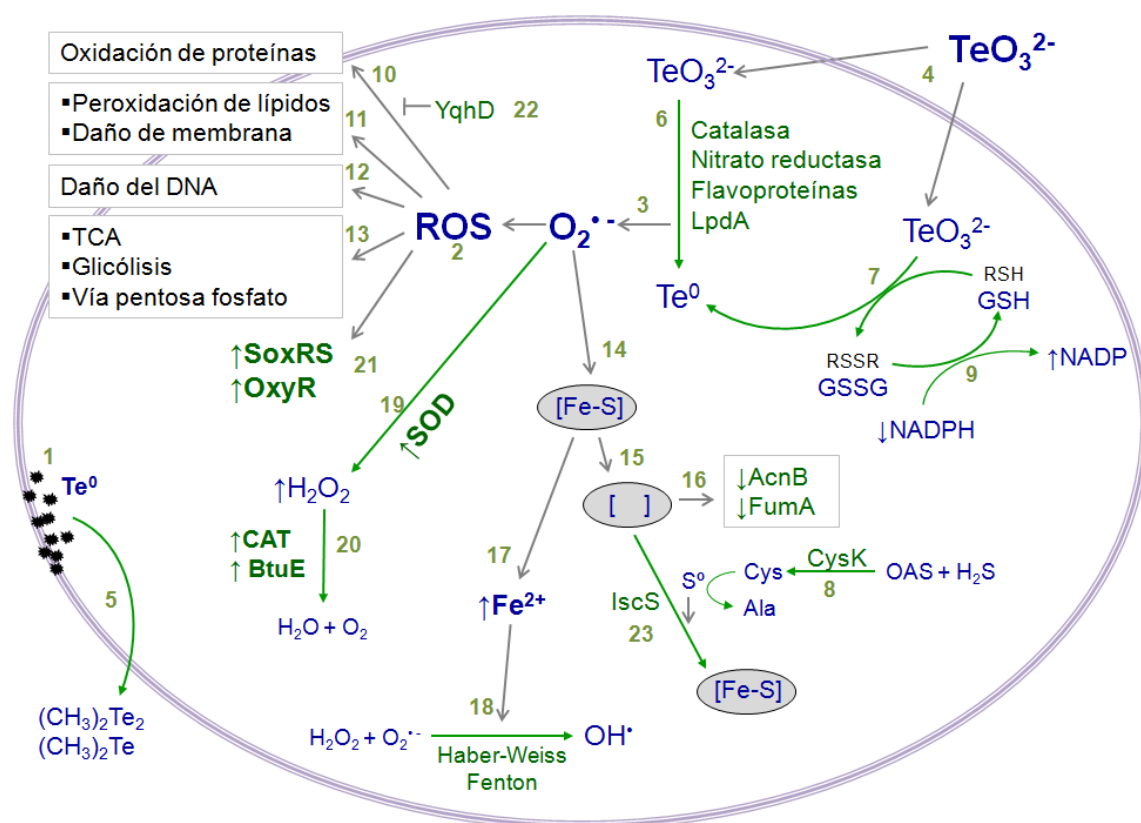


Figura 1. Esquema de los principales efectos del telurito en *E. coli*. La descripción de cada etapa se detalla en el texto.

Otra respuesta al telurito es la inducción de los regulones SoxRS y OxyR (Calderón et al., 2009; Pérez et al., 2007), relacionados con la respuesta a estrés oxidativo (Fig. 1: 21) y otros genes pertenecientes a la maquinaria antioxidante celular,

como los que codifican para catalasa (*katG*), superóxido dismutasa (*sodA*, *sodB*), fumarasa C (*fumC*), aconitasa A (*acnA*), glutatión peroxidasa (*btuE*) y aldehído reductasa/oxidoreductasa (*yqhD*, involucrada en la protección contra la peroxidación de lípidos) (Arenas et al., 2010; Calderón et al., 2009; Pérez et al., 2007, 2008). En concordancia, se ha descrito que los niveles de proteínas y actividad de las enzimas antioxidantes SOD, KatG e YqhD se ven aumentados en *E. coli* expuesta a telurito (Fig. 1: 19, 20 y 22) (Aradská et al., 2013; Pérez et al., 2007).

Análisis de microarreglos de DNA mostraron que frente a telurito se gatilla la expresión de un grupo de genes que se inducen en anaerobiosis y se reprime la expresión de genes del metabolismo oxidativo (Molina-Quiroz et al., 2014). Por otra parte, un análisis proteómico de *E. coli* expuesta a telurito mostró un incremento en los niveles de proteínas de shock térmico y chaperonas (Aradská et al., 2013), como la cisteína desulfurasa IscS, que participa en la reconstitución de centros de [4Fe-4S] dañados por efecto del telurito (Fig. 1: 23) (Fuentes et al., 2007; Tantaleán et al., 2003), la proteína de plegamiento GroEL, también relacionada con la respuesta a estrés, DnaK, factor de respuesta a estrés en bacterias y el factor de elongación EF-Tu, que exhibe una función tipo chaperona en el plegamiento de proteínas durante el estrés térmico (Aradská et al., 2013).

Reducción y resistencia a telurito

Se ha observado que al reducir telurito a Te^0 , se generan depósitos negros que pueden ubicarse dentro o fuera de las células en cultivos de bacterias como

Enterococcus faecalis (Tucker et al., 1962), *Bacillus subtilis* (van Iterson y Leene, 1964a), *Proteus vulgaris* (van Iterson y Leene, 1964b), *Enterococcus faecium* (Tucker et al., 1966), *E. coli* (Summers y Jacoby, 1977), *Rhodobacter sphaeroides* (Moore y Kaplan, 1992), *Pseudomonas aeruginosa*, *Agrobacterium tumefaciens* (Trutko et al., 2000), *Shewanella oneidensis* (Klonowska et al., 2005), *Bacillus beveridgei* y *Sulfospirillum barnesii* (Baesman et al., 2007, 2009) (Fig. 1: 1). A pesar que muchas bacterias naturalmente resistentes al tóxico presentan dicha capacidad, la reducción y la resistencia a telurito no son siempre fenómenos asociados. Se ha observado reducción de telurito en cepas sensibles (e.g. *E. coli*) (Summers y Jacoby, 1977; Trutko et al., 2000) y también se han descrito cepas resistentes que no producen depósitos de Te^0 (Yurkov et al., 1996).

Otro factor relevante es la capacidad del telurito de ingresar a la célula. Se ha descrito un aumento de la resistencia a telurito en *E. coli* y *Lactococcus lactis* mutantes en transportadores de fosfato (Elías et al., 2012; Tomás y Kay, 1986; Turner et al., 2007), que son los principales mediadores del ingreso del tóxico a la célula (Fig. 1: 4) (Elías et al., 2012; Tomás y Kay, 1986).

Dentro de la célula, la reducción de telurito a Te^0 es catalizada por oxidoreductasas con diferentes funciones biológicas que exhiben también actividad telurito reductasa (TR) (Fig. 1: 6) en un proceso que requiere NAD(P)H, aunque se debe considerar que los niveles de actividad TR son muy variables (Castro et al., 2008), así como también la relevancia biológica y biotecnológica de esta actividad. Por ejemplo, la sobreproducción de nitrato reductasa A de *E. coli* aumenta la resistencia a

telurito tanto de cultivos aeróbicos como anaeróbicos de la bacteria (Avazeri et al., 1997). También el complejo de la piruvato deshidrogenasa de *Aeromonas caviae* (Castro et al., 2009) y catalasa de *Staphylococcus epidermidis* (Calderón et al., 2006) aumentan la resistencia a telurito en *E. coli*, lo que se atribuye a la actividad TR de estas enzimas.

Algunos tioles celulares reducidos (RSH) como glutatión (GSH), reducen telurito a Te^0 y resultan oxidados en el proceso (Fig. 1: 7) (Spallholz, 1994; Taylor, 1999; Tremaroli et al., 2007, 2009, Turner et al., 1995, 1999, 2001), lo que explicaría la disminución en los niveles de RSH de cultivos tratados (Morales et al., 2017). Además, se ha descrito que la generación de glutatión reducido también está involucrada en la resistencia a telurito (Fig. 1: 9) (Tremaroli et al., 2009; Turner et al., 1995, 2001). Asimismo, las vías relacionadas con la síntesis de cisteína están involucradas en la resistencia a telurito en *R. sphaeroides* (Fig. 1: 8) (O’Gara et al., 1997), *E. coli* (Alonso et al., 2000; Fuentes et al., 2007), *Geobacillus stearothermophilus* (Fuentes et al., 2007; Vásquez et al., 2001) y *S. aureus* (Lithgow et al., 2004). Al igual que para la reducción enzimática, se puede inferir que estos efectos se deben a la reducción del telurito, pero no se puede descartar que hayan otras vías involucradas, como la participación de tioles reducidos en la protección contra OH^\bullet (Vatansever et al., 2013).

Se ha evidenciado que la reducción de telurito ocurre concomitantemente con la formación de ROS, que provocan daño celular a diferentes niveles (Fig. 1: 2, 10, 11, 12 y 13) (Borsetti et al., 2005; Calderón et al., 2006; Pérez et al., 2007, 2008; Tremaroli et al., 2007). Por ejemplo, la catalasa reduce telurito formando Te^0 y $\text{O}_2^{\bullet -}$ en una

reacción dependiente de NAD(P)H en condiciones aeróbicas (Calderón et al., 2006). Si bien esta enzima confiere resistencia a telurito, como se mencionó previamente, una cepa de *E. coli* resistente al tóxico presenta menor actividad catalasa que una cepa control (Morales et al., 2017). Esto conduce a la pregunta aún no resuelta de cómo la reducción del telurito puede estar involucrada en la toxicidad así como en la resistencia al tóxico.

Nitrato reductasa A y resistencia a telurito

Entre los genes que se inducen por exposición a telurito se encuentra los que codifican para la nitrato reductasa A (NR A) (Molina-Quiroz et al., 2014). Esta es una enzima del metabolismo anaeróbico de *E. coli* que posee además actividad TR dependiente de nitrato (Avazeri et al., 1997). En *E. coli* se determinó que en ausencia de los genes que codifican para las nitrato reductasas de membrana no es posible detectar reducción de telurito (Avazeri et al., 1997). *E. coli* posee dos nitrato reductasas en la membrana interna, NR A, ya mencionada, y nitrato reductasa Z que a pesar de mostrar actividad TR no contribuye –como sí lo hace NR A– a la resistencia al tóxico en condiciones aeróbicas (Avazeri et al., 1997). La participación de NR A en la resistencia al tóxico se atribuye a la capacidad de reducir telurito a su estado elemental, aunque –como se describió previamente– no es la única enzima responsable de la reducción del tóxico en la bacteria (Avazeri et al., 1997). Un aspecto no abordado en este estudio es en qué medida la presencia de nitrato afecta la reducción y resistencia a telurito, ni las posibles consecuencias de la reducción de nitrato en condiciones aeróbicas.

Interesantemente, en condiciones anaeróbicas la ausencia de NR A y Z no

cambian la concentración inhibitoria mínima de telurito, a diferencia de la disminución que se observó en condiciones aeróbicas (Avazeri et al., 1997; Turner et al., 1995). Sin embargo, al inducir la expresión de NR A se observa un aumento en la resistencia al tóxico independiente de la atmósfera utilizada (Avazeri et al., 1997).

Reducción de nitrato en *E. coli*

Las dos nitrato reductasas de la membrana interna de *E. coli*, NR A y NR Z catalizan la reducción de nitrato a nitrito en el citoplasma (Figura 2), lo que se denomina reducción desasimilatoria de nitrato debido a que éste es usado como aceptor de electrones alternativo (Bonney y Demoss, 1994). El nitrito, que es tóxico para la bacteria, es reducido a amonio por NirB y también es exportado fuera de la célula (Wang y Gunsalus, 2000). Las enzimas NR A y NirB se expresan principalmente en condiciones anaeróbicas y cuando hay nitrato presente, que es utilizado como aceptor final de electrones (Unden y Bongaerts, 1997; Wang y Gunsalus, 2000). NRA está codificada en el operón *narGHJI* y está formada por tres subunidades, α , β y γ codificadas por *narG*, *narH* y *narI*, respectivamente. La primera contiene el sitio catalítico para la reducción de nitrato y utiliza un cofactor que contiene molibdeno. Las otras subunidades permiten la transferencia de electrones provenientes de la oxidación de quinoles y contienen centros de hierro-azufre y hemo (Bonney y Demoss, 1994). El operón codifica además para NarJ, chaperona encargada de la incorporación de molibdeno, esencial para la actividad de la enzima (Vergnes et al., 2004). Por su parte, NR Z está codificada en el operón *narZVWY*, homólogo al que codifica para NR A, lo que permite la formación de enzimas funcionales con subunidades provenientes de ambas isoenzimas (Blasco et al., 1992a, 1992b). A diferencia de NR A, NR Z se

produce constitutivamente en bajas cantidades, independiente de la presencia nitrato y es reprimida en anaerobiosis (Iobbi-Nivol et al., 1990). Se ha propuesto que su función es facilitar la transición desde el crecimiento aeróbico a anaeróbico (Bonney y Demoss, 1994; Cole, 1996). NirB es una enzima citoplasmática codificada en el operón *nirBDC*, conformada por dos subunidades, posee sirohemo, FAD y utiliza NADH (Harborne et al., 1992). Su expresión es inducida por nitrito, pero de forma menos efectiva que la inducción por nitrato (Wang y Gunsalus, 2000).

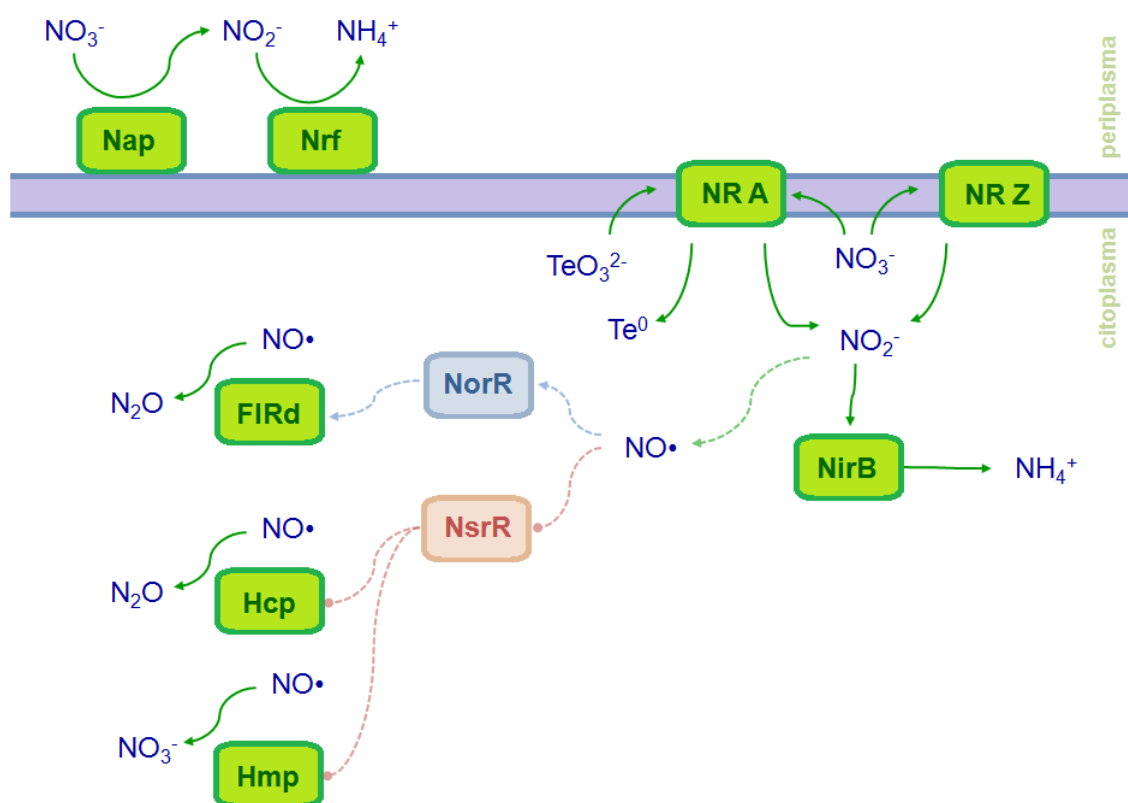


Figura 2. Reacciones del nitrato y nitrito en *E. coli*.

El periplasma de *E. coli* contiene una nitrato y una nitrito reductasa, denominadas Nap y Nrf, respectivamente. La nitrato reductasa del periplasma realiza la

reducción de nitrato cuando éste se encuentra en bajas concentraciones, en lugar de la enzima NR A (Potter et al., 1999; Stewart et al., 2002; Wang et al., 1999). En concordancia, la expresión de los genes que la codifican se inducen a baja concentración de nitrato y se reprimen cuando ésta aumenta (Stewart et al., 2002; Wang et al., 1999). La expresión de la nitrito reductasa periplasmática es regulada del mismo modo por la concentración de nitrato (Wang y Gunsalus, 2000), y ambas enzimas se inducen en condiciones anaeróbicas (Cole, 1996; Grove et al., 1996; Page et al., 1990). La presencia de nitrito no tiene efecto en la inducción de los genes que codifican para Nap, y su efecto es mucho menor al del nitrato para la expresión de Nrf (Wang et al., 1999; Wang y Gunsalus, 2000).

La comprensión del rol que cumplen las diversas nitrato y nitrito reductasas en la fisiología de *E. coli* ha sido posible por la complementación de herramientas de biología molecular con el análisis del crecimiento de cultivos, lo que ha permitido también dilucidar los complejos mecanismos de regulación de esta vía (Potter et al., 1999; Stewart et al., 2002; Wang y Gunsalus, 2000). Por otra parte, en los últimos años se ha propuesto que la reducción de nitrato tendría relevancia en la interacción humano-bacteria por la vía nitrato - nitrito - óxido nítrico (Lundberg et al., 2008; Tiso y Schechter, 2015), lo que podría constituir una función aun no explorada de estas enzimas en la adaptación de *E. coli* a su ambiente.

Óxido nítrico y estrés nitrosativo

El estrés nitrosativo se produce cuando hay un desequilibrio entre las especies reactivas de nitrógeno y la capacidad celular para detoxificarlas o para reparar los

daños que producen. La principal especie reactiva de nitrógeno (RNS, por *reactive nitrogen species*) es el NO^\bullet y aun cuando su toxicidad es menor que la de otros radicales libres (Bartberger et al., 2002), es la primera RNS en formarse y puede llevar a la generación de otras RNS como el altamente tóxico peroxinitrito (ONOO^-) por combinación con $\text{O}_2^{\bullet -}$ (Zhu et al., 1992). La toxicidad del NO^\bullet y RNS para las bacterias ha sido especialmente estudiada en macrófagos. El NO^\bullet generado por la NOS inducible (iNOS o NOS2) en macrófagos activados, junto con ROS, es parte de los mecanismos de defensa de la célula contra patógenos (Bowman et al., 2011; Nathan y Shiloh, 2000).

En concordancia, se ha probado que la capacidad de reducir NO^\bullet es importante para la patogénesis de algunas bacterias (Loisel-Meyer et al., 2006; Stevanin et al., 2005). La toxicidad del NO^\bullet es potenciada por O_2 , H_2O_2 y otras ROS (Hughes, 2008; Pacelli et al., 1995; Woodmansee y Imlay, 2003). Sin embargo, no es claro si la acción de NO^\bullet y ROS en el sistema inmune sería principalmente sinérgica o secuencial (Fang, 2004). El complejo NADPH-oxidasa se encarga de producir $\text{O}_2^{\bullet -}$ en fagocitos y es llamativo que iNOS, además de NO^\bullet , genere $\text{O}_2^{\bullet -}$ (Xia y Zweier, 1997); esta actividad enzimática y la consecuente formación de ONOO^- sería parte de los mecanismos de defensa de macrófagos (Xia, 2007). La capacidad del NO^\bullet y ONOO^- de cruzar membranas por difusión o transportadores, respectivamente, les permite ser agentes tóxicos extracelulares aun cuando su potencia está limitada por múltiples factores (Prolo et al., 2014, 2015), a diferencia de lo que sucede en fagosomas donde la distancia entre la fuente y el blanco es mínima. La producción de NO^\bullet y $\text{O}_2^{\bullet -}$ por macrófagos puede llevar además a la formación de otros intermediarios como dióxido de nitrógeno (NO_2^\bullet), hidroxilo (OH^\bullet), trióxido de dinitrógeno, complejos dinitrosil hierro,

nitrosotioles y nitroxilo (Fang, 2004), lo que resulta en una reactividad hacia un amplio espectro de blancos celulares.

El NO^\bullet y sus derivados actúan como agentes nitrosantes y su reactividad depende del ambiente redox local (De Groote et al., 1995). Las RNS pueden actuar sobre proteínas y específicamente sobre tioles, hierro de hemoproteínas, centros Fe-S, aminas y tirosinas (Bryan y Grisham, 2007; Stamler, 1994; Stamler et al., 1992). Las proteínas con centros de hierro azufre son un importante blanco del NO^\bullet , que reacciona con ellos para formar complejos dinitrosil-hierro (Landry et al., 2011), inactivando enzimas como aconitasa y fumarasa (Gardner et al., 1997; Woodmansee y Imlay, 2003). Se ha mostrado un aumento en tioles nitrosilados (RSNO) por exposición a NO^\bullet (Gaston et al., 1993), lo que sería mediado por la formación de complejos dinitrosil-hierro (Bosworth et al., 2009). Esto explicaría la disminución de los niveles de GSH de *E. coli* expuesta a NO^\bullet (Pacelli et al., 1995). Además, el ONOO^- formado por la reacción entre NO^\bullet y $\text{O}_2^{\bullet -}$, puede generar ácidos grasos nitrosilados (Hogg y Kalyanaraman, 1999; Moroz y Kohn, 2011), lo que aún no se ha comprobado en procariontes. A nivel de DNA, las RNS pueden provocar modificaciones químicas de las bases nitrogenadas (Burney et al., 1999) y aumentar la frecuencia de mutagénesis en *E. coli* (Schouten y Weiss, 1999; Weiss, 2006; Woodmansee y Imlay, 2003). En particular, el NO^\bullet generado por respiración del NO_3^- , genera mutaciones en cultivos anaeróbicos que son expuestos a O_2 (Weiss, 2006). Esto también podría ocurrir en hipoxia u otra condición en que exista O_2 y expresión de las enzimas nitrato y nitrito reductasa. Algunos derivados del NO^\bullet pueden producir la ruptura de la doble hebra de DNA (Chazotte-Aubert et al., 1999; Pacelli et al., 1995; Schapiro et al., 2003; Woodmansee y Imlay, 2003) e inducir el sistema SOS (Lobysheva et al., 1999), que también es inducido por

NO[•] (Schapiro et al., 2003). Se ha propuesto también que las RNS inhiben proteínas que participan en la replicación del DNA (Roy et al., 1995; Schapiro et al., 2003). Finalmente, hay antecedentes del efecto inhibitorio del NO[•] sobre la respiración bacteriana y mitocondrial (Brown, 1999; Pacelli et al., 1995; Stevanin et al., 2000).

Defensa contra el estrés nitrosativo

NsrR y NorR son reguladores transcripcionales de *E. coli* que sensan niveles de NO[•] (Bodenmiller y Spiro, 2006; D'Autréaux et al., 2005). NsrR posee un centro [2Fe-2S] sensible a NO[•], pero estable frente al O₂ atmosférico; la reacción con NO[•] impide la unión específica a DNA (Tucker et al., 2008). NorR en cambio, posee un centro de hierro que al unir NO[•] activa la transcripción (D'Autréaux et al., 2005). Otros reguladores transcripcionales como Fnr, SoxR, OxyR y Fur podrían responder a NO[•] (Cruz-Ramos et al., 2002; D'Autreaux et al., 2002; Ding y Demple, 2000; Hausladen et al., 1996). SoxR y OxyR funcionan primariamente como sensores de ROS vía centros hierro-azufre y tioles, respectivamente. En ciertas condiciones, éstos también reaccionan con RNS, lo que podría gatillar mecanismos compartidos de defensa antioxidante y antinitrosativa (Fang, 2004; Vázquez-Torres, 2012). En *E. coli* crecida en anaerobiosis y nitrato, OxyR sufre S-nitrosilación y de esta manera induce la expresión de un regulón diferente al inducido en su condición oxidada, que controla la S-nitrosilación de otras proteínas y permite el crecimiento en estas condiciones (Seth et al., 2012). Otro estudio en la misma bacteria señala que en cultivos aeróbicos en medio rico, NorR y Fur serían más importantes para la regulación de la expresión de genes que SoxR y OxyR (Mukhopadhyay et al., 2004). Sin embargo, aún se requieren más antecedentes en relación a la relevancia fisiológica de estos factores

transcripcionales en respuesta a RNS, y de los respectivos regulones que estarían siendo controlados.

NorR es un activador transcripcional dependiente de σ^{54} que en *E. coli* regula la expresión de los genes *norV* y *norW* (Hutchings et al., 2002). Estos a su vez codifican para la enzima flavorubredoxina y su reductasa, respectivamente FIRd (NorV) y NorW, y que como se detalla más adelante pueden reducir NO[•]. Existen homólogos de NorR en *P. aeruginosa* y *Ralstonia eutropha* que regulan la expresión de genes que codifican para enzimas que también utilizan NO[•] (Spiro, 2007). No se ha demostrado si otros genes, además de *norV* y *norW*, podrían estar bajo el control de NorR en *E. coli* (Mukhopadhyay et al., 2004; Pullan et al., 2007).

NsrR, también denominado YjeB en *E. coli*, controla la expresión de genes como *hmp*, *hcp* y *nrfA* (Bodenmiller y Spiro, 2006; Filenko et al., 2007), que codifican para enzimas que destoxifican NO[•]. Los otros genes bajo el control de este represor transcripcional (Bodenmiller y Spiro, 2006; Filenko et al., 2007; Partridge et al., 2009) aún están siendo estudiados. Algunos de ellos se relacionan con la reparación de centros de hierro-azufre (Justino et al., 2007) y motilidad (Partridge et al., 2009). Otros codifican para proteínas de función desconocida o que no han sido caracterizadas, pero que también están bajo el control de reguladores que responden a oxígeno y nitrato como Fnr, NarL y NarP (Spiro, 2007; Tucker et al., 2010).

Interesantemente, la expresión de ciertos genes que se han relacionado con resistencia a telurito es regulada por NO[•] y otras RNS. Los genes putativos de resistencia a telurito *yeaR* y *tehA* son inducidos por nitrato en anaerobiosis (Seth et al.,

2012), y por exposición a S-nitrosoglutatión (GSNO) (Jarboe et al., 2008), siendo *tehA* además regulado por NsrR (Partridge et al., 2009). Otro gen de función desconocida, *gutS* (o *tsgA*), que es inducido por telurito y selenito (Guzzo y Dubow, 2000), se encuentra codificado río arriba del operón *nirBDC* y es regulado por NsrR (Partridge et al., 2009).

Enzimas como la flavohemoglobina Hmp y la proteína flavo-dihierro FIRd están encargadas de degradar NO[•] a amonio, óxido nitroso, nitrato u otros compuestos en diversas bacterias (Bang et al., 2006; Zumft, 2005). En particular, *E. coli* posee cuatro enzimas destoxicantes de NO[•] (Poole, 2005; Wang et al., 2016): citocromo c nitrito reductasa (NrfA), óxido nítrico dioxigenasa (Hmp), flavorubredoxina (FIRd, codificada por el gen *norV*) y proteína de centro híbrido (*hybrid cluster protein*, Hcp) (Figura 2). Estas dependen principalmente de NADH y se ha propuesto que su actividad no es redundante, sino que complementaria, donde cada una actúa en condiciones determinadas (Wang et al., 2016). Como se mencionó previamente, NrfA es una enzima periplasmática que además de reducir nitrito tiene alta actividad NO[•] reductasa (Poock et al., 2002; van Wonderen et al., 2008). Aunque se ha cuestionado el aporte de esta enzima a la reducción *in vivo* de NO[•] (Vine y Cole, 2011), mutantes carentes del gen correspondiente presentan menor resistencia a NO[•] en condiciones anaeróbicas, indicando que NrfA sí contribuye a la destoxicación de NO[•] en *E. coli* (Poock et al., 2002). Considerando que la enzima posee actividad catalítica pero baja afinidad por NO[•], se ha sugerido que el principal rol de esta enzima es la destoxicación de NO[•] exógeno cuando éste se encuentra en altas concentraciones (Wang et al., 2016). Además, se han sugerido otros sistemas de reducción de NO[•] (Butler et al., 2002; Vine y Cole, 2011; Zumft, 2005), pero su importancia no ha sido definida.

Hmp actúa principalmente como una dioxigenasa, generando NO_3^- en condiciones aeróbicas (Figura 2) (Gardner, 2005; Gardner et al., 1998; Gardner y Gardner, 2002; Hausladen et al., 1998). La importancia de esta enzima para la destoxificación de NO^* en *E. coli* se ha evidenciado en cepas mutantes en *hmp*, en las que se observa un consumo de NO^* reducido y una fuerte inhibición del crecimiento por exposición al tóxico (Gardner et al., 1998; Gardner y Gardner, 2002; Hausladen et al., 1998). Su participación no es clara en condiciones anaeróbicas: ensayos *in vitro* muestran que la enzima puede generar N_2O (Hausladen et al., 1998; Kim et al., 1999), pero es menos eficiente en el consumo de NO^* que en presencia de oxígeno (Gardner y Gardner, 2002; Hausladen et al., 1998; Kim et al., 1999). Se ha descrito que la enzima se expresa en anaerobiosis alcanzando un máximo nivel de proteína a los 45 min tras la exposición a NO^* (Justino et al., 2005). En estas condiciones, su aporte a la resistencia a NO^* es bajo ya que una mutante *hmp* es más sensible que la cepa parental cuando es expuesta a 960 ppm de NO^* (Gardner et al., 1998), lo que no ocurre si se expone a la mitad de esta concentración (Gardner y Gardner, 2002) o se modifican ciertas condiciones experimentales (Justino et al., 2005; Vine y Cole, 2011).

FIRd y su reductasa (NorW) tendrían como función abatir el NO^* bajo condiciones anaeróbicas produciendo N_2O (Figura 2) (Gardner et al., 2002; Gomes et al., 2002). Cultivos anaeróbicos de *E. coli* mutantes en *norV*, en medio mínimo y expuestos a NO^* exhiben inhibición del crecimiento, a diferencia de la cepa parental que crece normalmente (Gardner et al., 2002). Asimismo, el crecimiento de cultivos anaeróbicos de cepas mutantes en *norVW* o *norR* es inhibido por el agente generador de estrés nitrosativo nitroprusiato de sodio (Hutchings et al., 2002). Sin embargo, existe controversia ya que también se ha visto un crecimiento normal en mutantes *norV*

expuestas a NO[•], lo que podría estar dado por diferencias en la disponibilidad de nutrientes, los niveles de nitrito y nitrato, u otras condiciones experimentales (Gardner et al., 2002; Justino et al., 2005; Vine y Cole, 2011). La expresión de *norV* también se induce en condiciones aeróbicas por exposición a NO[•], lo que no incide en su resistencia al tóxico (Hutchings et al., 2002) ni en el consumo de NO[•] (Gardner y Gardner, 2002).

También se han obtenido interesantes hallazgos en mutantes dobles *hmp norV* de *E. coli*. En condiciones microaeróbicas, la exposición a NO[•] produce inhibición del crecimiento de la doble mutante, mientras que las mutantes simples y la cepa parental no son afectadas (Gardner et al., 2002). Otro estudio muestra que en ausencia de oxígeno la cepa parental y mutantes simples son afectadas de manera similar por concentraciones crecientes de NO[•], mientras que la doble mutante muestra una mayor inhibición del crecimiento (Justino et al., 2005).

Hcp ha sido recientemente caracterizada como reductasa de NO[•] en *E. coli* (Wang et al., 2016). Esta enzima posee un centro metálico único [4Fe-2O-2S] y un centro [2Fe-2S] (Aragão et al., 2008; Arendsen et al., 1998; van den Berg et al., 2000; Pereira et al., 1999). Es codificada por el gen *hcp*, cuya expresión se induce en condiciones anaeróbicas y de estrés nitrosativo, por FNR y NsrR respectivamente (van den Berg et al., 2000; Filenko et al., 2005). Hcp reduce NO[•] a N₂O cuando el tóxico se encuentra en concentraciones fisiológicas (a diferencia de FIRd y NrfA) (Wang et al., 2016). Hcp es reducida por Hcr, oxidoreductasa dependiente de NADH (van den Berg et al., 2000). Aunque Hcp no depende de Hcr para su actividad, hay antecedentes que Hcr la protege del daño por NO[•] (Wang et al., 2016). Sin embargo, Hcp es inactivada a

concentraciones muy elevadas del tóxico, por lo que su actividad es complementaria a la de otras enzimas destoxicantes de NO^\bullet (Wang et al., 2016).

Resistencia a telurito y reducción de nitrato

Se podría suponer que en presencia de nitrato y telurito la enzima NR A -que contribuye a la resistencia reduciendo el tóxico- también catalice la reducción de nitrato con la consiguiente formación de nitrito. Si se acumula nitrito, teóricamente debiese haber formación de NO^\bullet , que en conjunto con la producción de ROS causada por telurito podría resultar en la formación de RNS y por lo tanto, en una mayor toxicidad (Figura 3). De este modo, se podría esperar que en presencia de telurito la adición de nitrato genere una mayor toxicidad para la célula. También pudiese ocurrir que en

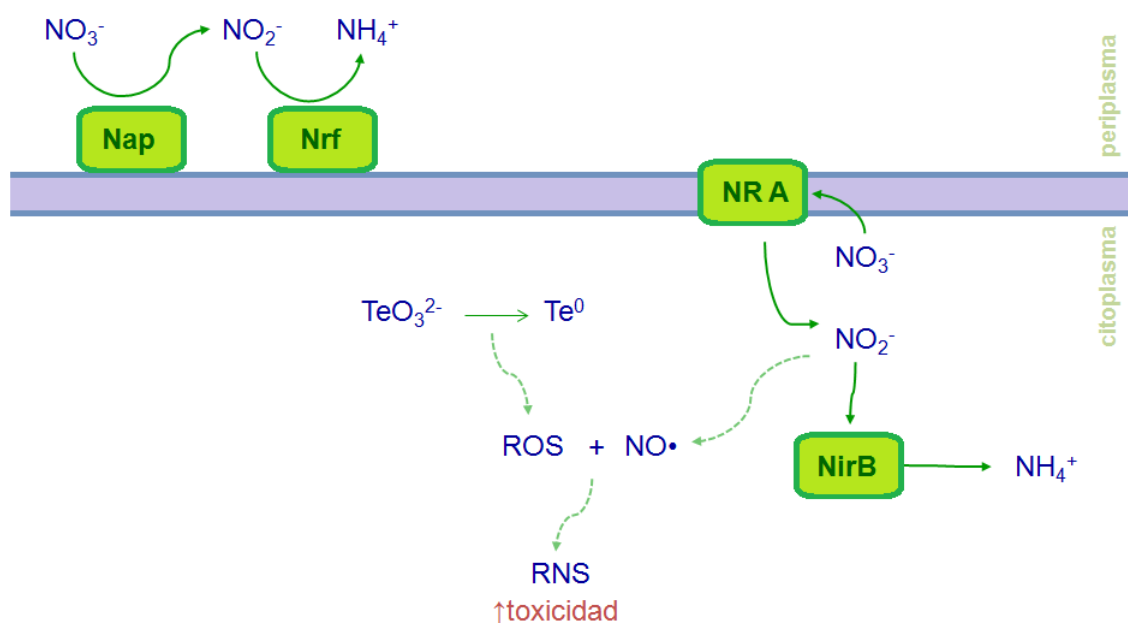


Figura 3. Modelo propuesto para los efectos de la enzima NR A y telurito en *E. coli*.

presencia de ambos compuestos participen otras nitrato reductasas como NR Z y Nap, nitrito reductasas NirB y Nrf, y el sistema de defensa contra óxido nítrico (conformado por los reguladores transcripcionales NsrR, NorR y las enzimas FIRd, Hmp y Hcp), que en conjunto contribuirían a la resistencia al tóxico; esto podría ocurrir aun en condiciones aeróbicas, las que normalmente inhiben su expresión.

Análisis del crecimiento bacteriano y área bajo la curva

Para determinar en qué medida las enzimas de interés contribuyen a la resistencia telurito, se requiere evaluar su participación en el contexto celular. Para ello se puede analizar el crecimiento de cultivos de cepas carentes de cada gen que codifica para enzimas del metabolismo del nitrato y nitrito. Aunque de este modo no es factible determinar cambios en las vías de reacciones enzimáticas ni en los niveles de metabolitos, sí se puede determinar en qué medida la ausencia de una enzima particular afecta el desempeño celular en el cultivo expuesto al tóxico.

El modelamiento matemático del crecimiento de poblaciones ha sido ampliamente estudiado, existiendo variadas alternativas y ajustes que permiten obtener descriptores cuantitativos de los sistemas y finalmente comprender sus dinámicas (Rockwood, 2015). Poblaciones de una sola especie cultivadas en laboratorio, como levaduras, diatomeas, *Paramecium caudatum*, *Drosophila* y escarabajos de grano presentan curvas de crecimiento logísticas (Rockwood, 2015), modelamiento que también se aplica al presente estudio (ver más adelante, sección Materiales y Métodos). La ecuación logística fue formulada por el matemático francés Verhulst en la primera mitad del siglo XIX (Vogels et al., 1975), pero comenzó a aplicarse a

poblaciones biológicas después de su re-descubrimiento por Pearl y Reed (Pearl y Reed, 1920). Un trabajo posterior de Pearl promovió su aplicación a una variedad de poblaciones biológicas (Pearl, 1927). La función logística es un refinamiento del crecimiento exponencial para el crecimiento de una magnitud, y su gráfica presenta forma de “S”. Cabe mencionar que una versión simple de la función logística corresponde a una función sigmoidea.

Los parámetros que caracterizan a una curva logística son: el tamaño inicial de la población (N_0), la capacidad de carga (K), es decir la máxima población posible en un ambiente particular, y la velocidad de crecimiento intrínseca de la población (r), que es la velocidad de crecimiento que podría ocurrir si no hubiese imposición de restricciones en el tamaño total de la población (Rockwood, 2015).

Las técnicas para el análisis de datos, así como para la medición de los cultivos, han cambiado históricamente desde métodos puramente manuales a métodos automatizados. El uso de lectores de placa permite el monitoreo simultáneo de decenas y hasta cientos de cultivos, generando un elevado número de datos. Para su análisis, la implementación de herramientas computacionales ha permitido reducir el tiempo requerido para el cálculo de los parámetros de crecimiento. Para el caso del crecimiento bacteriano existen programas como *GrowthRates* (Hall et al., 2014) y paquetes como *Grofit* (Kahm et al., 2010) y *Growthcurver* (Sprouffske y Wagner, 2016). Los dos últimos ajustan los datos a una función logística y se diferencian principalmente en los tipos y formatos de los datos de entrada y salida, y en las opciones modificables por el usuario.

En este trabajo se utilizó el paquete de R *Growthcurver* (Sprouffske y Wagner, 2016) para el ajuste de los datos a la forma estándar de la función logística. Este entrega los parámetros capacidad de carga (K), velocidad de crecimiento intrínseca (r) y tamaño inicial de la población (N_0) para los datos de la curva de crecimiento. Además calcula el tiempo generacional y el área bajo la curva logística (ABC), entre otros (Rockwood, 2015; Sprouffske y Wagner, 2016). *Growthcurver* cuenta con una Licencia Pública General GNU, está disponible para su instalación desde CRAN y Github, fue publicado en una revista con revisión de pares y acceso abierto, y cuenta con un esquema (tutorial) en línea (Sprouffske y Wagner, 2016). Cabe mencionar que R es un sistema para gráficas y estadística computacional, que incluye un lenguaje y un ambiente de programación; fue liberado en Agosto de 1993 y también se encuentra bajo Licencia Pública General GNU (Hornik, 2018; R Development Core Team, 2008).

Entre las publicaciones en que se ha utilizado *Growthcurver* se encuentra un estudio de evolución de *E. coli in vitro* donde se determinó la diferencia entre las velocidades de crecimiento de las cepas resultantes respecto a las parentales (Sprouffske et al., 2018); el mismo parámetro se determinó en un estudio de inestabilidad cromosomal de *Zymoseptoria ardabiliae* para comparar el crecimiento *in vitro* de diferentes cepas del hongo (Möller et al., 2018). También se determinó la velocidad de crecimiento en cepas de *Shewanella oneidensis* mutantes en genes de enzimas NADH deshidrogenasas (Duhl et al., 2018); se determinó la capacidad de carga de una especie procariota para la colonización de una especie eucariota (Wein et al., 2018). Finalmente, en un estudio del patógeno oportunista *Candida glabrata* se determinó múltiples parámetros de la curva de crecimiento, que en conjunto permitieron evaluar el efecto de siete condiciones diferentes sobre el crecimiento

(Carreté et al., 2018).

Los desarrolladores de *Growthcurver* destacan el área bajo la curva logística como una prometedora métrica para resumir una curva de crecimiento, ya que integra las contribuciones del tamaño de la población inicial, la velocidad de crecimiento y la capacidad de carga en un único valor (Sprouffske y Wagner, 2016). Aunque su uso no es muy extendido aún a poblaciones bacterianas, se ha utilizado en ensayos que requieren la comparación de un elevado volumen de datos. En un estudio donde se controló el desarrollo de la microbiota para modificar el fenotipo de una planta hospedera, se evaluó diversos parámetros de crecimiento; considerando la redundancia encontrada, se utilizó el área bajo la curva, porque compila las otras medidas de desempeño bacteriano (Herrera Paredes et al., 2018). En este caso se utilizó el paquete de R PGCA (<https://github.com/surh/PGCA>) para los análisis de datos. En un estudio de microorganismos en la germinación y emergencia de semillas se determinó el área bajo la curva, mediante *Growthcurver*, como valor representativo para evaluar el crecimiento de diferentes cepas de bacterias frente a exudados de plantas (Torres-Cortés et al., 2018).

Hipótesis y objetivos

En base a los antecedentes expuestos y frente a la pregunta de si además de la NR A contribuyen a la resistencia a telurito el resto de las enzimas de la vía de reducción del nitrato y nitrito se plantea como *hipótesis* de trabajo de esta Tesis que: **“La nitrato reductasa periplasmática NapA y las nitrito reductasas NirB y NrfA disminuyen los niveles de nitrito en el citoplasma y de este modo contribuyen a**

la resistencia de *Escherichia coli* a telurito”.

El objetivo general y los objetivos específicos son:

Objetivo General

Determinar la contribución de NapA, NirB y NrfA a la resistencia a telurito en *E. coli*, además de evaluar la participación de nitrito en la toxicidad del telurito.

Objetivos Específicos

1. Determinar el efecto del telurito en el crecimiento de *E. coli* $\Delta napA$, $\Delta nrfA$ y $\Delta nirB$
2. Evaluar el efecto del nitrito sobre el crecimiento de *E. coli* expuesta a telurito
3. Determinar la participación de los mecanismos de defensa contra óxido nítrico en la resistencia de *E. coli* a telurito

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas y condiciones de cultivo

En este trabajo se utilizó *E. coli* BW25113 y las mutantes $\Delta napA$, $\Delta nrfA$, $\Delta nirB$, $\Delta norR$, $\Delta nsrR$, $\Delta norV$, Δhmp y Δhcp , proporcionadas por NRBP-*E. coli* del National Institute of Genetics, Japón (Baba et al., 2006; Yamamoto et al., 2009). Estas se mantuvieron en placas de agar LB a 4 °C y se renovaron periódicamente desde cultivos líquidos en glicerol 50% a -80 °C.

Las bacterias se crecieron en medio líquido LB (Sambrook y Russell, 2001) a 37 °C con agitación; también se utilizó medio MD (casaminoácidos 0,1 %, glicerol 1 %, $CaCl_2$ 0,1 mM, $MgSO_4$ 2 mM y sales M9 ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 4,27 mM, KH_2PO_4 9,34 mM, $NaCl$ 11,02 mM, NH_4Cl 11,93 mM).

Curvas de crecimiento

Diez microlitros de cultivos crecidos durante la noche se inocularon en el medio correspondiente al que se agregó previamente telurito, nitrato o nitrito, como se indica en cada caso. Se usó placas de cultivo de 48 pocillos de fondo plano, conteniendo un volumen final de 1 mL. El telurito de potasio (K_2TeO_3), nitrato de sodio ($NaNO_3$) y nitrito

de sodio (NaNO_2) fueron incorporados desde soluciones stock estériles alcanzando concentraciones finales de telurito de potasio de 0,06 y 0,12 μM en LB, y de 0,2 y 1,0 μM en MD; nitrato de sodio 25 mM para ambos medios y nitrito de sodio 25 mM en LB y 5 mM en MD. Estos cultivos fueron crecidos a 37 °C con agitación orbital y la absorbancia a 600 nm fue monitoreada a intervalos de tiempo regulares, por un periodo de aproximadamente 20 h. En cada ocasión se confirmó que los cultivos en ausencia del tóxico hubiesen alcanzado la saturación (absorbancia estable durante las últimas 3 h). Para la incubación y medición de absorbancia se utilizó un lector multimodo Infinite M200Pro (Tecan). Para minimizar el efecto de otras variables, se llevó a cabo cultivos de la cepa control junto con aquellos de cada cepa mutante.

Análisis de curvas de crecimiento

Para el análisis del crecimiento, se realizó un ajuste de los datos de las curvas a la forma estándar de la ecuación logística (Rockwood, 2015). Los parámetros de la ecuación logística (velocidad de crecimiento, tamaño de población inicial y capacidad de carga) proveen información significativa a nivel de población con una interpretación biológica directa (Rockwood, 2015; Sprouffske y Wagner, 2016). Una de las formas de la ecuación logística se muestra a continuación:

$$N_t = \frac{K}{1 + \left(\frac{K - N_0}{N_0}\right) e^{-rt}}$$

donde N_t es el número de células al tiempo t y N_0 representa el tamaño inicial de la población. A su vez, K representa la capacidad de carga, es decir la máxima población posible en un ambiente particular. La velocidad de crecimiento intrínseca de la población, r , es la velocidad de crecimiento que podría ocurrir si no hubiese imposición

de restricciones en el tamaño total de la población; también se le denomina r-máxima o parámetro Malthusiano (Rockwood, 2015; Sprouffske y Wagner, 2016). Este modelo aplica para estudios de población de una sola especie donde (i) la capacidad de carga del sistema es una constante, (ii) el crecimiento de la población no es afectado por la distribución de edad, (iii) las tasas de nacimiento y sobrevivencia cambian de forma lineal e inversamente proporcional con el tamaño de la población, (iv) no hay desfases temporales entre el crecimiento de la población y la capacidad de carga del ambiente, (v) factores abióticos independientes de la densidad de población no afectan las tasas de crecimiento y muerte y (vi) la densidad de población es homogénea afectando a todos los miembros por igual (Rockwood, 2015). En el presente trabajo, el ambiente (cultivo en 1 mL de medio) se mantuvo constante y por lo tanto, tiene una capacidad de carga constante, cumpliendo la condición (i). También se cumple con lo establecido en (ii), ya que las células se reproducen por fisión binaria y no tienen una estructura etaria como en animales; ello implica que la condición (iii) resulte casi irrelevante en este caso. Se cumplen perfectamente las condiciones (iv) y (vi) gracias a la agitación constante del cultivo. También se cumple con la condición (v), en la medida que se trata de un ambiente de laboratorio (no sujeto, por ejemplo, a cambios climáticos), donde se mantienen constantes factores como la temperatura, entre otros.

Los datos se procesaron en el entorno de desarrollo integrado *RStudio* (<https://www.rstudio.com>), utilizando el paquete *Growthcurver* (R Development Core Team, 2008; Sprouffske y Wagner, 2016). *Growthcurver* encuentra los mejores valores de K , r , y N_0 de la ecuación logística para los datos de la curva de crecimiento usando la implementación del algoritmo no lineal de mínimos cuadrados de Levenberg-Marquardt, disponible en el paquete de R *minipack.lm* (Sprouffske y Wagner, 2016).

Se ingresan al programa dos vectores de datos para cada curva de crecimiento: tiempo de mediciones y las lecturas de absorbancia determinadas a esos tiempos particulares. La unidad de medición de tiempo, en este caso horas, determina la unidad del parámetro entregado tras el análisis; por ejemplo, la velocidad de crecimiento obtenida de los datos de este estudio se expresa en h^{-1} . La absorbancia del medio es sustraída automáticamente restando el valor mínimo del conjunto de datos a todos ellos (*Growthcurver* posee otras opciones para establecer el blanco, las que no fueron utilizadas en este caso).

Además de los parámetros K , r , y N_0 ya mencionados, se calcularon otros como el tiempo generacional y el tiempo al que se alcanza la mitad de la capacidad de carga. Se calculó también el área bajo la curva logística (ABC), que se obtiene de la integral de la ecuación logística desde el tiempo 0 a un tiempo t definido por el usuario, que en este caso fue el tiempo final, ~ 20 h. Además se evaluó el área bajo la curva directamente de los datos, denominada área bajo la curva empírica (ABCe), en que se suman las áreas de los trapecoides creados al conectar los puntos de datos consecutivos de las mediciones de absorbancia en un intervalo como el descrito anteriormente para el ABC. Se entrega también información relativa al procesamiento de los datos. Sigma es un valor de la calidad de ajuste de los parámetros de la ecuación logística a los datos, que se calcula vía la suma residual de los cuadrados del modelo de regresión no lineal. De este modo, a menor valor de sigma mejor será el ajuste de la ecuación logística a los datos. En el caso de haber problemas con el ajuste, éstos se indican en el valor "nota". El usuario puede obtener otros parámetros vía comandos específicos.

El ABC integra la información de los parámetros logísticos K , r y N_0 en un único valor. En cultivos bacterianos, el ABC se correlaciona principalmente con la capacidad de carga (K) y la velocidad de crecimiento (r), y en menor medida, con el tamaño inicial de la población (N_0) (Sprouffske y Wagner, 2016). Por ello se decidió utilizarlo como métrica para los datos de este trabajo.

Se determinó el área bajo la curva logística (ABC) de cada cultivo y en el caso de cultivos expuestos a telurito, se promedió el ABC de dos réplicas técnicas. Con la cepa control, se evaluó el efecto de telurito, nitrato, nitrito, telurito + nitrato, y telurito + nitrito para cada medio (LB y MD) calculando el porcentaje del ABC con tratamiento respecto al ABC sin tratamiento (% ABC). Por otra parte, para las cepas mutantes se evaluó el efecto del tóxico cuantificando el porcentaje del ABC con telurito respecto al ABC sin éste en el mismo medio. Estas cepas fueron crecidas en medio MD sin suplementar y en este medio con nitrato o nitrito.

Niveles de nitrito

Se utilizó cultivos de *E. coli* BW25113 crecidos en MD hasta saturación para inocular medio fresco en proporción 1:100. Se agitó orbitalmente a 37 °C en matraces Erlenmeyer hasta $OD_{600} \sim 0,3$, momento en que se agregó telurito. Para determinar los niveles de nitrito se tomó alícuotas del cultivo a diferentes tiempos que se centrifugaron inmediatamente a 4 °C para obtener los sobrenadantes. Las muestras fueron mantenidas a 4 °C y analizadas el mismo día en un equipo NOA 280i (Sievers), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó una mezcla de reacción fresca preparada con 1 mL de solución de KI 0,6 M y 8 mL de ácido acético glacial. Para la

medición se dispensó 50 μL de cada muestra en la mezcla de reacción por duplicado y se utilizó el promedio de ambos resultados. El equipo fue calibrado previamente con soluciones de nitrito de sodio preparadas inmediatamente antes de medir, también inyectadas por duplicado. El programa recoge los datos de las concentraciones teóricas proporcionadas por el usuario para cada solución y las lecturas (mV) proporcionadas por el detector, con lo que realiza automáticamente la regresión lineal en base a la cual calcula la concentración de cada muestra, incluidas las de la curva de calibración misma. En la Figura 4 se muestran los datos para una de las curvas de calibración.

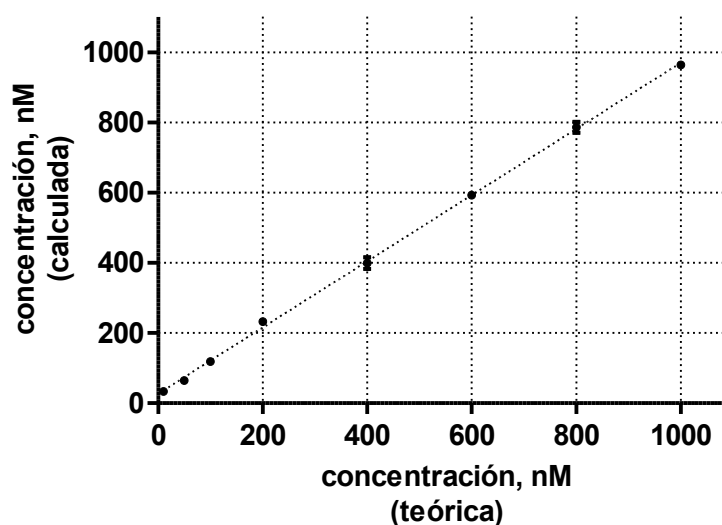


Figura 4. Curva de calibración para determinar la concentración de nitrito en el equipo NOA 280i. Se graficó las concentraciones teóricas de las soluciones de la curva de calibración (abscisa) respecto a las concentraciones calculadas por el equipo mediante la ecuación obtenida por regresión lineal (ordenada). Se muestra el promedio y desviación estándar de dos mediciones para cada concentración teórica, y la recta de los datos obtenida por regresión lineal.

RESULTADOS

Objetivo 1: Determinar el efecto del telurito en el crecimiento de las mutantes de *E. coli* $\Delta napA$, $\Delta nrfA$ y $\Delta nirB$

Antes de evaluar el efecto del telurito en las mutantes, se caracterizó el crecimiento de la cepa control en las distintas condiciones de estudio. Se construyó una curva de crecimiento de *E. coli* BW25113 en medio LB y en el mismo medio conteniendo nitrato o telurito (Figura 5 A). Para el análisis del crecimiento se realizó un ajuste de los datos de las curvas a la forma estándar de la ecuación logística utilizando el paquete de R *Growthcurver* (Sprouffske y Wagner, 2016). Se obtuvo los parámetros determinantes de la ecuación -velocidad de crecimiento intrínseca (r), capacidad de carga (K), tamaño inicial de la población (N_0)- además de otras métricas de la curva (Tabla 1 y A1). En medio LB y LB con nitrato, la adición de telurito disminuyó el valor de N_0 sin afectar los parámetros K y r (de acuerdo a prueba de t , $p < 0,01$ para N_0 y $p > 0,05$ para K y r , en ambas condiciones) (Tabla 1). En consecuencia, el cultivo demoró más tiempo en alcanzar la mitad de la capacidad de carga (t_{mid}) ($p < 0,05$) (Tabla 1), y disminuyó el área bajo la curva (ABC) ($p < 0,05$) (Figura 5 B); a su vez el tiempo generacional (t_{gen}) no fue afectado por la adición de telurito ($p > 0,05$) (Tabla 1). El efecto del telurito en la curva de crecimiento y en el ABC se muestra en los gráficos A y C de la Figura 5, respectivamente.

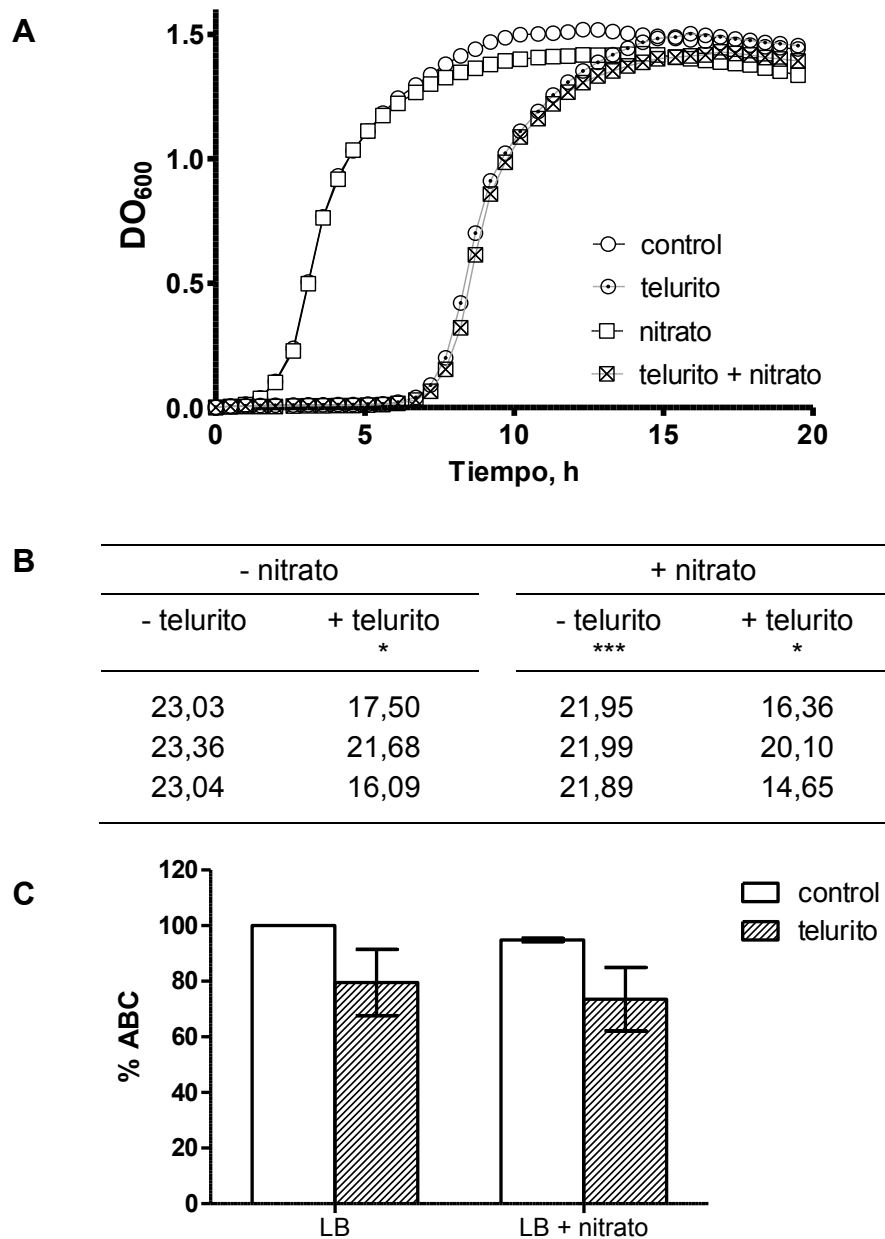


Figura 5. Efecto del nitrato y telurito en el crecimiento de *E. coli* BW25113 en medio LB. A, curva de crecimiento representativa para cada condición. B, área bajo la curva de crecimiento en cada condición para tres réplicas biológicas; se indican diferencias significativas respecto al cultivo sin suplementar (prueba de *t*: *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,0005$). C, promedio y desviación estándar de los datos anteriores, valores ponderados al crecimiento en LB sin suplementar (% ABC). Nitrato de sodio: 25 mM; telurito de potasio: 0,12 μ M.

Tabla 1. Parámetros determinados para el crecimiento de *E. coli* BW25113 en LB. Se agregó nitrato de sodio (25 mM) y telurito de potasio (0,12 μ M) según lo indicado. *r*, velocidad de crecimiento intrínseca; *K*, capacidad de carga; *N*₀, tamaño inicial de la población; *t* gen, tiempo generacional; *t* mid, tiempo en que se alcanza *K*/2; *ABC*, área bajo la curva logística; *ABCe*, área bajo la curva experimental; *sigma*, índice de la calidad del ajuste de los datos a la curva logística; d.s., desviación estándar. Para más detalles ver Materiales y Métodos.

		LB			
		- telurito		+ telurito 0,12 μ M	
		promedio	d.s.	promedio	d.s.
r (h⁻¹)	-	1,032	0,039	1,071	0,100
	nitrato	1,159	0,009	1,161	0,051
K (Abs)	-	1,467	0,008	1,490	0,017
	nitrato	1,378	0,008	1,396	0,013
N₀ (Abs)	-	0,03199	0,00598	0,003642	0,005752
	nitrato	0,02219	0,00351	0,001454	0,002329
t gen (h)	-	0,6724	0,0250	0,6523	0,0593
	nitrato	0,5982	0,0044	0,5977	0,0265
t mid (h)	-	3,697	0,130	7,152	1,824
	nitrato	3,555	0,130	7,306	1,877
ABC	-	23,145	0,183	18,425	2,904
	nitrato	21,945	0,051	17,038	2,783
ABCe	-	23,037	0,186	18,339	2,870
	nitrato	21,863	0,057	16,976	2,757
sigma	-	0,0525	0,0022	0,0466	0,0061
	nitrato	0,0442	0,0014	0,0410	0,0030

Al analizar el efecto de la adición de nitrato se observó un aumento en r ($p < 0,01$) y por lo tanto una disminución en el tiempo generacional ($p < 0,01$). Además, disminuyó el parámetro K ($p < 0,001$) y el ABC ($p < 0,001$) y no hubo cambios en N_0 ($p > 0,05$) (Tabla 1). En medio LB con telurito, la adición de nitrato también produjo una disminución en K ($p < 0,01$), pero sin afectar r , N_0 ($p > 0,05$) ni alterar el resto de las otras métricas ($p > 0,05$).

Se construyeron curvas de crecimiento como las anteriores pero esta vez en medio de cultivo MD (Figura 6), que posee concentraciones de nitrito menores a las del LB (~ 70 y 1000 nM, respectivamente), y por lo tanto, resulta en un medio más apropiado para los objetivos de este estudio. En MD no se observó efecto al agregar la concentración de telurito usada en LB (0,12 μ M), por lo que en su lugar se usó 1,0 μ M. La adición del tóxico afectó todos los parámetros analizados, a diferencia de lo observado en LB (Tabla 2 y A 2). El telurito disminuyó la velocidad de crecimiento de los cultivos (r) y el tamaño inicial de la población (N_0) ($p < 0,001$ para ambos), y aumentó la capacidad de carga (K) ($p < 0,01$) (Tabla 2), tanto en medio MD como MD con nitrato. Esto llevó a un aumento en el tiempo generacional (t_{gen}) ($p < 0,001$) y en el tiempo que demora el cultivo en alcanzar la mitad de K (t_{mid}), además de una disminución en el ABC ($p < 0,01$ para ambos) (Tabla 2). Al comparar el ABC se encontró que el telurito disminuye el crecimiento de *E. coli* de manera proporcional a la concentración del tóxico e independiente de la presencia de nitrato tanto en medio LB como MD (Tabla A 3, Figura 5 y 6).

La adición de nitrato al medio MD aumentó r ($p < 0,001$) y el ABC ($p < 0,05$) y

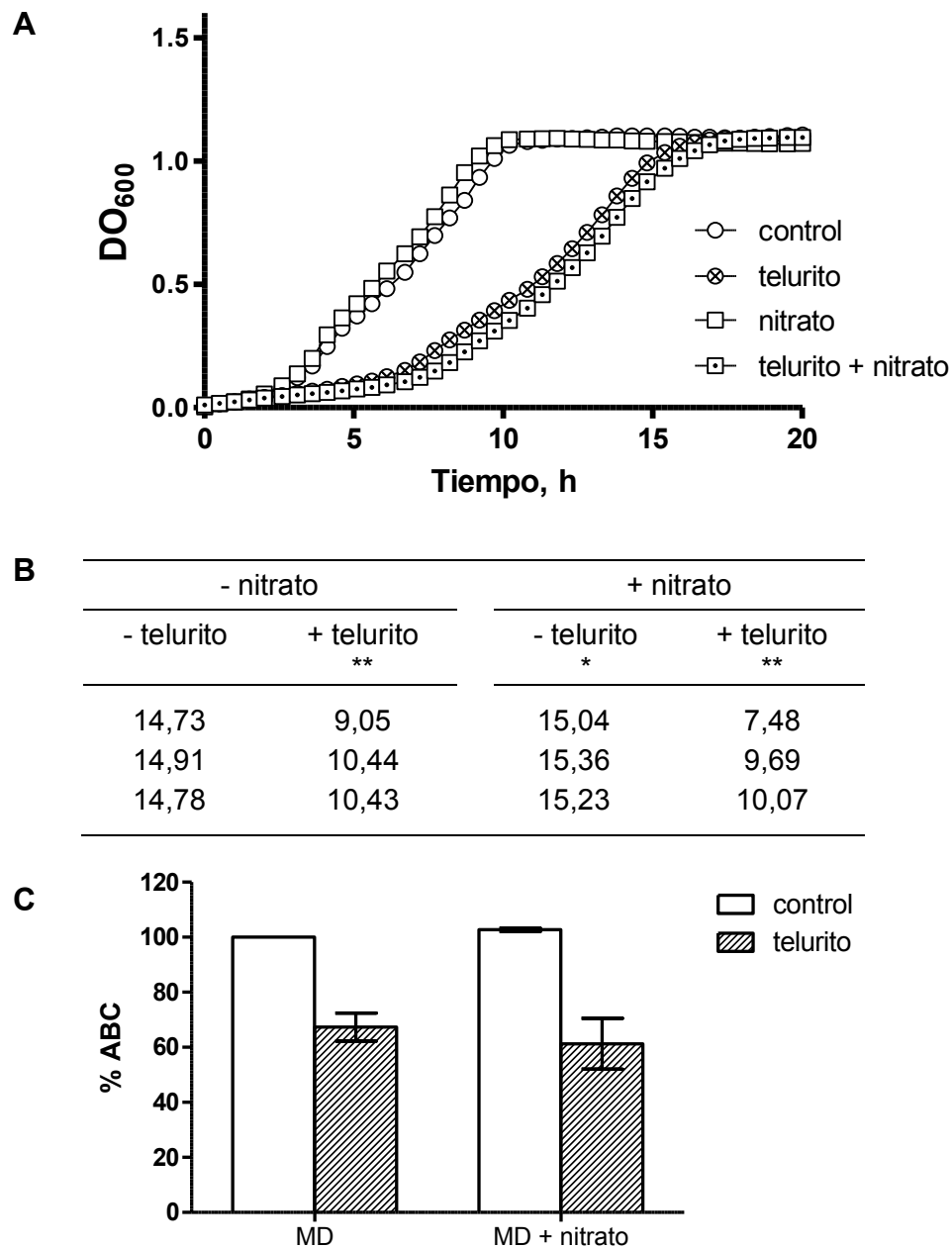


Figura 6. Efecto del nitrato y telurito en el crecimiento de *E. coli* BW25113 en medio MD. A, curva de crecimiento representativa para cada condición. B, área bajo la curva de crecimiento en cada condición para tres réplicas biológicas; se indican diferencias significativas respecto al cultivo sin suplementar (prueba de *t*: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,005$). C, promedio y desviación estándar de los datos anteriores, valores ponderados al crecimiento en MD sin suplementar (% ABC). Nitrato de sodio: 25 mM; telurito de potasio: 1,0 μ M.

Tabla 2. Parámetros determinados para el crecimiento de *E. coli* BW25113 en MD. Se agregó nitrato de sodio (25 mM) y telurito de potasio (1,0 μ M) según se indica. *r*, velocidad de crecimiento intrínseca; *K*, capacidad de carga; *N*₀, tamaño inicial de la población; *t* gen, tiempo generacional; *t* mid, tiempo en que se alcanza *K*/2; *ABC*, área bajo la curva logística; *ABCe*, área bajo la curva experimental; *sigma*, índice de la calidad del ajuste de los datos a la curva logística; d.s., desviación estándar. Para más detalles ver Materiales y Métodos.

		MD			
		- telurito		+ telurito 1,0 μ M	
		promedio	d.s.	promedio	d.s.
r (h⁻¹)	-	0,6052	0,0031	0,4141	0,0240
	nitrato	0,6621	0,0101	0,4520	0,0068
K (Abs)	-	1,103	0,013	1,175	0,006
	nitrato	1,088	0,018	1,171	0,013
N₀ (Abs)	-	0,02062	0,00149	0,009849	0,000582
	nitrato	0,02022	0,00031	0,004868	0,002073
t gen (h)	-	1,145	0,006	1,678	0,099
	nitrato	1,047	0,016	1,534	0,023
t mid (h)	-	6,547	0,130	11,574	0,742
	nitrato	5,994	0,135	12,305	1,329
ABC	-	14,808	0,092	9,972	0,796
	nitrato	15,214	0,162	9,079	1,399
ABCe	-	14,797	0,088	10,031	0,787
	nitrato	15,197	0,171	9,179	1,378
sigma	-	0,0287	0,0015	0,0292	0,0007
	nitrato	0,0307	0,0010	0,0278	0,0028

disminuyó el tiempo generacional ($p < 0,001$) y el tiempo en que se alcanzó la mitad de K ($p < 0,01$). Los parámetros K y N_0 no fueron afectados ($p > 0,05$ para ambos) (Tabla 2). En medio MD con telurito la adición de nitrato disminuyó el N_0 ($p < 0,05$) sin alterar ninguno de los otros parámetros (Tabla 2). Al comparar los resultados entre los medios se observó menor crecimiento en MD respecto a LB (Figura 5 A y 6 A), que se refleja en valores menores para K , r , N_0 y ABC , y tiempos mayores de t_{gen} y t_{mid} (Tabla 1 y 2) ($p < 0,05$ para N_0 y $p < 0,001$ para el resto de los valores); sin embargo se debe considerar que los ensayos no fueron realizados simultáneamente lo que podría afectar esta comparación.

Entre los parámetros obtenidos se escogió el área bajo la curva (ABC) para evaluar el efecto del telurito en los cultivos de las cepas mutantes, ya que refleja en un único valor las diferencias en el tamaño inicial de la población, la velocidad de crecimiento y el crecimiento máximo del cultivo entre las condiciones ensayadas (Sprouffske y Wagner, 2016).

Se evaluó el crecimiento de las cepas carentes de los genes que codifican para $NapA$, $NrfA$ y $NirB$ en medio MD con nitrato (Figura 7). Los resultados muestran alta variabilidad, como se puede observar en las curvas de la cepa control realizadas en diferentes días (Figura 6 y 7 y Tablas A3, A4 y A6), por lo cual no es posible evaluar los resultados en términos absolutos, pero sí en términos relativos a los cultivos de la cepa parental realizados simultáneamente. Otra observación importante es que incluso en el medio sin tóxico existe un menor crecimiento de algunas de las mutantes respecto a la cepa control (Tablas A4 y A5, prueba de t , $p < 0,0001$), lo que sesga la comparación directa del crecimiento de las mutantes en relación al de la cepa control, ya que

independientemente de la presencia del tóxico presentan menor crecimiento.

De este modo se optó por ponderar el ABC con telurito por el ABC sin telurito en una determinada condición. El porcentaje de ABC (% ABC) así obtenido para cada cepa (mutantes y control) se graficó, y se analizó si los resultados para la cepa mutante son diferentes a los de la cepa control correspondiente. Los resultados para las cepas *E. coli* $\Delta napA$, $\Delta nrfA$ y $\Delta nirB$ en medio MD con nitrato se muestran en la Figura 7.

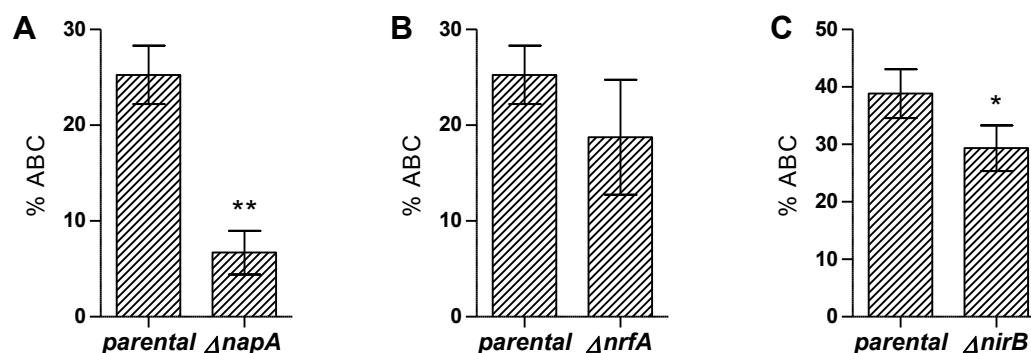


Figura 7. Efecto del nitrato y telurito en el crecimiento de *E. coli* $\Delta napA$ (A), $\Delta nrfA$ (B) y $\Delta nirB$ (C). Se construyó curvas de crecimiento en medio MD con nitrato de sodio (25 mM) y telurito de potasio (1,0 μ M) y se determinó el área bajo la curva (ABC). Para la cepa parental y cada cepa mutante el ABC fue ponderado por el crecimiento sin telurito (% ABC). Se muestra el promedio y desviación estándar de tres ensayos. Se indican diferencias significativas respecto a la cepa parental según prueba de *t* (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,005$).

El telurito disminuyó el crecimiento de todas las cepas, siendo *E. coli* $\Delta napA$ y $\Delta nirB$ más afectadas por el tóxico en medio MD con nitrato (Figura 7). Aunque se observa algo similar en la cepa $\Delta nrfA$, la diferencia no es estadísticamente significativa, considerando que la desviación estándar (6,00) fue mayor a la que presentaron las otras cepas evaluadas (2,28 y 3,97 para $\Delta napA$ y $\Delta nirB$, respectivamente). En MD sin

suplementar no se obtuvo diferencias entre el efecto del telurito en las mutantes respecto a la cepa control (Tabla A7, A8 y A9), indicando que los resultados anteriores son dependientes de la presencia de nitrato. El efecto del nitrato por sí solo no fue evaluado en las mutantes, como se hizo para la cepa control, ya que los ensayos en ambas condiciones (con y sin nitrato) se realizaron no simultáneamente, lo que genera necesariamente variaciones que no son causadas por la variable en estudio. Como se mencionó previamente, estas diferencias se observaron en la cepa control en ensayos realizados en las mismas condiciones (Figura 6 y 7 y Tablas A3, A4 y A6).

De las tres mutantes evaluadas, dos son más sensibles a telurito que la cepa control, indicando que las enzimas NirB y NapA son requeridas para la resistencia al tóxico. En el caso de NirB su función es reducir el nitrito del citoplasma y en el caso de NapA es reducir nitrato en el periplasma. El otro gen evaluado codifica para NrfA, que también posee actividad nitrito reductasa pero a diferencia de NirB, se localiza en el periplasma.

Objetivo 2: Evaluar el efecto del nitrito en el crecimiento de *E. coli* expuesta a telurito.

Previo a evaluar el efecto del nitrito se cuantificó su nivel en los medios y condiciones de estudio. Se determinó que en MD el nivel de nitrito es aproximadamente 70 nM y se mantiene al menos durante 6 h de incubación en las condiciones de los cultivos (Figura 8). En cultivos de la cepa control se puede ver que el nivel de nitrito aumenta entre 3,5-4,5 h, cuando el cultivo se encuentra en la fase logarítmica de crecimiento ($OD_{600} \sim 0,3$), hasta una concentración de ~ 330 nM

(Figura A1). Este aumento en los niveles de nitrito no produce cambios detectables en los niveles de NO^{\cdot} (no mostrado), y disminuye por debajo de los niveles basales tras 5 h de cultivo (Figura 8 y A1).

Luego se determinó los niveles de nitrito al tratar cultivos ($\text{OD}_{600} \sim 0,3$) con telurito. El tratamiento con telurito $2 \mu\text{M}$ no tuvo efecto, pero el tratamiento con $40 \mu\text{M}$ del tóxico mostró una acumulación de nitrito 6 veces superior a la observada en la condición control (Figura 9). Resultados similares se observaron con mutantes ΔnirB tratadas con telurito $2 \mu\text{M}$ (no mostrado).

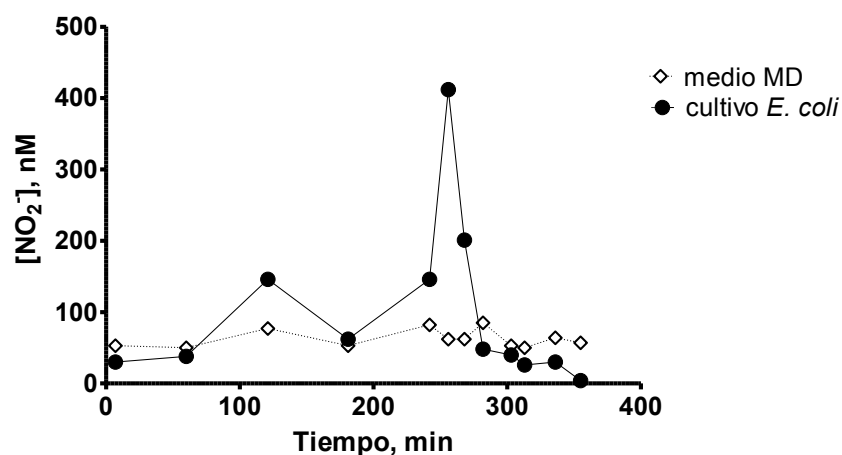


Figura 8. Concentración de nitrito en sobrenadantes de cultivo de *E. coli* y medio MD. Se midió desde la inoculación con *E. coli* BW25113 (círculos negros) y medio (MD) sin inocular bajo las mismas condiciones (rombos blancos). La medición es representativa de al menos tres ensayos.

Aunque se evaluó las concentraciones de nitrito solo durante las primeras horas de cultivo, en todos los casos los niveles encontrados ($< 600 \text{ nM}$) son bajos respecto a las concentraciones agregadas en los siguientes análisis ($\text{NaNO}_2 \text{ 5 mM}$).

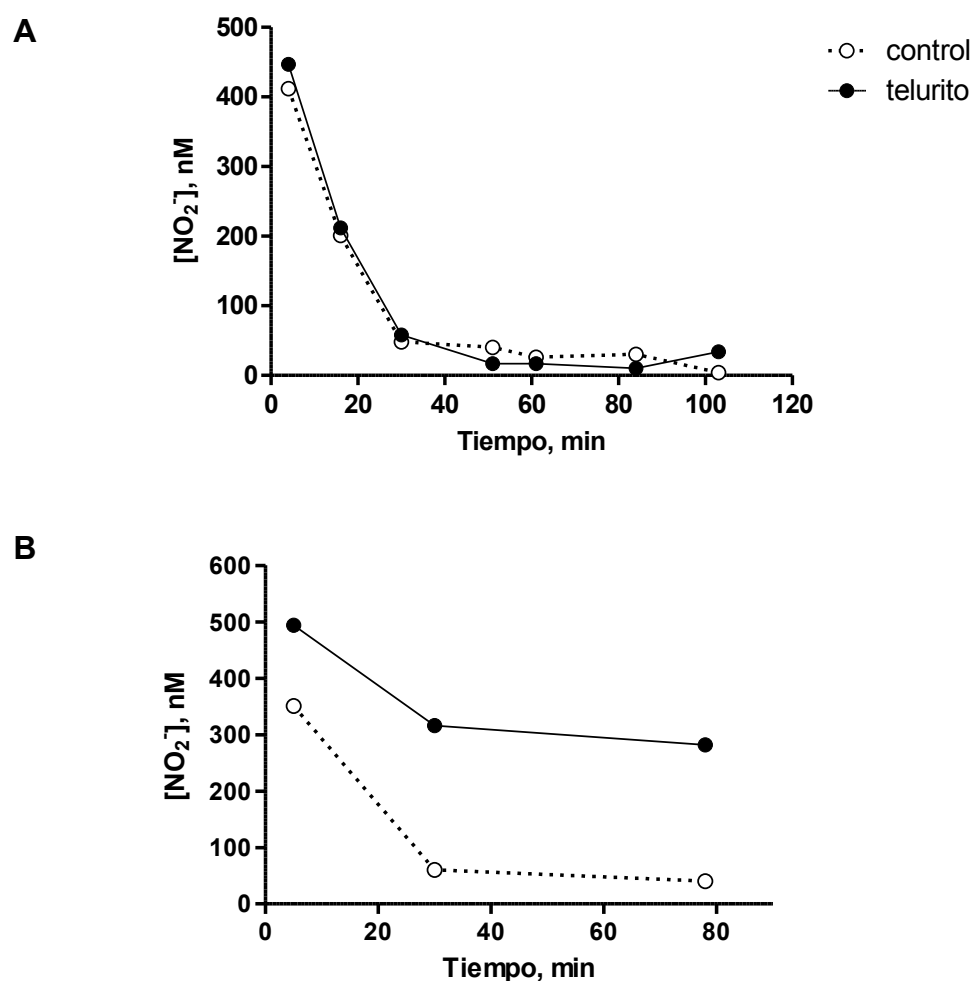


Figura 9. Efecto del telurito en la concentración de nitrito en sobrenadantes de cultivos de *E. coli*. Mediciones realizadas desde el inicio del tratamiento (K_2TeO_3 : A = 2 μ M, B = 40 μ M) de cultivos de *E. coli* BW25113 en medio MD. Medición representativa de al menos tres ensayos.

Se evaluó el efecto del nitrito en el crecimiento de cultivos de *E. coli* en MD con y sin telurito. La adición de nitrito disminuyó el crecimiento de la bacteria (Figura 10 A, Tabla A3), en concordancia con los efectos tóxicos de este compuesto. Al incorporar nitrito y telurito se observa un efecto conjunto en la inhibición del crecimiento, confirmada mediante un análisis de varianza de dos vías (Figura 10 A). En medio LB también se observó disminución del crecimiento al usar nitrito 25 mM –concentración

que inhibe completamente el crecimiento en medio MD-, pero no se observó interacción en el efecto del telurito y nitrito (Figura 10 B). Aunque no se realizó análisis posteriores para determinar las causas de esta diferencia, el efecto conjunto del nitrito y telurito podría deberse a la generación de especies reactivas de nitrógeno -de acuerdo al modelo propuesto- en medio MD, pero no en LB.

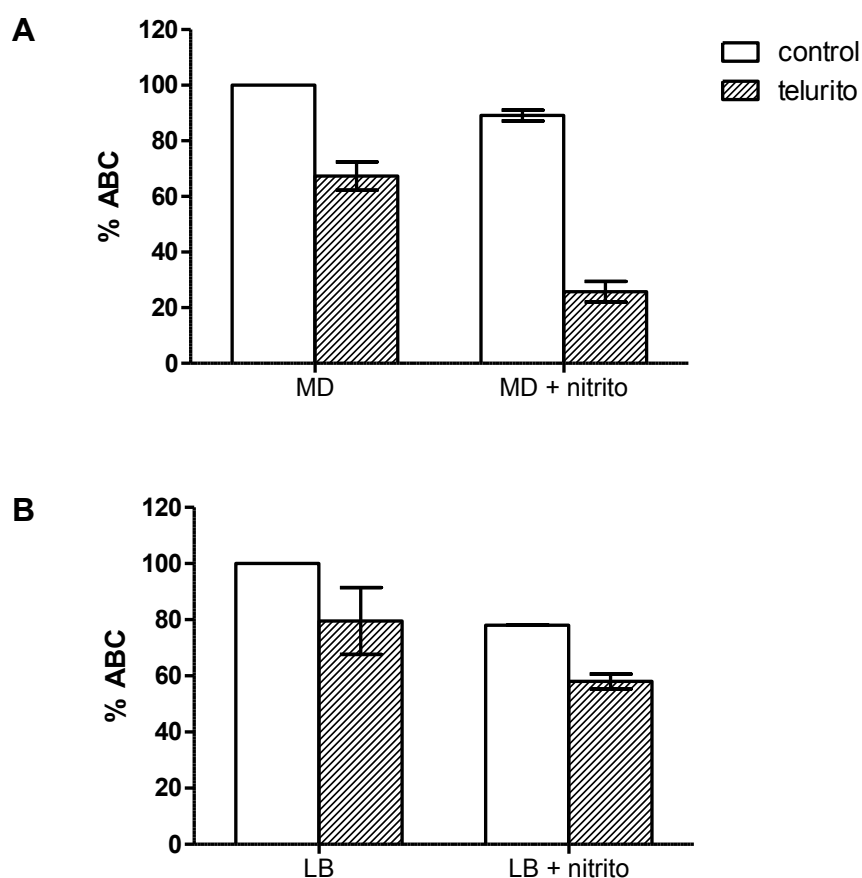


Figura 10. Efecto del nitrito en el crecimiento de *E. coli* BW25113 en medio MD y LB con telurito. Se determinó el área bajo la curva (ABC) de crecimiento en medio MD (A) y LB (B) sin y con nitrito de sodio (5 y 25 mM, respectivamente) y telurito de potasio (1,0 μ M). Se muestra el promedio y desviación estándar de tres ensayos, y valores ponderados al crecimiento en el medio sin suplementar. Datos sin nitrito son los mismos de las figuras 5 y 6. A, Hay interacción entre el efecto del nitrito y telurito de acuerdo a análisis de varianza de dos vías: nitrito 21,1%, telurito 70,8%, interacción 7,2% de la varianza ($p < 0,0001$) B, LB con nitrito: diferencias significativas de acuerdo a prueba de t ($p < 0,0005$).

En las cepas mutantes, al agregar telurito en conjunto con nitrito se obtuvo que *E. coli* $\Delta nrfA$ y $\Delta nirB$ crecieron menos que la cepa parental (Figura 11 B y C, Tabla A11 y A12), concordante con la actividad nitrito reductasa de las enzimas correspondientes, NrfA y NirB. Inesperadamente se observó un resultado similar con la mutante $\Delta napA$ (Figura 11 A, Tabla A10), carente del gen que codifica para la nitrato reductasa periplasmática.

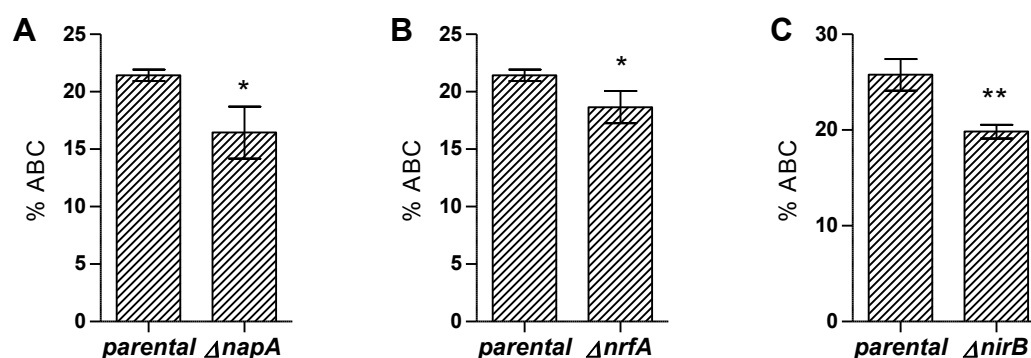


Figura 11. Efecto de nitrito y telurito en el crecimiento de *E. coli* $\Delta napA$ (A), $\Delta nrfA$ (B) y $\Delta nirB$ (C) respecto a la cepa parental. Se construyeron curvas de crecimiento en medio MD con nitrito de sodio (5 mM) y telurito de potasio (1,0 μ M) y se determinó el área bajo la curva (ABC). Para la cepa parental y cada cepa mutante el ABC fue ponderado por el crecimiento sin telurito (% ABC). Se muestra el promedio y desviación estándar de tres ensayos. Se indican diferencias significativas respecto a la cepa parental según prueba de *t* (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,005$).

Objetivo 3: Determinar la participación de los mecanismos de defensa contra óxido nítrico en la resistencia de *E. coli* a telurito

Los resultados del objetivo anterior muestran que es posible que nitrito y telurito lleven a la formación de RNS, lo que ocurriría vía producción de óxido nítrico. *E. coli*

posee dos reguladores transcripcionales, NsrR y NorR, encargados de censar los niveles de este radical. Se evaluó la importancia de estos utilizando cepas mutantes en los genes correspondientes (*E. coli* $\Delta nsrR$ y $\Delta norR$). En medio MD con nitrato se observó un menor crecimiento de la cepa $\Delta norR$ (Figura 12, Tabla A13), sugiriendo que al menos el regulador transcripcional NorR participa en las vías de respuesta para la resistencia a telurito cuando hay presencia de nitrato en este medio. No se observó diferencias respecto al control en la cepa *E. coli* $\Delta nsrR$ (Figura 12) y para ambas cepas en medio MD sin suplementar (Tabla A15 y A16)

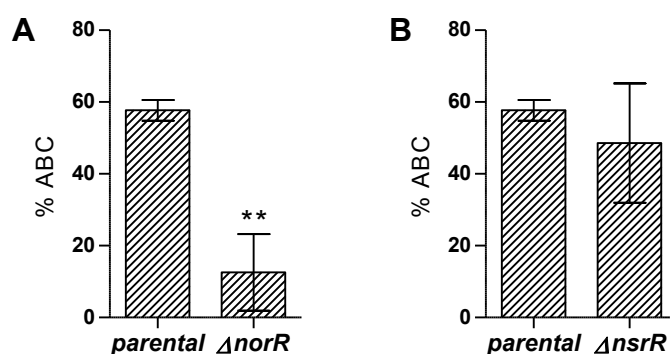


Figura 12. Efecto del nitrato y telurito en el crecimiento de *E. coli* $\Delta nsrR$ (A) o $\Delta norR$ (B) respecto a la cepa parental. Se construyó curvas de crecimiento en medio MD con nitrato de sodio (25 mM) y telurito de potasio (1,0 μ M) y se determinó el área bajo la curva (ABC). Para la cepa parental y cada cepa mutante el ABC fue ponderado por el crecimiento sin telurito (% ABC). Se muestra el promedio y desviación estándar de tres ensayos. Se indican diferencias significativas respecto a la cepa parental según prueba de *t* (**, $p < 0,005$).

Bajo la regulación de NsrR y NorR se encuentran los genes de las enzimas que detoxifican el óxido nítrico, FIRd, Hmp y Hcp. Se evaluó entonces el crecimiento de cepas mutantes en los genes correspondientes *norV*, *hmp* y *hcp*. En medio MD con nitrato las mutantes $\Delta norV$ y Δhmp presentaron un menor crecimiento, mientras que la

mutante Δhcp no presentó diferencias respecto a la cepa parental (Figura 13, Tabla A17, A18, A19) y no se observó diferencias con el control en MD sin suplementar (Tabla A20, A21, A22), sugiriendo que las enzimas FIRd (*norV*) y Hmp serían necesarias para abatir el óxido nítrico generado al agregar telurito en medio MD con nitrato.

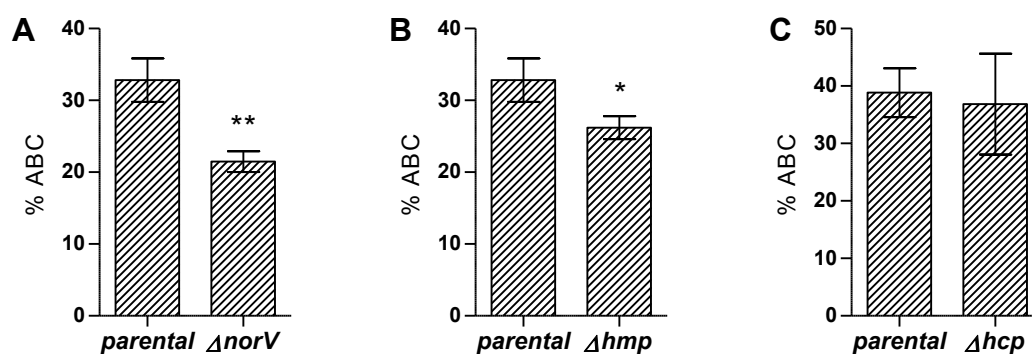


Figura 13. Efecto del nitrato y telurito en el crecimiento de *E. coli* $\Delta norV$ (A), Δhmp (B) o Δhcp (C) respecto a la cepa parental. Se construyó curvas de crecimiento en medio MD con nitrato de sodio (25 mM) y telurito de potasio (1,0 μ M) y se determinó el área bajo la curva (ABC). Para la cepa parental y cada cepa mutante el ABC fue ponderado por el crecimiento sin telurito (% ABC). Se muestra el promedio y desviación estándar de tres ensayos. Se indican diferencias significativas respecto a la cepa parental según prueba de *t* (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,005$).

DISCUSIÓN

A la fecha no se ha estudiado la relación entre la composición del medio de cultivo y la toxicidad que el oxianión telurito ejerce sobre las bacterias. Sin embargo, la importancia de la enzima nitrato reductasa A (NR A) en la resistencia al tóxico (Avazeri et al., 1997; Turner et al., 1995) lleva a cuestionarse cómo la reducción de nitrato afecta a la célula en un contexto que no le es propio, como es en presencia de oxígeno. La reducción de nitrato podría llevar a la acumulación de nitrito, cuyos efectos nocivos podrían ser disminuidos si se da el caso que otras enzimas de la vía de reducción de especies de nitrógeno estén presentes. De este modo, en esta Tesis se propuso la participación de las enzimas del metabolismo anaeróbico nitrato reductasa NapA y nitrito reductasas NirB y NrfA en la resistencia de *E. coli* a telurito.

Los resultados muestran que la adición de nitrato tiene un efecto menor sobre el crecimiento bacteriano en relación a lo observado con telurito, tanto en medio LB como MD (Figura 5 y 6, respectivamente), lo que es esperable para un compuesto no tóxico respecto a uno que sí lo es. En medio MD con nitrato, cultivos de las cepas *E. coli* $\Delta napA$ y $\Delta nirB$ presentan menor capacidad para crecer en presencia de telurito que la cepa no mutada (Figura 7), mientras que en ensayos sin nitrato no se observó diferencias con respecto a la cepa parental (Tabla A7, A8 y A9). El nitrato agregado al medio estaría siendo incorporado al citoplasma y allí sería reducido a nitrito, llevando a

la acumulación de este compuesto tóxico para bacterias (Bowman et al., 2011; Maia y Moura, 2014). Se podría hipotetizar que en presencia de telurito la reducción de nitrato en el periplasma por NapA es importante para la célula debido a que disminuye la entrada de nitrato al citoplasma, y de esta manera la concentración de nitrito allí generado por la nitrato reductasa A. Por su parte, la nitrito reductasa del citoplasma NirB también contribuye a disminuir la concentración de nitrito y sus efectos tóxicos en el interior de la célula vía su reducción a amonio. Los resultados indican que en ausencia de NapA y NirB se acumula nitrito en el citoplasma que aumenta los efectos del telurito sobre el crecimiento bacteriano. Comparativamente, la reducción de nitrito en el periplasma sería menos relevante considerando los resultados obtenidos con la cepa que carece de *nrfA*, gen requerido para la reducción de nitrito en el periplasma.

Debido al diseño experimental empleado no se pudo evaluar el efecto del nitrato en las cepas mutantes de forma independiente al efecto del tóxico, lo cual habría proporcionado información relevante en vista de los resultados obtenidos. Asimismo, sería importante complementar los actuales resultados con un estudio del rol de los transportadores de nitrato y nitrito (NarK, NarU y NirC), ya que posiblemente la entrada de nitrato y la salida de nitrito también contribuyen a la resistencia a telurito. Además, considerando que una baja concentración de nitrato favorece la expresión de la nitrato y nitrito reductasa periplasmática (Stewart et al., 2002; Wang et al., 1999; Wang y Gunsalus, 2000), sería importante evaluar el efecto del telurito en esta condición.

El nitrato podría estar influenciando el crecimiento de los cultivos como nutriente, ya que su reducción lleva finalmente a la formación de amonio [fuente de nitrógeno preferida por *E. coli* (Chubukov et al., 2014; Reitzer, 2003)]. El medio MD

contiene diversos aminoácidos, los que podrían ser utilizados como fuente de nitrógeno. Sin embargo, al agregar nitrato se observó un aumento en la velocidad de crecimiento intrínseca y el ABC de los cultivos de *E. coli* (Tabla 2, Figura 6), que podría ser causado por la disponibilidad de una fuente de nitrógeno adicional. En medio LB, en cambio, el nitrato generó una disminución de la capacidad de carga, y a pesar de aumentar la velocidad de crecimiento, disminuyó el ABC, es decir, de algún modo se está perjudicando el crecimiento del cultivo (Tabla 1, Figura 5). Resulta difícil predecir qué vías estarían predominando en esta condición, ya que este medio contiene mayor diversidad de nutrientes que MD. Una posibilidad es la pérdida de poder reductor por esta vía, que no ocurre en ausencia de nitrato. Otra posibilidad es que se altere la combinación entre las fuentes de carbono y nitrógeno a una que sea menos favorable para el crecimiento (Bren et al., 2016). Sin duda la composición del medio altera la sensibilidad de los cultivos a telurito, como se mostró aquí (Tabla 1 y 2, Figura 5 y 6) y se ha visto previamente, donde cultivos de *E. coli* son más resistentes a telurito en M9 (Morales et al., 2017) y MOPS (no publicado) respecto a cultivos en LB.

El medio LB se ha usado extensivamente en los estudios sobre la toxicidad del telurito, lo que no es el caso en estudios relativos al efecto de compuestos que contienen nitrógeno, como nitrato, nitrito y óxido nítrico en *E. coli*. En su lugar, se utiliza más comúnmente medios definidos con o sin suplementos (Tiso y Schechter, 2015; Wang et al., 1999, 2016). En esta línea, en el presente trabajo de Tesis se optó por utilizar medio MD, que posee concentraciones de nitrito menores a las del LB (~ 70 y 1000 nM, respectivamente). En vista de los resultados obtenidos sería interesante evaluar de qué manera la disponibilidad de nutrientes altera la capacidad de la bacteria para resistir al tóxico.

Por otra parte, el análisis de los datos de las curvas de crecimiento impuso una serie de desafíos ya que se obtuvo una alta variabilidad entre ellas. En este sentido, un estudio del año 2015 discute sobre los resultados obtenidos en cultivos utilizando lectores de placa, y el efecto de variantes técnicas a veces subestimadas en el desempeño de diferentes cepas bacterianas (Concepción-Acevedo et al., 2015). Esto lleva a ser más críticos con los resultados y conclusiones obtenidas por esta metodología. A modo de ejemplo, en el transcurso de este estudio se realizaron mediciones de absorbancia sobre los rangos en los cuales este parámetro responde linealmente a la concentración, por lo que los resultados en esta condición resultan en una subestimación de las diferencias reales entre los cultivos, error sistemático que podría haber generado falsos negativos para algunas de las cepas o condiciones estudiadas.

Al medir los niveles basales de nitrito en los cultivos se detectó que estos aumentan durante el crecimiento inicial ($OD_{600} \sim 0,3$), para luego disminuir rápidamente; resultados similares se han descrito en cultivos anaeróbicos de *E. coli* suplementados con nitrato 5 mM, donde se observa un máximo de nitrito (~ 4 mM) como consecuencia de la reducción de nitrato por NR A (DeMoss y Hsu, 1991; Stewart et al., 2002). Considerando que el ensayo fue realizado en condiciones aeróbicas y sin la adición de nitrato, es posible que el aumento en los niveles de nitrito estén dados por la reducción de nitrato del medio, por NR Z, cuya expresión es constitutiva (Iobbi-Nivol et al., 1990).

El tratamiento con telurito 40 μ M produjo acumulación de nitrito en los cultivos de *E. coli*, lo que puede estar dado por la disminución en la velocidad de crecimiento de los cultivos (evaluada por densidad óptica), y en consecuencia, un menor consumo

de nitrito. Otra posibilidad que no puede ser descartada es que el telurito genere un desbalance entre la producción de nitrito y su reducción a amonio debido a una perturbación en el control de las enzimas NR A, NapA, NirB y NrfA y/o a los transportadores involucrados NarK, NarU y NirC.

La adición de nitrito a cultivos de *E. coli* disminuyó su crecimiento, y éste efecto se potenció al suministrar simultáneamente telurito (Figura 10). Es posible que durante el crecimiento en medio MD, nitrito y telurito ataquen blancos diferentes y en consecuencia, que se potencie su toxicidad al adicionarlos simultáneamente, o bien, que al agregarlos en conjunto se genere un efecto tóxico distinto como podría ocurrir a través de la generación de RNS. Esto no se observó en el caso de cultivos en medio LB.

La exposición conjunta a nitrito y telurito disminuyó el crecimiento de las mutantes *E. coli* $\Delta nrfA$ y $\Delta nirB$ respecto a la cepa parental (Figura 11). Esto indica que la disminución de los niveles de nitrito vía su reducción por NrfA y NirB -nitrito reductasa del periplasma y del citoplasma, respectivamente- es relevante para la resistencia a telurito. Además, concuerda con el efecto del nitrato visto anteriormente en las mutantes *E. coli* $\Delta napA$, $\Delta nrfA$ y $\Delta nirB$ expuestas a telurito, que también podría deberse a la acumulación de nitrito en el interior de la bacteria. Aunque no se esperaba, se observó que nitrito y telurito también afectan el crecimiento de la mutante *E. coli* $\Delta napA$. Se ha observado previamente que algunos de los genes que codifican para la nitrato reductasa periplasmática son regulados por telurito y NsrR (Díaz-Vásquez et al., 2014; Filenko et al., 2007). No obstante, aún no se ha demostrado la participación de esta enzima en la defensa contra telurito ni estrés nitrosativo en *E. coli*.

En vista de los resultados y considerando que la toxicidad del nitrito está dada principalmente por la generación de óxido nítrico (NO^{\bullet}), se evaluó cepas mutantes en los genes que codifican para los reguladores transcripcionales NsrR y NorR. Estos pueden sensar el NO^{\bullet} e iniciar una respuesta apropiada contra el radical en *E. coli*. Se obtuvo que en la mutante *E. coli* ΔnorR cultivada con telurito y nitrato hay un menor crecimiento que en la cepa control. Esto permite especular que los genes regulados por NorR: *norVW*, que codifican para flavorubredoxina (FIRd), también podrían tener una participación importante durante la exposición a telurito. Por su parte, NsrR, que actúa como represor transcripcional, controla a varios genes de resistencia a estrés, por lo que en ausencia de éste se podría esperar que exista una expresión no regulada de todos ellos, y por lo tanto, mientras algunos podrían favorecer el crecimiento, otros podrían perjudicarlo en las condiciones de ensayo, llevando a que en conjunto no se observen diferencias en el desempeño de la mutante respecto a la cepa control.

Luego se evaluó si las enzimas reguladas por NorR y NsrR que detoxifican NO^{\bullet} -FIRd, Hmp y Hcp- se relacionan con la resistencia a telurito en presencia de nitrato. Se evaluó el crecimiento de cepas mutantes en los genes correspondientes (*norV*, *hmp*, *hcp*) y todas ellas fueron afectadas por telurito de forma similar a la cepa control en medio MD. En este medio y en presencia de nitrato las mutantes ΔnorV y Δhmp presentaron un menor crecimiento, mientras que la mutante en *hcp* no exhibió diferencias respecto a la parental (Figura 13). Si NorV y Hmp son requeridas para la resistencia a telurito, se puede suponer que hay generación de NO^{\bullet} debido a la reducción sucesiva de nitrato y nitrito. La ausencia de efecto en la mutante Δhcp podría deberse a que los niveles del radical son suficientes para la inhibición de esta enzima

(Wang et al., 2016), por lo que no tendría participación en la detoxificación en las condiciones ensayadas.

Los principales resultados obtenidos en esta Tesis se resumen en la Figura 14, donde se evaluó la participación del metabolismo del nitrato y nitrito en la resistencia a telurito utilizando cepas mutantes en genes que participan en el mismo. Los resultados muestran que las cepas *E. coli* $\Delta napA$, $\Delta nirB$, $\Delta norR$, $\Delta norV$ y Δhmp son más sensibles al tóxico que la cepa control, lo que ocurre solamente cuando el sustrato de la vía, nitrato, está presente en el medio de cultivo.

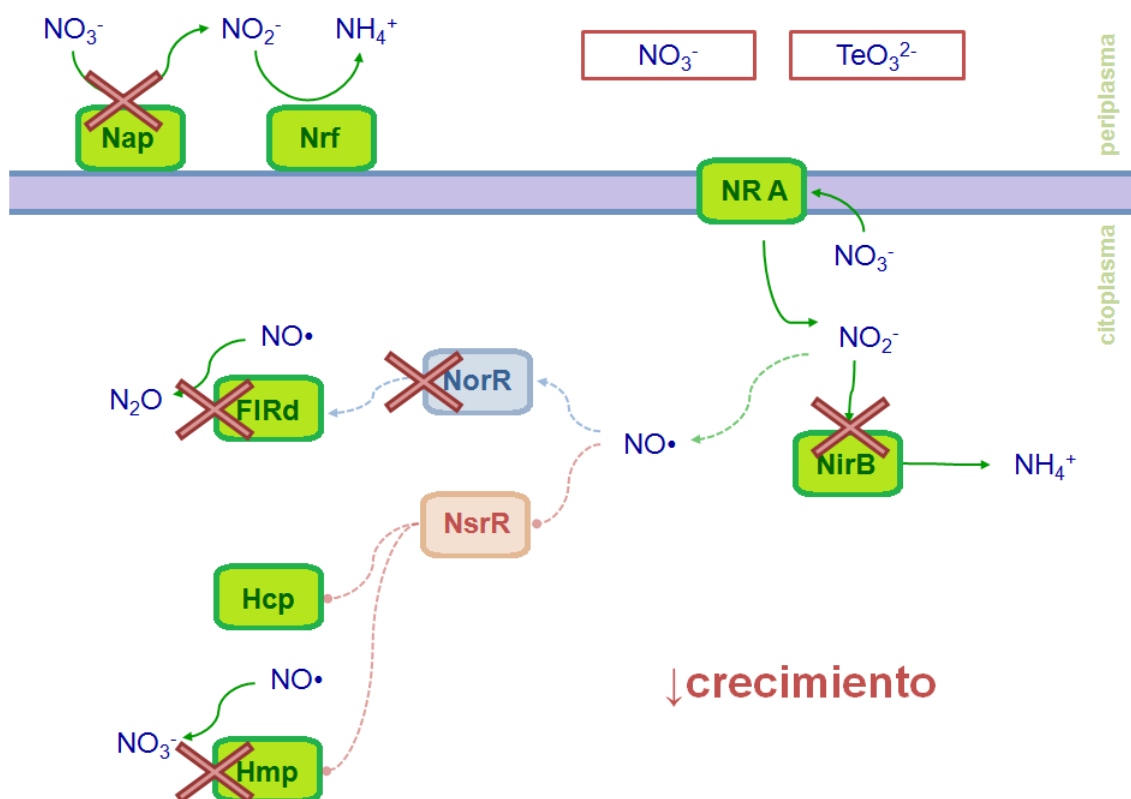


Figura 14. Esquema resumen de los efectos del nitrato y telurito sobre el crecimiento de *E. coli*. Se observó disminución del crecimiento de cepas mutantes en los genes que codifican para las enzimas marcadas con una cruz roja (*napA*, *nirB*, *norR*, *norV*, *hmp*).

CONCLUSIÓN

La evidencia experimental obtenida, en conjunto con los antecedentes disponibles, permiten concluir que la nitrato reductasa A de *E. coli* requiere de otras enzimas del metabolismo del nitrato y nitrito, Nap y NirB, para conferir resistencia a telurito en cultivos que contienen nitrato. Contrario a lo propuesto en la hipótesis, la nitrato reductasa del periplasma NrfA no es requerida para la resistencia al tóxico. Se infiere que la toxicidad del telurito aumenta con la presencia de nitrato debido a su reducción a nitrito y óxido nítrico, que en conjunto producirían inhibición del crecimiento bacteriano.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, G., Gomes, C., González, C., y Rodríguez Lemoine, V. (2000). On the mechanism of resistance to channel-forming colicins (PacB) and tellurite, encoded by plasmid Mip233 (InchI3). *FEMS Microbiol. Lett.* **192**, 257–261.
- Aradská, J., Smidák, R., Turkovičová, L., Turňa, J., y Lubec, G. (2013). Proteomic differences between tellurite-sensitive and tellurite-resistant *E. coli*. *PLoS One* **8**, e78010.
- Aragão, D., Mitchell, E.P., Frazão, C.F., Carrondo, M.A., y Lindley, P.F. (2008). Structural and functional relationships in the hybrid cluster protein family: Structure of the anaerobically purified hybrid cluster protein from *Desulfovibrio vulgaris* at 1.35 Å resolution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **64**, 665–674.
- Arenas, F.A., Díaz, W.A., Leal, C.A., Pérez-Donoso, J.M., Imlay, J.A., y Vásquez, C.C. (2010). The *Escherichia coli* *btuE* gene, encodes a glutathione peroxidase that is induced under oxidative stress conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **398**, 690–694.
- Arendsen, A.F., Hadden, J., Card, G., McAlpine, A.S., Bailey, S., Zaitsev, V., Duke, E.H.M., Lindley, P.F., Kröckel, M., Trautwein, A.X., et al. (1998). The “prismane” protein resolved: X-ray structure at 1.7 Å and multiple spectroscopy of two novel 4Fe clusters. *J. Biol. Inorg. Chem.* **3**, 81–95.
- Avazeri, C., Turner, R.J., Pommier, J., Weiner, J.H., Giordano, G., y Vermeglio, A. (1997). Tellurite reductase activity of nitrate reductase is responsible for the basal resistance of *Escherichia coli* to tellurite. *Microbiology* **143**, 1181–1189.
- Ba, L.A., Döring, M., Jamier, V., y Jacob, C. (2010). Tellurium: an element with great biological potency and potential. *Org. Biomol. Chem.* **8**, 4203–4216.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. a, Tomita, M., Wanner, B.L., y Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2**, 2006.0008.
- Baerman, S.M., Bullen, T.D., Dewald, J., Zhang, D., Curran, S., Islam, F.S., Beveridge, T.J., y Oremland, R.S. (2007). Formation of tellurium nanocrystals during anaerobic growth of bacteria that use Te oxyanions as respiratory electron acceptors. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 2135–2143.
- Baerman, S.M., Stolz, J.F., Kulp, T.R., y Oremland, R.S. (2009). Enrichment and isolation of *Bacillus beveridgei* sp. nov., a facultative anaerobic haloalkaliphile from Mono Lake, California, that respire oxyanions of tellurium, selenium, and arsenic. *Extremophiles* **13**, 695–705.
- Bang, I.S., Liu, L., Vazquez-Torres, A., Crouch, M.L., Stamler, J.S., y Fang, F.C. (2006). Maintenance of nitric oxide and redox homeostasis by the *Salmonella* flavohemoglobin Hmp. *J. Biol. Chem.* **281**, 28039–28047.
- Bartberger, M.D., Liu, W., Ford, E., Miranda, K.M., Switzer, C., Fukuto, J.M., Farmer, P.J., Wink, D.A., y Houk, K.N. (2002). The reduction potential of nitric oxide (NO) and its importance to NO biochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 10958–10963.
- Blasco, F., Nunzi, F., Pommier, J., Brasseur, R., Chippaux, M., y Giordano, G. (1992a). Formation of active heterologous nitrate reductases between nitrate reductases A and Z of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **6**, 209–219.
- Blasco, F., Pommier, J., Augier, V., Chippaux, M., y Giordano, G. (1992b). Involvement of the *narJ* or *narW* gene product in the formation of active nitrate reductase in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **6**, 221–230.
- Bodenmiller, D.M., y Spiro, S. (2006). The *yjeB* (*nsrR*) gene of *Escherichia coli* encodes a nitric oxide-sensitive transcriptional regulator. *J. Bacteriol.* **188**, 874–881.

- Bonnefoy, V., y Demoss, J.A. (1994). Nitrate reductases in *Escherichia coli*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **66**, 47–56.
- Borsetti, F., Tremaroli, V., Michelacci, F., Borghese, R., Winterstein, C., Daldal, F., y Zannoni, D. (2005). Tellurite effects on *Rhodobacter capsulatus* cell viability and superoxide dismutase activity under oxidative stress conditions. *Res. Microbiol.* **156**, 807–813.
- Bosworth, C.A., Toledo, J.C., Zmijewski, J.W., Li, Q., y Lancaster, J.R. (2009). Dinitrosyliron complexes and the mechanism(s) of cellular protein nitrosothiol formation from nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 4671–4676.
- Bowman, L.A., McLean, S., Poole, R.K., y Fukuto, J.M. (2011). The diversity of microbial responses to nitric oxide and agents of nitrosative stress: Close cousins but not identical twins. *Adv. Microb. Physiol.* **59**, 135–219.
- Bren, A., Park, J.O., Towbin, B.D., Dekel, E., Rabinowitz, J.D., y Alon, U. (2016). Glucose becomes one of the worst carbon sources for *E. coli* on poor nitrogen sources due to suboptimal levels of cAMP. *Sci. Rep.* **6**, 2–11.
- Brown, G.C. (1999). Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochim. Biophys. Acta* **1411**, 351–369.
- Bryan, N.S., y Grisham, M.B. (2007). Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic. Biol. Med.* **43**, 645–657.
- Burney, S., Caulfield, J.L., Niles, J.C., Wishnok, J.S., y Tannenbaum, S.R. (1999). The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutat. Res.* **424**, 37–49.
- Butler, C.S., Forte, E., Maria Scandurra, F., Arese, M., Giuffr , A., Greenwood, C., y Sarti, P. (2002). Cytochrome *bo3* from *Escherichia coli*: The binding and turnover of nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296**, 1272–1278.
- Calderón, I.L., Arenas, F.A., Pérez, J.M., Fuentes, D.E., Araya, M.A., Saavedra, C.P., Tantaleán, J.C., Pichuantes, S.E., Youderian, P.A., y Vásquez, C.C. (2006). Catalases are NAD(P)H-dependent tellurite reductases. *PLoS One* **1**, e70.
- Calderón, I.L., Elías, A.O., Fuentes, E.L., Pradenas, G.A., Castro, M.E., Arenas, F.A., Pérez, J.M., y Vásquez, C.C. (2009). Tellurite-mediated disabling of [4Fe-4S] clusters of *Escherichia coli* dehydratases. *Microbiology* **155**, 1840–1846.
- Carreté, L., Ksiezopolska, E., Pegueroles, C., G mez-Molero, E., Saus, E., Iraola-Guzmán, S., Loska, D., Bader, O., Fairhead, C., y Gabaldón, T. (2018). Patterns of genomic variation in the opportunistic pathogen *Candida glabrata* suggest the existence of mating and a secondary association with humans. *Curr. Biol.* **28**, 15–27. e7.
- Castro, M.E., Molina, R., Díaz, W., Pichuantes, S.E., y Vásquez, C.C. (2008). The dihydrolipoamide dehydrogenase of *Aeromonas caviae* ST exhibits NADH-dependent tellurite reductase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **375**, 91–94.
- Castro, M.E., Molina, R.C., Díaz, W.A., Pradenas, G.A., y Vásquez, C.C. (2009). Expression of *Aeromonas caviae* ST pyruvate dehydrogenase complex components mediate tellurite resistance in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **380**, 148–152.
- Chasteen, T.G., Fuentes, D.E., Tantaleán, J.C., y Vásquez, C.C. (2009). Tellurite: history, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**, 820–832.
- Chazotte-Aubert, L., Oikawa, S., Gilibert, I., Bianchini, F., Kawanishi, S., y Ohshima, H. (1999). Cytotoxicity and site-specific DNA damage induced by nitroxyl anion (NO⁻) in the presence of hydrogen peroxide. Implications for various pathophysiological conditions. *J. Biol. Chem.* **274**, 20909–20915.
- Chubukov, V., Gerosa, L., Kochanowski, K., y Sauer, U. (2014). Coordination of microbial metabolism. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 327–340.
- Cole, J. (1996). Nitrate reduction to ammonia by enteric bacteria: redundancy, or a strategy for survival during oxygen starvation? *FEMS Microbiol. Lett.* **136**, 1–11.
- Concepción-Acevedo, J., Weiss, H.N., Chaudhry, W.N., y Levin, B.R. (2015). Malthusian parameters as estimators of the fitness of microbes: a cautionary tale about the low side of high throughput. *PLoS One* **10**, e0126915.

- Contreras, N.P., y Vásquez, C.C. (2010). Tellurite-induced carbonylation of the *Escherichia coli* pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Arch. Microbiol.* **192**, 969–973.
- Cruz-Ramos, H., Crack, J., Wu, G., Hughes, M.N., Scott, C., Thomson, A.J., Green, J., y Poole, R.K. (2002). NO sensing by FNR: Regulation of the *Escherichia coli* NO-detoxifying flavohaemoglobin, Hmp. *EMBO J.* **21**, 3235–3244.
- D'Autreaux, B., Touati, D., Bersch, B., Latour, J.-M., y Michaud-Soret, I. (2002). Direct inhibition by nitric oxide of the transcriptional ferric uptake regulation protein via nitrosylation of the iron. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 16619–16624.
- D'Autréaux, B., Tucker, N.P., Dixon, R., y Spiro, S. (2005). A non-haem iron centre in the transcription factor NorR senses nitric oxide. *Nature* **437**, 769–772.
- De Groote, M.A., Granger, D., Xu, Y., Campbell, G., Prince, R., y Fang, F.C. (1995). Genetic and redox determinants of nitric oxide cytotoxicity in a *Salmonella typhimurium* model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 6399–6403.
- DeMoss, J.A., y Hsu, P.Y. (1991). NarK enhances nitrate uptake and nitrite excretion in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**, 3303–3310.
- Díaz-Vásquez, W.A., Abarca-Lagunas, M.J., Arenas, F.A., Pinto, C.A., Cornejo, F.A., Wansapura, P.T., Apphamillage, G.A., Chasteen, T.G., y Vásquez, C.C. (2014). Tellurite reduction by *Escherichia coli* NDH-II dehydrogenase results in superoxide production in membranes of toxicant-exposed cells. *Biometals* **27**, 237–246.
- Díaz-Vásquez, W.A., Abarca-Lagunas, M.J., Cornejo, F.A., Pinto, C.A., Arenas, F.A., y Vásquez, C.C. (2015). Tellurite-mediated damage to the *Escherichia coli* NDH-dehydrogenases and terminal oxidases in aerobic conditions. *Arch. Biochem. Biophys.* **566**, 67–75.
- Ding, H., y Demple, B. (2000). Direct nitric oxide signal transduction via nitrosylation of iron-sulfur centers in the SoxR transcription activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 5146–5150.
- Duhl, K.L., Tefft, N.M., y TerAvest, M.A. (2018). *Shewanella oneidensis* MR-1 utilizes both sodium- and proton-pumping NADH dehydrogenases during aerobic growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **84**, 1–12.
- Elías, A.O., Abarca, M.J., Montes, R.A., Chasteen, T.G., Pérez-Donoso, J.M., y Vásquez, C.C. (2012). Tellurite enters *Escherichia coli* mainly through the PitA phosphate transporter. *Microbiologyopen* **1**, 259–267.
- Fang, F.C. (2004). Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 820–832.
- Fileiko, N., Spiro, S., Browning, D.F., Squire, D., Overton, T.W., Cole, J., y Constantinidou, C. (2007). The NsrR Regulon of *Escherichia coli* K-12 includes genes encoding the Hybrid Cluster Protein and the periplasmic, respiratory nitrite reductase. *J. Bacteriol.* **189**, 4410–4417.
- Fileiko, N.A., Browning, D.F., y Cole, J.A. (2005). Transcriptional regulation of a hybrid cluster (prismane) protein. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 195–197.
- Fleming, A. (1932). On the specific antibacterial properties of penicillin and potassium tellurite. *J. Pathol. Bacteriol.* **35**, 831–842.
- Fuentes, D.E., Fuentes, E.L., Castro, M.E., Pérez, J.M., Araya, M.A., Chasteen, T.G., Pichuantes, S.E., y Vásquez, C.C. (2007). Cysteine metabolism-related genes and bacterial resistance to potassium tellurite. *J. Bacteriol.* **189**, 8953–8960.
- Gardner, P.R. (2005). Nitric oxide dioxygenase function and mechanism of flavohemoglobin, hemoglobin, myoglobin and their associated reductases. *J. Inorg. Biochem.* **99**, 247–266.
- Gardner, A.M., y Gardner, P.R. (2002). Flavohemoglobin detoxifies nitric oxide in aerobic, but not anaerobic, *Escherichia coli*: Evidence for a novel inducible anaerobic nitric oxide-scavenging activity. *J. Biol. Chem.* **277**, 8166–8171.
- Gardner, A.M., Helmick, R.A., y Gardner, P.R. (2002). Flavorubredoxin, an inducible catalyst for nitric oxide reduction and detoxification in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **277**, 8172–8177.
- Gardner, P.R., Costantino, G., Szabó, C., y Salzman, A.L. (1997). Nitric oxide sensitivity of the aconitases. *J. Biol. Chem.* **272**, 25071–25076.

- Gardner, P.R., Gardner, A.M., Martin, L.A., y Salzman, A.L. (1998). Nitric oxide dioxygenase: an enzymic function for flavohemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 10378–10383.
- Gaston, B., Reilly, J., Drazen, J.M., Fackler, J., Ramdev, P., Arnelle, D., Mullins, M.E., Sugarbaker, D.J., Chee, C., y Singel, D.J. (1993). Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 10957–10961.
- Gomes, C.M., Giuffrè, A., Forte, E., Vicente, J.B., Saraiva, L.M., Brunori, M., y Teixeira, M. (2002). A novel type of nitric-oxide reductase: *Escherichia coli* flavorubredoxin. *J. Biol. Chem.* **277**, 25273–25276.
- Grove, J., Tanapongpipat, S., Thomas, G., Griffiths, L., Crooke, H., y Cole, J. (1996). *Escherichia coli* K-12 genes essential for the synthesis of c-type cytochromes and a third nitrate reductase located in the periplasm. *Mol. Microbiol.* **19**, 467–481.
- Guzzo, J., y Dubow, M.S. (2000). A novel selenite- and tellurite-inducible gene in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4972–4978.
- Hall, B.G., Acar, H., Nandipati, A., y Barlow, M. (2014). Growth rates made easy. *Mol. Biol. Evol.* **31**, 232–238.
- Harborne, N.R., Griffiths, L., Busby, S.J.W., y Cole, J.A. (1992). Transcriptional control, translation and function of the products of the five open reading frames of the *Escherichia coli* *nir* operon. *Mol. Microbiol.* **6**, 2805–2813.
- Harrison, J.J., Ceri, H., Stremick, C.A., y Turner, R.J. (2004). Biofilm susceptibility to metal toxicity. *Environ. Microbiol.* **6**, 1220–1227.
- Hausladen, A., Privalle, C.T., Keng, T., DeAngelo, J., y Stamler, J.S. (1996). Nitrosative stress: Activation of the transcription factor OxyR. *Cell* **86**, 719–729.
- Hausladen, A., Gow, A.J., y Stamler, J.S. (1998). Nitrosative stress: metabolic pathway involving the flavohemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 14100–14105.
- Herrera Paredes, S., Gao, T., Law, T.F., Finkel, O.M., Mucyn, T., Teixeira, P.J.P.L., Salas González, I., Feltcher, M.E., Powers, M.J., Shank, E.A., et al. (2018). Design of synthetic bacterial communities for predictable plant phenotypes. *PLOS Biol.* **16**, e2003962.
- Hogg, N., y Kalyanaraman, B. (1999). Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta* **1411**, 378–384.
- Hornik, K. (2018). The R FAQ. The Comprehensive R Archive Network. <https://cran.r-project.org/doc/FAQ/R-FAQ.html> (25/01/2019)
- Hughes, M.N. (2008). Chemistry of nitric oxide and related species. *Methods Enzym.* **436**, 3–19.
- Hutchings, M.I., Mandhana, N., y Spiro, S. (2002). The NorR protein of *Escherichia coli* activates expression of the flavorubredoxin gene *norV* in response to reactive nitrogen species. *J. Bacteriol.* **184**, 4640–4643.
- Iobbi-Nivol, C., Santini, C.-L., Blasco, F., y Giordano, G. (1990). Purification and further characterization of the second nitrate reductase of *Escherichia coli* K12. *Eur. J. Biochem.* **188**, 679–687.
- Jarboe, L.R., Hyduke, D.R., Tran, L.M., Chou, K.J.Y., y Liao, J.C. (2008). Determination of the *Escherichia coli* S-nitrosoglutathione response network using integrated biochemical and systems analysis. *J. Biol. Chem.* **283**, 5148–5157.
- Justino, M.C., Vicente, J.B., Teixeira, M., y Saraiva, L.M. (2005). New genes implicated in the protection of anaerobically grown *Escherichia coli* against nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **280**, 2636–2643.
- Justino, M.C., Almeida, C.C., Teixeira, M., y Saraiva, L.M. (2007). *Escherichia coli* di-iron YtfE protein is necessary for the repair of stress-damaged iron-sulfur clusters. *J. Biol. Chem.* **282**, 10352–10359.
- Kahm, M., Kahm, M., Hasenbrink, G., Lichtenberg-Frate, H., Ludwig, J., y Kschischo, M. (2010). Grofit: Fitting biological growth curves. *Nat. Preced.* **33**.
- Kim, S.O., Orii, Y., Lloyd, D., Hughes, M.N., y Poole, R.K. (1999). Anoxic function for the *Escherichia coli* flavohaemoglobin (Hmp): Reversible binding of nitric oxide and reduction to nitrous oxide. *FEBS Lett.* **445**, 389–394.
- Klonowska, A., Heulin, T., y Vermeglio, A. (2005). Selenite and tellurite reduction by *Shewanella oneidensis*.

Appl. Environ. Microbiol. 71, 5607–5609.

Landry, A.P., Duan, X., Huang, H., y Ding, H. (2011). Iron-sulfur proteins are the major source of protein-bound dinitrosyl iron complexes formed in *Escherichia coli* cells under nitric oxide stress. *Free Radic. Biol. Med.* 50, 1582–1590.

Lithgow, J.K., Hayhurst, E.J., Cohen, G., Aharonowitz, Y., y Foster, S.J. (2004). Role of a cysteine synthase in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 186, 1579–1590.

Lobysheva, I.I., Stupakova, M. V., Mikoyan, V.D., Vasilieva, S. V., y Vanin, A.F. (1999). Induction of the SOS DNA repair response in *Escherichia coli* by nitric oxide donating agents: dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands and S-nitrosothiols. *FEBS Lett.* 454, 177–180.

Lohmeier-Vogel, E.M., Ung, S., y Turner, R.J. (2004). In vivo ³¹P nuclear magnetic resonance investigation of tellurite toxicity in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7342–7347.

Loisel-Meyer, S., De Bagüés, M.P.J., Bassères, E., Dornand, J., Köhler, S., Liautard, J.P., y Jubier-Maurin, V. (2006). Requirement of *norD* for *Brucella suis* virulence in a murine model of *in vitro* and *in vivo* infection. *Infect. Immun.* 74, 1973–1976.

Lundberg, J.O., Weitzberg, E., y Gladwin, M.T. (2008). The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 156–167.

Maia, L.B., y Moura, J.J.G. (2014). How biology handles nitrite. *Chem. Rev.* 114, 5273–5357.

Miyamoto, K., Nakahigashi, K., Nishimura, K., y Inokuchi, H. (1991). Isolation and characterization of visible light-sensitive mutants of *Escherichia coli* K12. *J. Mol. Biol.* 219, 393–398.

Molina-Quiroz, R.C., Loyola, D.E., Díaz-Vásquez, W.A., Arenas, F.A., Urzúa, U., Pérez-Donoso, J.M., y Vásquez, C.C. (2014). Global transcriptomic analysis uncovers a switch to anaerobic metabolism in tellurite-exposed *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* 165, 566–570.

Möller, M., Habig, M., Freitag, M., y Stukenbrock, E.H. (2018). Extraordinary genome instability and widespread chromosome rearrangements during vegetative growth. *Genetics* 210, 517–529.

Moore, M.D., y Kaplan, S. (1992). Identification of intrinsic high-level resistance to rare-earth oxides and oxyanions in members of the class *Proteobacteria*: characterization of tellurite, selenite, and rhodium sesquioxide reduction in *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 174, 1505–1514.

Morales, E.H., Pinto, C.A., Luraschi, R., Muñoz-Villagrán, C.M., Cornejo, F.A., Simpkins, S.W., Nelson, J., Arenas, F.A., Piotrowski, J.S., Myers, C.L., et al. (2017). Accumulation of heme biosynthetic intermediates contributes to the antibacterial action of the metalloid tellurite. *Nat. Commun.* 8, 15320.

Moroz, L.L., y Kohn, A.B. (2011). Parallel evolution of nitric oxide signaling: diversity of synthesis and memory pathways. *Front. Biosci.* 17, 2008–2051.

Mukhopadhyay, P., Zheng, M., Bedzyk, L.A., LaRossa, R.A., y Storz, G. (2004). Prominent roles of the NorR and Fur regulators in the *Escherichia coli* transcriptional response to reactive nitrogen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 745–750.

Nathan, C., y Shiloh, M.U. (2000). Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 8841–8848.

O’Gara, J.P., Gomelsky, M., y Kaplan, S. (1997). Identification and molecular genetic analysis of multiple *loci* contributing to high-level tellurite resistance in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4713–4720.

Pacelli, R., Wink, D.A., Cook, J.A., Krishna, M.C., DeGraff, W., Friedman, N., Tsokos, M., Samuni, A., y Mitchell, J.B. (1995). Nitric oxide potentiates hydrogen peroxide-induced killing of *Escherichia coli*. *J. Exp. Med.* 182, 1469–1479.

Page, L., Griffiths, L., y Cole, J.A. (1990). Different physiological roles of two independent pathways for nitrite reduction to ammonia by enteric bacteria. *Arch. Microbiol.* 154, 349–354.

Partridge, J.D., Bodenmiller, D.M., Humphrys, M.S., y Spiro, S. (2009). NsrR targets in the *Escherichia coli* genome: New insights into DNA sequence requirements for binding and a role for NsrR in the regulation of motility. *Mol. Microbiol.* 73, 680–694.

Pearl, R. (1927). The growth of populations. *Q. Rev. Biol.* 2, 532–548.

- Pearl, R., y Reed, L.J. (1920). On the rate of growth of the population of the United States since 1790 and its mathematical representation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 6, 275–288.
- Pereira, A.S., Tavares, P., Krebs, C., Huynh, B.H., Rusnak, F., Moura, I., y Moura, J.J.G. (1999). Biochemical and spectroscopic characterization of overexpressed fuscodoxin from *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260, 209–215.
- 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., y Vásquez, C.C. (2007). Bacterial toxicity of potassium tellurite: unveiling an ancient enigma. *PLoS One* 2, e211.
- Pérez, J.M., Arenas, F.A., Pradenas, G.A., Sandoval, J.M., y Vásquez, C.C. (2008). *Escherichia coli* YqhD exhibits aldehyde reductase activity and protects from the harmful effect of lipid peroxidation-derived aldehydes. *J. Biol. Chem.* 283, 7346–7353.
- Poock, S.R., Leach, E.R., Moir, J.W.B., Cole, J.A., y Richardson, D.J. (2002). Respiratory detoxification of nitric oxide by the cytochrome c nitrite reductase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 277, 23664–23669.
- Poole, R.K. (2005). Nitric oxide and nitrosative stress tolerance in bacteria. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 176–180.
- Potter, L.C., Millington, P., Griffiths, L., Thomas, G.H., y Cole, J.A. (1999). Competition between *Escherichia coli* strains expressing either a periplasmic or a membrane-bound nitrate reductase: does Nap confer a selective advantage during nitrate-limited growth? *Biochem. J.* 344 Pt 1, 77–84.
- Pradenas, G.A., Paillavil, B.A., Reyes-Cerpa, S., Pérez-Donoso, J.M., y Vásquez, C.C. (2012). Reduction of the monounsaturated fatty acid content of *Escherichia coli* results in increased resistance to oxidative damage. *Microbiology* 158, 1279–1283.
- Pradenas, G.A., Díaz-Vásquez, W.A., Pérez-Donoso, J.M., y Vásquez, C.C. (2013). Monounsaturated fatty acids are substrates for aldehyde generation in tellurite-exposed *Escherichia coli*. *Biomed Res. Int.* 2013, 563756.
- Prolo, C., Álvarez, M.N., y Radi, R. (2014). Peroxynitrite, a potent macrophage-derived oxidizing cytotoxin to combat invading pathogens. *BioFactors* 40, 215–225.
- Prolo, C., Álvarez, M.N., Ríos, N., Peluffo, G., Radi, R., y Romero, N. (2015). Nitric oxide diffusion to red blood cells limits extracellular, but not intraphagosomal, peroxynitrite formation by macrophages. *Free Radic. Biol. Med.* 87, 346–355.
- Pullan, S.T., Gidley, M.D., Jones, R.A., Barrett, J., Stevanin, T.M., Read, R.C., Green, J., y Poole, R.K. (2007). Nitric oxide in chemostat-cultured *Escherichia coli* is sensed by Fnr and other global regulators: unaltered methionine biosynthesis indicates lack of S nitrosation. *J. Bacteriol.* 189, 1845–1855.
- R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing (R Foundation for Statistical Computing).
- Reinoso, C.A., Auger, C., Appanna, V.D., y Vásquez, C.C. (2012). Tellurite-exposed *Escherichia coli* exhibits increased intracellular α -ketoglutarate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 421, 721–726.
- Reinoso, C.A., Appanna, V.D., y Vásquez, C.C. (2013). α -ketoglutarate accumulation is not dependent on isocitrate dehydrogenase activity during tellurite detoxification in *Escherichia coli*. *Biomed Res. Int.* 2013, 784190.
- Reitzer, L. (2003). Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 155–176.
- Rockwood, L.L. (2015). Introduction to population ecology (Oxford: John Wiley & Sons Ltd).
- Rojas, D.M., y Vásquez, C.C. (2005). Sensitivity to potassium tellurite of *Escherichia coli* cells deficient in CSD, CsdB and IscS cysteine desulfurases. *Res. Microbiol.* 156, 465–471.
- Roy, B., Lepoivre, M., Henry, Y., y Fontecave, M. (1995). Inhibition of ribonucleotide reductase by nitric oxide derived from thionitrites: reversible modifications of both subunits. *Biochemistry* 34, 5411–5418.
- Sambrook, J., y Russell, D. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sandoval, J.M., Arenas, F.A., y Vásquez, C.C. (2011). Glucose-6-phosphate dehydrogenase protects *Escherichia coli* from tellurite-mediated oxidative stress. *PLoS One* 6, e25573.

- Schapiro, J.M., Libby, S.J., y Fang, F.C. (2003). Inhibition of bacterial DNA replication by zinc mobilization during nitrosative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 8496–8501.
- Schouten, K.A., y Weiss, B. (1999). Endonuclease V protects *Escherichia coli* against specific mutations caused by nitrous acid. *Mutat. Res.* *435*, 245–254.
- Seth, D., Hausladen, A., Wang, Y.J., y Stamler, J.S. (2012). Endogenous protein S-nitrosylation in *E. coli*: regulation by OxyR. *Science* *336*, 470–473.
- Shiloh, M.U., MacMicking, J.D., Nicholson, S., Brause, J.E., Potter, S., Marino, M., Fang, F., Dinauer, M., y Nathan, C. (1999). Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. *Immunity* *10*, 29–38.
- Spallholz, J.E. (1994). On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. *Free Radic. Biol. Med.* *17*, 45–64.
- Spiro, S. (2007). Regulators of bacterial responses to nitric oxide. *FEMS Microbiol. Rev.* *31*, 193–211.
- Sprouffske, K., y Wagner, A. (2016). Growthcurver: an R package for obtaining interpretable metrics from microbial growth curves. *BMC Bioinformatics* *17*, 172.
- Sprouffske, K., Aguilar-Rodríguez, J., Sniegowski, P., y Wagner, A. (2018). High mutation rates limit evolutionary adaptation in *Escherichia coli*. *PLOS Genet.* *14*, e1007324.
- Stamler, J.S. (1994). Redox signaling: Nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* *78*, 931–936.
- Stamler, J.S., Singel, D.J., y Loscalzo, J. (1992). Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* *258*, 1898–1902.
- Stevanin, T.M., Ioannidis, N., Mills, C.E., Kim, S.O., Hughes, M.N., y Poole, R.K. (2000). Flavohemoglobin Hmp affords inducible protection for *Escherichia coli* respiration, catalyzed by cytochromes *bo'* or *bd*, from nitric oxide. *J. Biol. Chem.* *275*, 35868–35875.
- Stevanin, T.M., Moir, J.W.B., y Read, R.C. (2005). Nitric oxide detoxification systems enhance survival of *Neisseria meningitidis* in human macrophages and in nasopharyngeal mucosa. *Infect. Immun.* *73*, 3322–3329.
- Stewart, V., Lu, Y., y Darwin, A.J. (2002). Periplasmic Nitrate Reductase (NapABC Enzyme) supports anaerobic respiration by *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* *184*, 1314–1323.
- Summers, A.O., y Jacoby, G.A. (1977). Plasmid-determined resistance to tellurium compounds. *J. Bacteriol.* *129*, 276–281.
- Tantaleán, J.C., Araya, M.A., Saavedra, C.P., Fuentes, D.E., Pérez, J.M., Calderón, I.L., Youderian, P., y Vásquez, C.C. (2003). The *Geobacillus stearothermophilus* V *iscS* gene, encoding cysteine desulfurase, confers resistance to potassium tellurite in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* *185*, 5831–5837.
- Taylor, D.E. (1999). Bacterial tellurite resistance. *Trends Microbiol.* *7*, 111–115.
- Tiso, M., y Schechter, A.N. (2015). Nitrate reduction to nitrite, nitric oxide and ammonia by gut bacteria under physiological conditions. *PLoS One* *10*, e0119712.
- Tomás, J.M., y Kay, W.W. (1986). Tellurite susceptibility and non-plasmid-mediated resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *30*, 127–131.
- Torres-Cortés, G., Bonneau, S., Bouchez, O., Genthon, C., Briand, M., Jacques, M.-A., y Barret, M. (2018). Functional microbial features driving community assembly during seed germination and emergence. *Front. Plant Sci.* *9*, 1–16.
- Tremaroli, V., Fedi, S., y Zannoni, D. (2007). Evidence for a tellurite-dependent generation of reactive oxygen species and absence of a tellurite-mediated adaptive response to oxidative stress in cells of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *Arch. Microbiol.* *187*, 127–135.
- Tremaroli, V., Workentine, M.L., Weljie, A.M., Vogel, H.J., Ceri, H., Viti, C., Tatti, E., Zhang, P., Hynes, A.P., Turner, R.J., et al. (2009). Metabolomic investigation of the bacterial response to a metal challenge. *Appl. Environ. Microbiol.* *75*, 719–728.
- Trutko, S.M., Akimenko, V.K., Suzina, N.E., Anisimova, L.A., Shlyapnikov, M.G., Baskunov, B.P., Duda, V.I., y Boronin, A.M. (2000). Involvement of the respiratory chain of Gram-negative bacteria in the reduction of

tellurite. *Arch. Microbiol.* **173**, 178–186.

Tucker, F.L., Walper, J.F., Appleman, M.D., y Donohue, J. (1962). Complete reduction of tellurite to pure tellurium metal by microorganisms. *J. Bacteriol.* **83**, 1313–1314.

Tucker, F.L., Thomas, J.W., Appleman, M.D., Goodman, S.H., y Donohue, J. (1966). X-ray diffraction studies on metal deposition in group D Streptococci. *J. Bacteriol.* **92**, 1311–1314.

Tucker, N.P., Hicks, M.G., Clarke, T. a., Crack, J.C., Chandra, G., Le Brun, N.E., Dixon, R., y Hutchings, M.I. (2008). The transcriptional repressor protein NsrR senses nitric oxide directly via a [2Fe-2S] cluster. *PLoS One* **3**, e3623.

Tucker, N.P., Le Brun, N.E., Dixon, R., y Hutchings, M.I. (2010). There's NO stopping NsrR, a global regulator of the bacterial NO stress response. *Trends Microbiol.* **18**, 149–156.

Turner, M.S., Tan, Y.P., y Giffard, P.M. (2007). Inactivation of an iron transporter in *Lactococcus lactis* results in resistance to tellurite and oxidative stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 6144–6149.

Turner, R.J., Weiner, J.H., y Taylor, D.E. (1995). The tellurite-resistance determinants *tehAtehB* and *klaAklABteIB* have different biochemical requirements. *Microbiology* **141**, 3133–3140.

Turner, R.J., Weiner, J.H., y Taylor, D.E. (1999). Tellurite-mediated thiol oxidation in *Escherichia coli*. *Microbiology* **145**, 2549–2557.

Turner, R.J., Aharonowitz, Y., Weiner, J.H., y Taylor, D.E. (2001). Glutathione is a target in tellurite toxicity and is protected by tellurite resistance determinants in *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* **47**, 33–40.

U.S. Geological Survey (2016). Mineral Commodities Summaries (Virginia). 202p. DOI 10.3133/70140094

Uden, G., y Bongaerts, J. (1997). Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: Energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1320**, 217–234.

Valdivia-González, M., Pérez-Donoso, J.M., y Vásquez, C.C. (2012). Effect of tellurite-mediated oxidative stress on the *Escherichia coli* glycolytic pathway. *Biomaterials* **25**, 451–458.

van den Berg, W.A.M., Hagen, W.R., y van Dongen, W.M.A.M. (2000). The hybrid-cluster protein ('prismane protein') from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **267**, 666–676.

van Iterson, W., y Leene, W. (1964a). A cytochemical localization of reductive sites in Gram-positive. Tellurite reduction in *Bacillus subtilis*. *J. Cell Biol.* **20**, 361–375.

van Iterson, W., y Leene, W. (1964b). A cytochemical localization of reductive sites in a Gram-negative bacterium. Tellurite reduction in *Proteus vulgaris*. *J. Cell Biol.* **20**, 377–387.

van Wonderen, J.H., Burlat, B., Richardson, D.J., Cheesman, M.R., y Butt, J.N. (2008). The nitric oxide reductase activity of cytochrome *c* nitrite reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **283**, 9587–9594.

Vásquez, C.C., Saavedra, C.P., Loyola, C.A., Araya, M.A., y Pichuanes, S. (2001). The product of the *cysK* gene of *Bacillus stearothermophilus* V mediates potassium tellurite resistance in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* **43**, 418–423.

Vatanever, F., de Melo, W.C.M.A., Avci, P., Vecchio, D., Sadasivam, M., Gupta, A., Chandran, R., Karimi, M., Parizotto, N.A., Yin, R., et al. (2013). Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species - bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**, 955–989.

Vázquez-Torres, A. (2012). Redox active thiol sensors of oxidative and nitrosative stress. *Antioxid. Redox Signal.* **17**, 1201–1214.

Vergnes, A., Gouffi-Belhabich, K., Blasco, F., Giordano, G., y Magalon, A. (2004). Involvement of the molybdenum cofactor biosynthetic machinery in the maturation of the *Escherichia coli* nitrate reductase A. *J. Biol. Chem.* **279**, 41398–41403.

Vine, C.E., y Cole, J.A. (2011). Nitrosative stress in *Escherichia coli*: reduction of nitric oxide. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 213–215.

Vogels, M., Zoeckler, R., Stasiw, D.M., y Cerny, L.C. (1975). P. F. Verhulst's "notice sur la loi que la populations suit dans son accroissement" from correspondence mathématique et physique. Ghent, vol. X, 1838. *J. Biol. Phys.* **3**, 183–192.

Wang, H., y Gunsalus, R.P. (2000). The *nrfA* and *nirB* nitrite reductase operons in *Escherichia coli* are expressed differently in response to nitrate than to nitrite. *J. Bacteriol.* **182**, 5813–5822.

- Wang, H., Tseng, C.P., y Gunsalus, R.P. (1999). The *napF* and *narG* nitrate reductase operons in *Escherichia coli* are differentially expressed in response to submicromolar concentrations of nitrate but not nitrite. *J. Bacteriol.* *181*, 5303–5308.
- Wang, J., Vine, C.E., Balasiny, B.K., Rizk, J., Bradley, C.L., Tinajero-Trejo, M., Poole, R.K., Bergaust, L.L., Bakken, L.R., y Cole, J.A. (2016). The roles of the hybrid cluster protein, Hcp and its reductase, Hcr, in high affinity nitric oxide reduction that protects anaerobic cultures of *Escherichia coli* against nitrosative stress. *Mol. Microbiol.* *100*, 877–892.
- Wein, T., Dagan, T., Fraune, S., Bosch, T.C.G., Reusch, T.B.H., y Hülter, N.F. (2018). Carrying capacity and colonization dynamics of *Curvibacter* in the *Hydra* host habitat. *Front. Microbiol.* *9*, 443.
- Weiss, B. (2006). Evidence for mutagenesis by nitric oxide during nitrate metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *188*, 829–833.
- Woodmansee, A.N., y Imlay, J.A. (2003). A mechanism by which nitric oxide accelerates the rate of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *49*, 11–22.
- Xia, Y. (2007). Superoxide generation from nitric oxide synthases. *Antioxid. Redox Signal.* *9*, 1773–1778.
- Xia, Y., y Zweier, J.L. (1997). Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 6954–6958.
- Yamamoto, N., Nakahigashi, K., Nakamichi, T., Yoshino, M., Takai, Y., Touda, Y., Furubayashi, A., Kinjyo, S., Dose, H., Hasegawa, M., et al. (2009). Update on the Keio collection of *Escherichia coli* single-gene deletion mutants. *Mol. Syst. Biol.* *5*, 335.
- Yurkov, V., Jappe, J., y Vermeglio, A. (1996). Tellurite resistance and reduction by obligately aerobic photosynthetic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* *62*, 4195–4198.
- Zhu, L., Gunn, C., y Beckman, J.S. (1992). Bactericidal activity of peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* *298*, 452–457.
- Zumft, W.G. (2005). Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory , heme – copper oxidase type. *J. Inorg. Biochem.* *99*, 194–215.

ANEXO

Tabla A 1. Parámetros determinados para el crecimiento de *E. coli* BW25113 en LB, LB con nitrato y LB con nitrito*. Se agregó nitrato de sodio (25 mM), nitrito de sodio (25 mM) y telurito de potasio (0,12 μ M). *r*, velocidad de crecimiento intrínseca; *K*, capacidad de carga; *t* gen, tiempo generacional; *t* mid, tiempo en que se alcanza *K*/2; ABC, área bajo la curva logística; ABCe, área bajo la curva experimental; sigma, índice de la calidad del ajuste de los datos a la curva logística; d.s., desviación estándar. Para más detalles ver Materiales y Métodos.

		LB			
		- telurito		+ telurito 0,12 μ M	
		promedio	d.s.	promedio	d.s.
r (h⁻¹)	-	1,032	0,039	1,071	0,100
	nitrato	1,159	0,009	1,161	0,051
	nitrito	0,748	0,031	0,697	0,016
K (Abs)	-	1,467	0,008	1,490	0,017
	nitrato	1,378	0,008	1,396	0,013
	nitrito	1,282	0,026	1,297	0,005
N₀ (Abs)	-	0,03199	0,00598	0,003642	0,005752
	nitrato	0,02219	0,00351	0,001454	0,002329
	nitrito	0,02288	0,00296	0,002357	0,000856
t gen (h)	-	0,6724	0,0250	0,6523	0,0593
	nitrato	0,5982	0,0044	0,5977	0,0265
	nitrito	0,9276	0,0379	0,9954	0,0230
t mid (h)	-	3,697	0,130	7,152	1,824
	nitrato	3,555	0,130	7,306	1,877
	nitrito	5,375	0,392	9,143	0,581
ABC	-	23,145	0,183	18,425	2,904
	nitrato	21,945	0,051	17,038	2,783
	nitrito	18,070	0,157	13,426	0,700
ABCe	-	23,037	0,186	18,339	2,870
	nitrato	21,863	0,057	16,976	2,757
	nitrito	17,986	0,163	13,436	0,675
sigma	-	0,0525	0,0022	0,0466	0,0061
	nitrato	0,0442	0,0014	0,0410	0,0030
	nitrito	0,0340	0,0021	0,0173	0,0008

* Se realizaron tres réplicas biológicas para cada condición. Todos los cultivos se realizaron simultáneamente.

Tabla A 2. Parámetros determinados para el crecimiento de *E. coli* BW25113 en MD, MD con nitrato y MD con nitrito*. Se agregó nitrato de sodio (25 mM), nitrito de sodio (5 mM) y telurito de potasio (1,0 μ M). *r*, velocidad de crecimiento intrínseca; *K*, capacidad de carga; *t* gen, tiempo generacional; *t* mid, tiempo en que se alcanza *K*/2; ABC, área bajo la curva logística; ABCe, área bajo la curva experimental; sigma, índice de la calidad del ajuste de los datos a la curva logística; d.s., desviación estándar. Para más detalles ver Materiales y Métodos.

		MD			
		- telurito		+ telurito 1,0 μ M	
		promedio	d.s.	promedio	d.s.
r (h⁻¹)	-	0,6052	0,0031	0,4141	0,0240
	nitrato	0,6621	0,0101	0,4520	0,0068
	nitrito	0,5666	0,0409	0,2003	0,0106
K (Abs)	-	1,103	0,013	1,175	0,006
	nitrato	1,088	0,018	1,171	0,013
	nitrito	1,054	0,016	1,104	0,387
N₀ (Abs)	-	0,02062	0,00149	0,009849	0,000582
	nitrato	0,02022	0,00031	0,004868	0,002073
	nitrito	0,01546	0,00157	0,021379	0,003673
t gen (h)	-	1,145	0,006	1,678	0,099
	nitrato	1,047	0,016	1,534	0,023
	nitrito	1,228	0,093	3,475	0,175
t mid (h)	-	6,547	0,130	11,574	0,742
	nitrato	5,994	0,135	12,305	1,329
	nitrito	7,449	0,396	19,510	2,048
ABC	-	14,808	0,092	9,972	0,796
	nitrato	15,214	0,162	9,079	1,399
	nitrito	13,200	0,332	3,810	0,553
ABCe	-	14,797	0,088	10,031	0,787
	nitrato	15,197	0,171	9,179	1,378
	nitrito	13,183	0,334	3,793	0,548
sigma	-	0,0287	0,0015	0,0292	0,0007
	nitrato	0,0307	0,0010	0,0278	0,0028
	nitrito	0,0237	0,0007	0,0084	0,0014

* Se realizaron tres réplicas biológicas para cada condición. Todos los cultivos se realizaron simultáneamente.

Tabla A 3. Área bajo la curva logística de cultivos de *E. coli* BW25113 en las condiciones indicadas.

Medio	Suplemento	-	Telurito	
			0,2 μ M	1,0 μ M
MD*	-	14,73	13,80	9,05
		14,91	14,40	10,44
		14,78	14,23	10,43
	nitrato 25 mM	15,04	14,03	7,48
		15,36	14,79	9,69
		15,23	14,63	10,07
	nitrito 5 mM	13,23	11,43	4,17
		13,51	11,95	4,09
		12,85	11,11	3,17
			Telurito	
			0,06 μ M	0,12 μ M
LB**	-	23,03	21,71	17,50
		23,36	22,74	21,67
		23,04	21,25	16,09
	nitrato 25 mM	21,95	20,15	16,36
		21,99	21,66	20,09
		21,89	19,52	14,65
	nitrito 25 mM	17,98	15,28	13,44
		18,25	15,91	14,12
		17,98	15,14	12,72

* se realizaron simultáneamente todas las curvas en MD por 20 h.

** se realizaron simultáneamente todas las curvas en medio LB por 19,5 h.

Tabla A 4. Área bajo la curva de crecimiento de *E. coli* BW25113 y *E. coli* $\Delta napA$ en MD con nitrato 25 mM.

Cepa	*	+ nitrato **		
		-	telurito 0,2 μ M	telurito 1,0 μ M
control	n1	14,06	12,05	3,08
	n2	14,09	12,15	3,92
	n3	14,07	12,22	3,66
	prom.	14,07	12,14	3,55
	d.s.	0,02	0,09	0,43
$\Delta napA$	n1	12,77	9,35	0,7378
	n2	12,72	9,26	0,6423
	n3	12,51	9,57	1,165
	prom.	12,67	9,39	0,85
	d.s.	0,14	0,16	0,28

* n1, n2, n3 indica cada réplica biológica; prom, corresponde al promedio de los datos; d.s., desviación estándar.

** se realizaron simultáneamente todas las curvas con y sin telurito de las cepas control, *E. coli* $\Delta napA$ y $\Delta nrfA$ (tabla A 5) por 18,4 h.

Tabla A 5. Área bajo la curva de crecimiento de *E. coli* BW25113 y *E. coli* $\Delta nrfA$ en MD con nitrato 25 mM.

Cepa	*	+ nitrato **		
		-	telurito 0,2 μ M	telurito 1,0 μ M
control	n1	14,08	12,05	3,08
	n2	14,09	12,15	3,92
	n3	14,07	12,22	3,66
	prom.	14,07	12,14	3,55
	d.s.	0,02	0,09	0,43
$\Delta nrfA$	n1	12,11	9,93	1,57
	n2	11,81	9,89	2,95
	n3	12,04	9,85	2,20
	prom.	11,99	9,89	2,24
	d.s.	0,16	0,04	0,69

* n2, n3 indica cada réplica biológica; prom, corresponde al promedio de los datos; d.s., desviación estándar. ** se realizaron simultáneamente todas las curvas con y sin telurito de las cepas control, *E. coli* $\Delta napA$ (Tabla A 4) y $\Delta nrfA$ por 18,4 h.

Tabla A 6. Área bajo la curva de crecimiento de *E. coli* BW25113 y *E. coli* $\Delta nirB$ en MD con nitrato 25 mM.

Cepa	*	+ nitrato **		
		-	telurito 0,2 μ M	telurito 1,0 μ M
control	n1	13,01	11,83	5,68
	n2	15,61	13,84	5,61
	n3	14,20	13,16	5,24
	prom.	14,27	12,94	5,51
	d.s.	1,30	1,02	0,24
$\Delta nirB$	n1	13,79	12,53	4,35
	n2	13,55	12,30	3,36
	n3	13,46	12,29	4,27
	prom.	13,60	12,37	3,99
	d.s.	0,17	0,14	0,55

* n1, n2, n3 indica cada réplica biológica; prom., corresponde al promedio de los datos anteriores; d.s., desviación estándar.

** se realizaron simultáneamente todas las curvas con y sin telurito de las cepas control, *E. coli* $\Delta nirB$ y Δhcp (Tabla A 19) por 19,5 h.

Tabla A 7. Área bajo la curva de crecimiento de *E. coli* BW25113 y *E. coli* $\Delta napA$ en MD (sin nitrato).

Cepa	*	- nitrato **		
		-	telurito 0,2 μ M	telurito 1,0 μ M
control	n1	16,39	14,68	8,04
	n2	16,00	15,79	11,16
	n3	14,66	13,45	5,39
	prom.	15,68	14,64	8,20
	d.s.	0,90	1,17	2,89
$\Delta napA$	n1	15,69	14,78	9,11
	n2	16,64	15,86	8,33
	n3	12,76	11,41	4,72
	prom.	15,03	14,02	7,39
	d.s.	2,02	2,32	2,34

* n1, n2, n3 indica cada réplica biológica; prom., corresponde al promedio de los datos anteriores; d.s., desviación estándar.

** se realizaron simultáneamente todas las curvas con y sin telurito de cada réplica biológica por 21,5 h.

Tabla A 8. Área bajo la curva de crecimiento de *E. coli* BW25113 y *E. coli* $\Delta nrfA$ en MD (sin nitrato).

Cepa	*	- nitrato **		
		-	telurito 0,2 μ M	telurito 1,0 μ M
control	n1	16,39	14,68	8,04
	n2	16,00	15,79	11,16
	n3	14,66	13,45	5,39
	prom.	15,68	14,64	8,20
	d.s.	0,90	1,17	2,89
$\Delta nrfA$	n1	16,87	16,28	11,74
	n2	17,77	17,11	11,61
	n3	14,20	13,02	5,66
	prom.	16,28	15,47	9,67
	d.s.	1,86	2,16	3,47

* n1, n2, n3 indica cada réplica biológica; prom., corresponde al promedio de los datos anteriores; d.s., desviación estándar.

** se realizaron simultáneamente todas las curvas con y sin telurito de cada réplica biológica por 21,5 h.

Tabla A 9. Área bajo la curva de crecimiento de *E. coli* BW25113 y *E. coli* $\Delta nirB$ en MD (sin nitrato).

Cepa	*	- nitrato **		
		-	telurito 0,2 μ M	telurito 1,0 μ M
control	n1	16,39	14,68	8,04
	n2	16,00	15,79	11,16
	n3	14,66	13,45	5,39
	prom.	15,68	14,64	8,20
	d.s.	0,90	1,17	2,89
$\Delta nirB$	n1	15,18	14,08	6,08
	n2	16,62	15,94	10,79
	n3	13,78	12,51	6,42
	prom.	15,19	14,18	7,76
	d.s.	1,42	1,72	2,63

* n1, n2, n3 indica cada réplica biológica; prom., corresponde al promedio de los datos anteriores; d.s., desviación estándar.

** se realizaron simultáneamente todas las curvas con y sin telurito de cada réplica biológica por 21,5 h.

Tabla A 10. Área bajo la curva de crecimiento de *E. coli* BW25113 y *E. coli* $\Delta napA$ en MD con nitrito 5 mM.

Cepa	*	+ nitrito **		
		-	telurito 0,2 μ M	telurito 1,0 μ M
control	n1	7,96	5,71	1,68
	n2	7,02	5,29	1,48
	n3	8,17	6,10	1,80
	prom.	7,72	5,70	1,65
	d.s.	0,61	0,40	0,16
$\Delta napA$	n1	7,77	5,70	1,47
	n2	6,04	3,66	0,87
	n3	5,93	3,57	0,95
	prom.	6,58	4,31	1,10
	d.s.	1,03	1,20	0,32

* n1, n2, n3 indica cada réplica biológica; prom., corresponde al promedio de los datos anteriores; d.s., desviación estándar.

** se realizaron simultáneamente todas las curvas con y sin telurito de las cepas control, *E. coli* $\Delta napA$, y $\Delta nrfA$ (Tabla A 11) por 15,4 h.

Tabla A 11. Área bajo la curva de crecimiento de *E. coli* BW25113 y *E. coli* $\Delta nrfA$ en MD con nitrito 5 mM.

Cepa	*	+ nitrito **		
		-	telurito 0,2 μ M	telurito 1,0 μ M
control	n1	7,96	5,71	1,68
	n2	7,02	5,29	1,48
	n3	8,17	6,10	1,80
	prom.	7,72	5,70	1,65
	d.s.	0,61	0,40	0,16
$\Delta nrfA$	n1	7,74	5,59	1,51
	n2	7,58	5,05	1,29
	n3	7,02	4,98	1,37
	prom.	7,45	5,21	1,39
	d.s.	0,38	0,33	0,11

* n1, n2, n3 indica cada réplica biológica; prom., corresponde al promedio de los datos anteriores; d.s., desviación estándar.

** se realizaron simultáneamente todas las curvas con y sin telurito de las cepas control, *E. coli* $\Delta napA$ (Tabla A 10), y $\Delta nrfA$ por 15,4 h.

Tabla A 12. Área bajo la curva de crecimiento de *E. coli* BW25113 y *E. coli* $\Delta nirB$ en MD con nitrito 5 mM.

Cepa	*	+ nitrito **		
		-	telurito 0,2 μ M	telurito 1,0 μ M
control	n1	11,89	9,76	3,03
	n2	12,72	11,14	3,08
	n3	12,90	11,58	3,55
	prom.	12,50	10,83	3,22
	d.s.	0,54	0,95	0,29
$\Delta nirB$	n1	11,60	9,34	2,31
	n2	10,80	9,16	2,22
	n3	11,03	9,17	2,11
	prom.	11,15	9,22	2,21
	d.s.	0,41	0,10	0,10

* n1, n2, n3 indica cada réplica biológica; prom., corresponde al promedio de los datos anteriores; d.s., desviación estándar.

** se realizaron simultáneamente todas las curvas con y sin telurito de las cepas control y *E. coli* $\Delta nirB$ por 19,5 h.

Tabla A 13. Área bajo la curva de crecimiento de *E. coli* BW25113 y *E. coli* $\Delta norR$ en MD con nitrato 25 mM.

Cepa	*	+ nitrato **		
		-	telurito 0,2 μ M	telurito 1,0 μ M
control	n1	13,76	12,60	7,49
	n2	13,67	12,82	8,05
	n3	13,45	12,58	8,04
	prom.	13,62	12,66	7,86
	d.s.	0,16	0,13	0,32
$\Delta norR$	n1	12,69	11,19	3,12
	n2	12,82	11,14	1,11
	n3	11,77	9,68	0,51
	prom.	12,43	10,67	1,58
	d.s.	0,57	0,86	1,37

* n1, n2, n3 indica cada réplica biológica; prom., corresponde al promedio de los datos anteriores; d.s., desviación estándar.

** se realizaron simultáneamente todas las curvas con y sin telurito de las cepas control, *E. coli* $\Delta norR$, y $\Delta nsrR$ (Tabla A 14) por 19 h.

Tabla A 14. Área bajo la curva de crecimiento de *E. coli* BW25113 y *E. coli* $\Delta nsrR$ en MD con nitrato 25 mM.

Cepa	*	+ nitrato **		
		-	telurito 0,2 μ M	telurito 1,0 μ M
control	n1	13,76	12,60	7,49
	n2	13,67	12,82	8,05
	n3	13,45	12,58	8,04
	prom.	13,62	12,66	7,86
	d.s.	0,16	0,13	0,32
$\Delta nsrR$	n1	12,49	11,60	4,13
	n2	13,11	12,39	8,67
	n3	11,46	10,05	5,33
	prom.	12,35	11,35	6,04
	d.s.	0,84	1,19	2,35

* n1, n2, n3 indica cada réplica biológica; prom., corresponde al promedio de los datos anteriores; d.s., desviación estándar.

** se realizaron simultáneamente todas las curvas con y sin telurito de las cepas control, *E. coli* $\Delta norR$ (Tabla A 13), y $\Delta nsrR$ por 19 h.

Tabla A 15. Área bajo la curva de crecimiento de *E. coli* BW25113 y *E. coli* $\Delta norR$ en MD (sin nitrato).

Cepa	*	- nitrato **		
		-	telurito 0,2 μ M	telurito 1,0 μ M
control	n1	16,39	14,68	8,04
	n2	16,00	15,79	11,16
	n3	14,66	13,45	5,39
	prom.	15,68	14,64	8,20
	d.s.	0,91	1,17	2,89
$\Delta norR$	n1	15,70	14,76	7,07
	n2	16,86	15,93	8,17
	n3	14,38	12,27	3,69
	prom.	15,65	14,32	6,31
	d.s.	1,24	1,87	2,34

* n1, n2, n3 indica cada réplica biológica; prom., corresponde al promedio de los datos anteriores; d.s., desviación estándar.

** se realizaron simultáneamente todas las curvas con y sin telurito de cada réplica biológica por 21,5 h.

Tabla A 16. Área bajo la curva de crecimiento de *E. coli* BW25113 y *E. coli* $\Delta nsrR$ en MD (sin nitrato).

Cepa	*	- nitrato **		
		-	telurito 0,2 μ M	telurito 1,0 μ M
control	n1	16,39	14,68	8,04
	n2	16,00	15,79	11,16
	n3	14,66	13,45	5,39
	prom.	15,68	14,64	8,20
	d.s.	0,91	1,17	2,89
$\Delta nsrR$	n1	15,45	14,46	7,58
	n2	13,45	12,37	7,50
	n3	14,01	12,81	5,36
	prom.	14,30	13,21	6,81
	d.s.	1,03	1,10	1,26

* n1, n2, n3 indica cada réplica biológica; prom., corresponde al promedio de los datos anteriores; d.s., desviación estándar.

** se realizaron simultáneamente todas las curvas con y sin telurito de cada réplica biológica por 21,5 h.

Tabla A 17. Área bajo la curva de crecimiento de *E. coli* BW25113 y *E. coli* $\Delta norV$ en MD con nitrato 25 mM.

Cepa	*	+ nitrato **		
		-	telurito 0,2 μ M	telurito 1,0 μ M
control	n1	14,60	12,25	4,36
	n2	16,76	14,46	5,48
	n3	15,61	13,84	5,61
	prom.	15,65	13,52	5,15
	d.s.	1,08	1,14	0,68
$\Delta norV$	n1	16,18	13,33	3,41
	n2	16,58	13,04	3,36
	n3	13,64	11,31	3,14
	prom.	15,47	12,56	3,31
	d.s.	1,59	1,09	0,14

* n1, n2, n3 indica cada réplica biológica; prom., corresponde al promedio de los datos anteriores; d.s., desviación estándar.

** se realizaron simultáneamente todas las curvas con y sin telurito de las cepas control, *E. coli* $\Delta norV$, y Δhmp (Tabla A 18) por 21 h.

Tabla A 18. Área bajo la curva de crecimiento de *E. coli* BW25113 y *E. coli* Δhmp en MD con nitrato 25 mM.

Cepa	*	+ nitrato **		
		-	telurito 0,2 μ M	telurito 1,0 μ M
control	n1	14,60	12,25	4,36
	n2	16,76	14,46	5,48
	n3	15,61	13,84	5,61
	prom.	15,65	13,52	5,15
	d.s.	1,08	1,14	0,68
Δhmp	n1	16,65	14,22	4,08
	n2	16,57	13,94	4,40
	n3	16,57	14,20	4,58
	prom.	16,60	14,12	4,35
	d.s.	0,05	0,15	0,25

* n1, n2, n3 indica cada réplica biológica; prom., corresponde al promedio de los datos anteriores; d.s., desviación estándar.

** se realizaron simultáneamente todas las curvas con y sin telurito de las cepas control, *E. coli* $\Delta norV$ (Tabla A 17), y Δhmp por 21 h.

Tabla A 19. Área bajo la curva de crecimiento de *E. coli* BW25113 y *E. coli* Δhcp en MD con nitrato 25 mM.

Cepa	*	+ nitrato **		
		-	telurito 0,2 μ M	telurito 1,0 μ M
control	n1	13,01	11,83	5,68
	n2	15,61	13,84	5,61
	n3	14,20	13,16	5,24
	prom.	14,27	12,95	5,51
	d.s.	1,30	1,02	0,24
Δhcp	n1	14,14	13,05	6,17
	n2	14,46	13,20	5,78
	n3	14,32	13,45	3,86
	prom.	14,31	13,24	5,27
	d.s.	0,16	0,20	1,24

* n1, n2, n3 indica cada réplica biológica; prom., corresponde al promedio de los datos anteriores; d.s., desviación estándar.

** se realizaron simultáneamente todas las curvas con y sin telurito de las cepas control, *E. coli* $\Delta nirB$ (Tabla A 6), y Δhcp por 19,5 h.

Tabla A 20. Área bajo la curva de crecimiento de *E. coli* BW25113 y *E. coli* $\Delta norV$ en MD (sin nitrato).

Cepa	*	- nitrato **		
		-	telurito 0,2 μ M	telurito 1,0 μ M
control	n1	16,39	14,68	8,04
	n2	16,00	15,79	11,16
	n3	14,66	13,45	5,39
	prom.	15,68	14,64	8,20
	d.s.	0,90	1,17	2,89
$\Delta norV$	n1	15,51	14,22	6,26
	n2	17,79	17,45	11,14
	n3	14,65	13,49	7,71
	prom.	15,98	15,05	8,37
	d.s.	1,62	2,10	2,51

* n1, n2, n3 indica cada réplica biológica; prom., corresponde al promedio de los datos anteriores; d.s., desviación estándar.

** se realizaron simultáneamente todas las curvas con y sin telurito de cada réplica biológica por 21,5 h.

Tabla A 21. Área bajo la curva de crecimiento de *E. coli* BW25113 y *E. coli* Δhmp en MD (sin nitrato).

Cepa	*	- nitrato **		
		-	telurito 0,2 μ M	telurito 1,0 μ M
control	n1	16,39	14,68	8,04
	n2	16,00	15,79	11,16
	n3	14,66	13,45	5,39
	prom.	15,68	14,64	8,20
	d.s.	0,90	1,17	2,89
Δhmp	n1	15,42	14,11	6,93
	n2	17,47	16,65	8,59
	n3	14,50	12,88	5,77
	prom.	15,80	14,55	7,10
	d.s.	1,52	1,92	1,42

* n1, n2, n3 indica cada réplica biológica; prom., corresponde al promedio de los datos anteriores; d.s., desviación estándar.

** se realizaron simultáneamente todas las curvas con y sin telurito de cada réplica biológica por 21,5 h.

Tabla A 22. Área bajo la curva de crecimiento de *E. coli* BW25113 y *E. coli* Δhcp en MD (sin nitrato).

Cepa	*	- nitrato **		
		-	telurito 0,2 μ M	telurito 1,0 μ M
control	n1	12,86	12,66	8,98
	n2	12,68	12,06	7,59
	n3	12,55	11,89	7,58
	prom.	12,70	12,20	8,05
	d.s.	0,15	0,40	0,80
Δhcp	n1	12,80	12,21	8,18
	n2	12,63	11,66	7,18
	n3	12,27	11,90	8,29
	prom.	12,57	11,92	7,88
	d.s.	0,27	0,28	0,61

* n1, n2, n3 indica cada réplica biológica; prom., corresponde al promedio de los datos anteriores; d.s., desviación estándar.

** se realizaron simultáneamente todas las curvas con y sin telurito de las cepas control y *E. coli* Δhcp por 18,4.

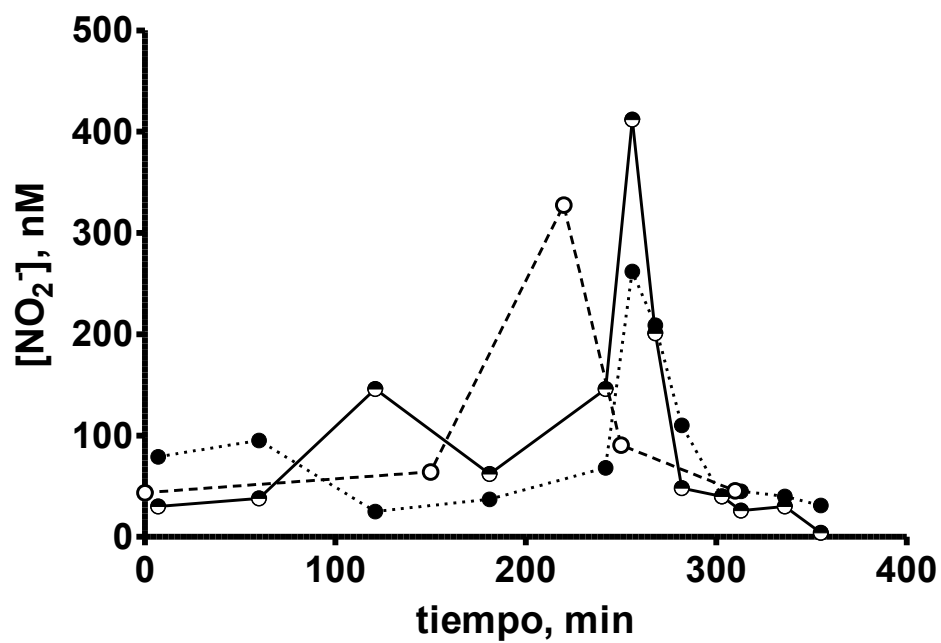


Figura A 1. Concentración de nitrito en sobrenadantes de cultivos de *E. coli*. Los datos corresponden a tres cultivos independientes de *E. coli* BW25113 a los que se determinó la concentración de nitrito. Los símbolos unidos por una línea recta corresponden a la réplica mostrada en la Figura 8.