



UCH-FC  
DOC-Microb  
R 696  
C. 1



# “Rol de los mecanismos de resistencia a mercurio en la resistencia cruzada a telurito en bacterias psicrotolerantes aisladas del territorio Antártico Chileno”

**Tesis Doctoral**

Entregada a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de Doctor

**Doctorado en Ciencias mención Microbiología**

Facultad De Ciencias

Por

**Fernanda Jimena Rodríguez Rojas**

Marzo, 2017

**Director de Tesis  
Dr. Claudio Vásquez Guzmán**

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**INFORME DE APROBACIÓN**  
**TESIS DE DOCTORADO**

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

**Fernanda Jimena Rodríguez Rojas**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias mención Microbiología, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 28 de Noviembre de 2016

Director de Tesis:

Dr. Claudio Vásquez Guzmán



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Oscar León



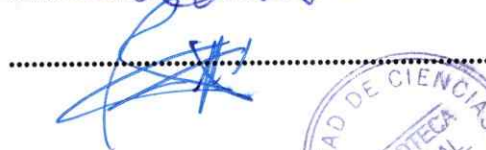
Dr. Michael Seeger



Dr. Ricardo Cabrera



Dr. Marcelo Baeza





# Advice from a Sea Turtle

Swim with the current  
Be a good navigator  
Stay calm under pressure  
Be well traveled  
Think long term  
Age gracefully  
Spend time at the beach!



## Biografía



Nací un domingo 16 de diciembre de 1984 en Santiago de Chile. Mis padres, Jorge y Jimena, me bautizaron con el nombre de Fernanda Jimena Rodríguez Rojas. Durante mis dos primeros años de vida viví en Punta Arenas para luego trasladarme definitivamente a vivir en Santiago hasta el día de hoy. Hasta primero básico estudié en el Colegio Anglo American International School y luego desde 1994 hasta 2002 terminé mis estudios en el Colegio Andréa English School. En el año 2003 ingresé a la Universidad Andrés Bello a estudiar la carrera Bioquímica donde me titulé el año 2009. Posteriormente, trabajé 2 años en el Laboratorio de Genética Molecular Vegetal hasta que el año 2012 comencé mi Doctorado. A partir de ese año comencé mi aventura en el Laboratorio de Microbiología Molecular a cargo del Dr. Claudio Vásquez siguiendo mi sueño de trabajar con organismos extremófilos aislados de muestras antárticas. Cinco años después el camino finaliza con mi sueño de convertirme en Dra. en Microbiología.



## Agradecimientos

Le doy las gracias a todos los Telurianos, en especial a Waldo y Pablo, por todo el apoyo y sabiduría. También agradezco al Profe Claudio Vásquez por toda la buena onda y buena disposición conmigo.

Agradezco a mi familia, en especial a mi madre por todo su apoyo y comprensión.

Por último esta tesis no hubiese sido posible sin el apoyo, compañía y amor de Dios, Lontra, Honu, Cometa, 20, Palmito, el mar, la playa, las palmeras, el sol, la luna, los amaneceres, y a los atardeceres.

अल्मा मरिना

## **Financiamiento**

Esta tesis fue financiada por la beca nacional de Doctorado CONICYT concurso 2012, la beca doctoral Gastos operacionales # 21120114 de CONICYT, la beca de apoyo para tesis doctoral DG\_01-14 del Instituto Antártico Chileno (INACH) y el Fondecyt regular # 1130362.

## Índice de Contenidos

Resumen.....	1
Abstract .....	4
1. Introducción .....	7
1.1 Toxicidad de iones de metales pesados y metaloides para bacterias: mercurio y telurito, los más tóxicos. ....	7
1.2 Resistencia bacteriana a mercurio .....	10
1.3 Resistencia bacteriana a telurito.....	13
1.4 Multirresistencia bacteriana a metales: el fenómeno de resistencia cruzada .....	15
1.5 Contaminación por mercurio y telurito en Chile y la Antártica.....	17
Hipótesis.....	22
Objetivo general .....	22
Objetivos específicos .....	22
2. Materiales y métodos .....	23
2.1 Aislamiento de bacterias Antárticas.....	23
2.2 Secuenciación del gen 16S rDNA y detección del gen <i>merA</i> .....	23
2.3 Árboles filogenéticos .....	25
2.4 Susceptibilidad a antibióticos y caracterización bioquímica .....	26
2.5 Curvas de crecimiento, áreas de inhibición del crecimiento y determinación de concentraciones mínimas inhibitorias.....	27
2.6 Cuantificación de especies reactivas de oxígeno y tioles totales .....	28
2.7 Determinación de la concentración de NADPH intracelular .....	29
2.8 Ensayo de viabilidad celular .....	29
2.9 Secuenciación, ensamble y anotación del genoma de la cepa ATH-43 .....	30
2.10 Promedio de identidad de nucleótidos y análisis del pangenoma.....	31
2.11 Purificación de RNA y PCR en tiempo real (qPCR) .....	31
2.12 RNAseq: Secuenciación, ensamble y anotación .....	32
2.12.1 Integridad del RNA total.....	32
2.12.2 Cuantificación de las muestras seleccionadas por fluorescencia.....	33
2.12.3 Remoción del RNA ribosomal y cuantificación de la concentración de mRNA .....	33

2.12.4	Elaboración de bibliotecas, síntesis de cDNA y ligamiento de adaptadores	34
2.12.5	Secuenciación.....	34
2.12.6	Análisis bioinformático.....	35
2.12.6a	Limpieza de lecturas según calidad.....	35
2.12.6b	Ensamble del transcriptoma de referencia.....	35
2.12.6c	Mapeo de lecturas.....	35
2.12.6d	Conteo de lecturas.....	36
2.12.6e	Expresión diferencial.....	36
2.12.6f	Anotación.....	36
2.13	Clonamiento de <i>merA</i> presente en el plásmido pTP6.....	37
2.14	Purificación de MerA de pTP6.....	38
2.15	Western blot.....	39
2.16	Actividad mercurio y telurito reductasa de MerA del pTP6 <i>in vitro</i> .....	39
2.17	Actividad de mercurio reductasa y telurito reductasa en extractos crudos de cepas ATH.....	40
3.	Resultados.....	42
3.1	Identificación y caracterización de bacterias antárticas resistentes a mercurio y telurito.....	42
3.2	El mercurio aumenta la resistencia a telurito de las <i>Pseudomonas</i> antárticas.....	48
3.3	Determinación del contenido de ROS y tioles en las cepas antárticas expuestas a mercurio y telurito.....	52
3.4	Viabilidad de células ATH expuestas a mercurio y telurito.....	56
3.5	Cuantificación de los niveles de NADPH en las cepas ATH expuestas a los tóxicos.....	57
3.6	Características del genoma de <i>Pseudomonas</i> sp. ATH-43.....	58
3.7	Análisis de RNA-seq de <i>P. putida</i> ATH-43 en presencia de mercurio, telurito y mercurio/telurito.....	65
3.8	Actividad telurito reductasa de la enzima MerA del plásmido pTP6.....	75
3.9	Actividad mercurio y telurito reductasa en extractos crudos de cepas ATH.....	78
4.	Discusión.....	82
5.	Conclusiones.....	96
6.	Proyecciones.....	97
7.	Referencias.....	98



8. Anexo .....	109
9. Publicaciones.....	136

## Índice de Figuras

Figura 1. Mecanismo de resistencia a mercurio orgánico e inorgánico en bacterias.....	11
Figura 2. Lugares de muestreo en la península Antártica. ....	24
Figura 3. Árboles filogenéticos basados en las secuencias casi completas de los rRNA 16S de las cepas Antárticas. ....	44
Figura 4. Árbol filogenético de secuencias merA de ATH-5, ATH-41 y ATH-43. ....	48
Figura 5. Curvas de crecimiento de las cepas antárticas. ....	51
Figura 6. Áreas de inhibición del crecimiento de las cepas ATH. ....	52
Figura 7. Cuantificación de ROS en las cepas antárticas. ....	54
Figura 8. Contenido de tioles en las cepas antárticas. ....	55
Figura 9. Viabilidad celular de las cepas antárticas. ....	56
Figura 10. Cuantificación de los niveles de NADPH en las cepas antárticas. ....	57
Figura 11. Genoma de <i>P. putida</i> ATH-43. ....	61
Figura 12. Análisis ANI y pan-genoma de <i>P. putida</i> ATH-43. ....	64
Figura 13. Transcriptoma de ATH-43 tratada con mercurio. ....	67
Figura 14. Transcriptoma de ATH-43 tratada con telurito. ....	68
Figura 15. Transcriptoma de ATH-43 tratada con mercurio/telurito. ....	69
Figura 16. Transcriptomas de los tres tratamientos en términos de FC en relación al control en ATH-43. ....	70
Figura 17. Clasificación de genes inhibidos en los tres transcriptomas de ATH-43. ....	70
Figura 18. Expresión relativa de genes del operón mer en los 3 transcriptomas de ATH-43. ....	72
Figura 19. Expresión relativa de los genes de ATH-43 que se sobreexpresan en común en presencia de mercurio y mercurio/telurito. ....	73
Figura 20. Validación del RNA-seq por qPCR. ....	75
Figura 21. Purificación de MerA del plásmido pTP6. ....	76
Figura 22. Actividad reductasa mercúrica de MerA del plásmido pTP6 in vitro. ....	77
Figura 23. Actividad telurito reductasa de MerA del plásmido pTP6 in vitro. ....	78
Figura 24. Actividad mercurio reductasa en extractos crudos de cepas ATH. ....	79
Figura 25. Cuantificación de la actividad mercurio reductasa en extractos crudos de las cepas ATH. ....	80
Figura 26. Cuantificación de la actividad telurito reductasa en extractos crudos de las cepas ATH. ....	81
Figura 27. Modelo del mecanismo molecular deresistencia cruzada a telurito, gatillada por la presencia de mercurio en la cepa ATH-43. ....	925

## Índice de Tablas

Tabla 1. Partidores universales para identificar el operón <i>mer</i> .....	25
Tabla 2. Partidores para qPCR.....	32
Tabla 3. Características geográficas y fenotípicas de las cepas ATH.....	42
Tabla 4. Ensayo de susceptibilidad a antibióticos de las cepas ATH .....	46
Tabla 5. Test API de las cepas ATH.....	47
Tabla 6. Concentraciones mínimas inhibitorias ( $\mu\text{M}$ ) de mercurio, telurito y telurito en presencia de mercurio ( $\text{TeO}_3^{-2}/\text{Hg}^{+2}$ ) .....	49
Tabla 7. Propiedades y características generales del genoma a <i>P. putida</i> ATH-43 .....	59
Tabla 8. Determinantes moleculares de resistencia a metales presentes en el genoma de <i>P. putida</i> ATH-43 .....	62
Tabla 9. Determinantes moleculares de resistencia a antibióticos presentes en el genoma de <i>P. putida</i> ATH-43.....	63
Tabla 10. Genes expresados en común en las 3 condiciones experimentales en ATH-43.....	74
Tabla 11. Genes expresados diferencialmente en tratamiento con mercurio en ATH-43.....	109
Tabla 12. Genes reprimidos diferencialmente en tratamiento con mercurio en ATH-43.....	115
Tabla 13. Genes expresados diferencialmente en tratamiento con telurito en ATH-43 .....	120
Tabla 14. Genes reprimidos diferencialmente en tratamiento con telurito en ATH-43.....	124
Tabla 15. Genes expresados diferencialmente en tratamiento con mercurio/telurito en ATH-43 .....	126
Tabla 16. Genes reprimidos diferencialmente en tratamiento con mercurio/telurito en ATH-43 .....	133

## Abreviaturas

AhpC = Alquilhidroperóxido reductasa  
ANI = *Average Nucleotide Identity*  
CLSI = *Clinical and Laboratory Standard Institute*  
COG = Clústers de grupos ortólogos  
CysK = Cisteína sintasa  
DNA = Ácido Desoxirribonucleico  
FC = *Fold Change*  
GOR = Glutación Reductasa  
Gpx = Glutación peroxidasa  
GSSG = Diglutación  
HSP = *Heat Shock Protein*  
INACH = Instituto Antártico Chileno  
MDEs = *Mercury Depletion Events*  
MerA = Mercurio reductasa  
MIC = Concentraciones Inhibitorias Mínimas  
MP = Metales Pesados  
NAD(P)H = Nicotín amida dinucleótido (fosfato) reducido  
NCBI = *National Center for Biotechnology Information*  
OD = Densidad Óptica  
ORF = Marco de Lectura Abierto  
PCR = Reacción en Cadena de la Polimerasa  
qPCR = PCR cuantitativo  
RIN = *RNA Integrity Number*  
RNA = Ácido Ribonucleico  
ROS = Especies Reactivas de Oxígeno  
RPKM = *Reads per Kilobase per Millon*  
RSH = Tioles Totales  
SH = Grupos Sulfhidrilo  
SodA = Superóxido dismutasa A  
TrxR = Tiorredoxina reductasa  
UFC = Unidades Formadoras de Colonia  
ZntA = Transportador de Zinc

## Resumen

A bajas concentraciones, algunos metales pesados y metaloides pueden ser sumamente tóxicos para los microorganismos. Entre ellos, mercurio (II) y telurito, poseen las concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) más bajas para *E. coli*. Ambos ejercen daño celular por depleción de tioles, inactivación de enzimas y estrés oxidativo. La resistencia a mercurio está dada por el operón *mer*, en que finalmente la flavoenzima MerA reduce mercurio (II) a mercurio elemental (volátil y menos tóxico). Por otro lado, aun cuando a la fecha no se han descrito mecanismos específicos de destoxificación de telurito, algunos metabolitos y enzimas propias del metabolismo -así como otras que participan en respuesta celular al estrés oxidativo- pueden reducir telurito a su forma menos tóxica, teluro elemental.

A su vez, la Antártica se caracteriza por estar expuesta a diversos tipos de estrés abiótico, como por ejemplo bajas temperaturas, alta salinidad, radiación UV, entre otros, los que en general causan estrés oxidativo. Últimamente se ha evidenciado un aumento drástico de contaminación por metales pesados en ese continente debido al fenómeno conocido como destilación global. Por este motivo, el continente antártico se ha convertido en un lugar de muestreo interesante para aislar cepas bacterianas resistentes a múltiples tipos de estrés y entre ellos, a aquel debido a la presencia de metales pesados. El estudio de mecanismos moleculares de resistencia de bacterias psicotolerantes a metales pesados y metaloides tan tóxicos como mercurio y telurito podría permitir el diseño de nuevas estrategias de biorremediación de sitios contaminados en ambientes de baja temperatura. En este contexto, se aisló bacterias desde la Antártica que son resistentes

a mercurio y telurito. La resistencia de estas bacterias al oxianión de teluro sólo se observa en presencia de mercurio, sugiriendo que éste gatillaría una respuesta de resistencia cruzada a ambos tóxicos.

El estudio de la resistencia cruzada a mercurio y telurito en bacterias antárticas psicrotolerantes se llevó a cabo utilizando cuatro aislados bacterianos (ATH-5, ATH-41, ATH-43 y ATH-62). Tres de ellos se relacionaron con el género *Pseudomonas* y uno con *Psychrobacter*. El operón *mer* se detectó sólo en las cepas de *Pseudomonas*.

Para entender el fenómeno de resistencia cruzada se sometió a las bacterias a 4 tratamientos experimentales diferentes: control sin tóxicos, con mercurio, telurito o mercurio/telurito. Tanto curvas de crecimiento, MICs como halos de inhibición en medio sólido mostraron que todos los aislados son resistentes a mercurio y telurito. Sin embargo, el fenotipo de resistencia cruzada sólo se observó en las *Pseudomonas*, el que fue particularmente notorio en ATH-43.

El análisis de parámetros moleculares de toxicidad mostró que individualmente tanto mercurio como telurito producen estrés oxidativo en las cepas ATH. En presencia de ambos tóxicos, los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) fueron más bajos que cuando sólo telurito estuvo presente, efecto que de nuevo fue más evidente en la cepa ATH-43. Aun cuando el contenido de tioles totales (RSH) disminuyó en presencia de mercurio o telurito, sólo ATH-43 mostró una recuperación a niveles normales de RSH cuando se expuso simultáneamente a ambos metales. Mientras el telurito alteró la viabilidad de todas las cepas, ésta se recupera en presencia de mercurio.

La secuenciación del genoma de ATH-43 reveló la presencia de genes de

resistencia a múltiples metales y antibióticos, además de un gran número de genes relacionados con estrés oxidativo. Por otro lado, el un análisis transcriptómico de esta cepa mostró que la exposición a mercurio, telurito o mercurio/telurito resulta en la expresión diferencial de ~200 genes en comparación al control sin tratamiento. En las 3 condiciones se observó la inducción de genes relacionados con transporte, transcripción, traducción, estrés oxidativo, resistencia a metales y cadena transportadora de electrones, entre otros. Interesantemente, la expresión de estos genes fue significativamente menor con telurito que en presencia de mercurio o mercurio/telurito. Por su parte, los genes cuya expresión se reprimió en estas condiciones incluyen metabolismo de aminoácidos, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos y transportadores, entre otros. También se determinó que MerA posee actividad telurito reductasa *in vitro*, actividad que no aumentó *in vivo* -como se esperaba- en cultivos expuestos a mercurio.

Finalmente y en su conjunto, estos resultados sugieren que el fenómeno de potenciación de resistencia cruzada se debería más bien a mecanismos generales de estrés (por ejemplo, respuesta a estrés oxidativo) estimulados por la presencia de mercurio, que al sistema específico de detoxificación de mercurio (operón *mer*).

## Abstract

Low concentrations of some heavy metals and metalloids can be very toxic for most microorganisms. Among them, mercury (II) and tellurite, have the lowest minimal inhibitory concentrations in *E. coli*. Both of them exert cell damage by thiol depletion, enzyme inactivation and oxidative stress. Mercury bacterial resistance is given by *mer* operon which aims the transformation of toxic cationic mercury by the flavoenzyme MerA, to elemental mercury which is volatile and less toxic. On the other hand, the mechanisms of tellurite detoxification are not well understood. However, it has been demonstrated that some metabolic flavoenzymes are able to reduce tellurite to its less-toxic form elemental tellurium, and also that an enhanced response against oxidative stress can confer tellurite resistance in some bacteria.

The Antarctic continent is constantly exposed to diverse abiotic stresses like low temperature, high salinity, UV radiation, among others, which cause oxidative stress. Recently, it has been show a dramatic increase of heavy metals in Antarctica, mostly due the grasshopper effect. In this sense, the Antarctic continent has become an interesting place for sampling and isolation of bacterial strains resistant to multiple stresses, which include that produced by heavy metals. The understanding of molecular mechanisms of mercury and tellurite resistance, and also the oxidative damage associated to these psychrotolerant bacteria, could allow for the design of new bioremediation strategies of polluted sites of low temperature environments. In this context, we have isolated psychrotolerant bacteria from Antarctica that are resistant to mercury and tellurite. However, these strains are resistant to tellurite only in the presence of mercury, suggesting



that Hg could somehow trigger a molecular response that confers cross-resistance to tellurite, as well as for mercury.

The aim of this Thesis is to determine if tellurite resistance of psychrotolerant Antarctic bacteria exposed to mercury, is due an activation of molecular mechanisms against oxidative stress triggered by mercury, and tellurite reduction mediated by MerA enzyme.

The cross-resistant phenotype to mercury and tellurite was carried out in four psychrotolerant Antarctic bacterial isolates (ATH-5, ATH-41, ATH-43 and ATH-62). Three of them belong to *Pseudomonas* genus and the other to *Psychrobacter* genus (ATH-62). The *mer* operon was only detected in the *Pseudomonas* isolates.

To understand this phenomenon all the strains were submitted to four experimental conditions: control, mercury, tellurite or mercury/tellurite treatments. Growth curves, MICs and growth inhibition zones experiments showed that all isolates were resistant to mercury and tellurite. However, cross-resistant phenotype was only observed in *Pseudomonas* strains, mainly in ATH-43.

Molecular toxicity parameters showed that both toxics by itself produced oxidative stress in ATH strains. Interestingly, treatment with both toxics together decreased ROS levels in comparison with tellurite treatment, mostly in ATH-43. Regarding thiols content, mercury and tellurite presence considerably reduced the intracellular amount of thiols in all ATH strains. However, only in ATH-43 mercury/tellurite treatment produced an increment in thiols level as high as the control levels. On the other hand, tellurite affected cell viability in all ATH, but in the presence of mercury, viability was restored only in

*Pseudomonas* strains.

Sequencing of ATH-43 genome revealed the presence of multiple heavy metal and antibiotics resistance genes, and also a huge number of genes related with oxidative stress response. A transcriptomic profile analysis of ATH-43 showed that mercury, tellurite or mercury/tellurite treatments resulted in the differential expression of ~200 genes in comparison to control treatment. In the three conditions expressed genes were related to transport, transcription, translation, oxidative stress response, heavy metal resistance and electron chain transport. Interestingly, gene expression in tellurite treatment was significantly lower in magnitude when compared to mercury or mercury/tellurite exposure. When analyzing repressed genes in all treatments, most of them were related to aminoacid, carbohydrate, lipid, and nucleotides metabolism, among others. We also demonstrated that MerA exhibited tellurite reductase activity *in vitro*. However, this activity was not observed *in vivo* in crude extracts pre-treated with mercury.

Altogether these results suggest that potentiation of the cross-resistant phenotype is principally due to activation of general stress response mechanisms (*e.g.* oxidative stress), and not due to the *mer* detoxification system.

## **1. Introducción**

### **1.1 Toxicidad de iones de metales pesados y metaloides para bacterias: mercurio y telurito, los más tóxicos.**

La toxicidad de metales pesados (MP) y metaloides ha sido uno de los grandes desafíos que han debido enfrentar los microorganismos para asegurar su supervivencia y actualmente, la contaminación por ellos es una preocupación mayor en relación al entorno. Los MP se encuentran tanto en ambientes terrestres como en medios acuáticos, principalmente por actividad geológica natural y también como consecuencia de la actividad antropogénica.

En Chile, la industria minera por décadas ha producido desechos que han contaminado el medio ambiente causando un gran impacto en distintos ecosistemas. Un ejemplo es la contaminación con mercurio, cobre y arsénico en distintas zonas del norte de nuestro país que ha generado un gran daño a la flora y fauna asociada a los ecosistemas (De Gregori *et al.* 2003; Oliveira *et al.*, 2007; Altimira *et al.* 2012; Pell *et al.* 2013).

Los MP tienen una densidad  $>5 \text{ gr/cm}^3$  y la mayoría de los 53 conocidos corresponden a elementos de transición que poseen sus orbitales  $d$  incompletos y forman iones que pueden interactuar con otros elementos o moléculas (Weast, 1984). Dadas estas características, bajas concentraciones de algunos MP como zinc, hierro, selenio y cobre, entre otros, exhiben funciones biológicas fundamentales para las bacterias y los seres vivos en general, destacando su participación como cofactores enzimáticos (centros [Fe-S]) y aminoácidos modificados (selenocisteína), entre otros (Nies, 1999). Por el contrario,

altas concentraciones de estos mismos elementos pueden formar complejos inespecíficos dentro de la célula que presentan un alto grado de toxicidad.

Algunos iones de metales como mercurio ( $\text{Hg}^{+2}$ ), plata ( $\text{Ag}^+$ ), cadmio ( $\text{Cd}^{+2}$ ) y telurio ( $\text{TeO}_3^{-2}$ ) son tan reactivos que los microorganismos no los utilizan en ninguna reacción biológica, por lo que son altamente tóxicos a concentraciones muy bajas (Silver y Phung, 1996; Harrison *et al.* 2004; Silver y Phung, 2005; Lemire *et al.*, 2013). Por otro lado,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$  y  $\text{Cu}^{+2}$  también pueden ser peligrosos a altas concentraciones dado que podrían reaccionar inespecíficamente con algunas macromoléculas. Por esta razón, la concentración intracelular de MP debe ser finamente regulada para evitar daños (Nies, 1999). Los MP de alto número atómico reaccionan de preferencia con grupos sulfhidrilo (SH) intracelulares, inactivando la función biológica de las moléculas que los contienen. Otros cationes como  $\text{Cd}^{+2}$ , además de causar depleción de tioles, reaccionan con otros como  $\text{Ca}^{+2}$  disminuyendo así la biodisponibilidad intracelular (Nies, 1999). Algunos cationes divalentes de MP pueden unirse a glutatión en bacterias Gram (-) formando diglutatión, que a su vez puede reaccionar con oxígeno molecular generando el catión correspondiente y peróxido de hidrógeno (Kachur *et al.* 1998). Por esta razón, el daño causado por MP en el interior de los microorganismos se debe principalmente al estrés oxidativo que éstos generan.

En humanos, la ingestión de mercurio y sus derivados orgánicos causa envenenamiento e incluso la muerte. Producto de la actividad pesquera, algunos países han sufrido intoxicaciones masivas por consumo de peces contaminados, como por ejemplo, Japón (Minamata) e Iraq (Qadissiya), donde cientos de personas fallecieron

(Bakir *et al.* 1973; Silver y Hobman, 2007). En nuestro país se ha demostrado que peces como atún y albacora también poseen un alto contenido de mercurio en comparación con estándares nacionales e internacionales (Cortés y Fortt, 2007). El envenenamiento con mercurio en humanos provoca principalmente daño neurológico, hepático y renal y ocurre principalmente por inactivación de enzimas y daño oxidativo (Rafati-Rahimzadeh *et al.* 2014). En el caso de bacterias, su toxicidad está dada principalmente por efectos oligodinámicos (daño a bajas concentraciones) y su afinidad por moléculas orgánicas que dan origen a complejos organomercuriales altamente corrosivos como metilmercurio (Barkay *et al.* 2003). Los cationes de mercurio reaccionan fuertemente con cualquier grupo SH de residuos de cisteína presentes en diversas moléculas, proteínas o tioles, inactivándolos o bloqueando su función celular. Al igual que otros metales, al unirse a tioles celulares provoca un desbalance redox lo que provoca estrés oxidativo (Lemire *et al.* 2013). Además, tanto mercurio como metilmercurio atraviesan membranas biológicas causando daño irreversible a macromoléculas como lípidos y ácidos nucleicos (Mathema *et al.*, 2011). Por otro lado, también se ha demostrado que el mercurio puede reaccionar con grupos amino, carboxilo, fosfato e imidazol (Grier, 1977). La concentración mínima inhibitoria (MIC) de  $Hg^{+2}$  para *E. coli* es 0,01 mM, siendo así el MP más tóxico para esta bacteria (Mergeay *et al.* 1985).

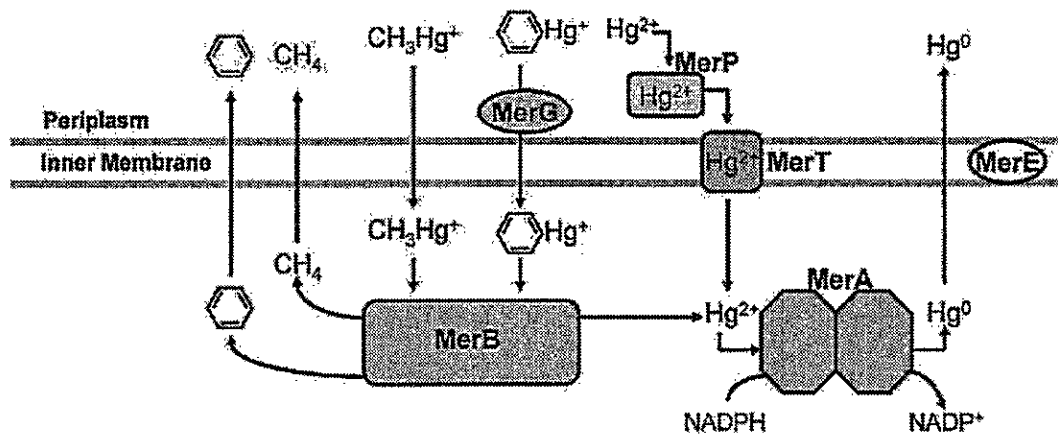
Los metaloides presentes en la Tabla Periódica de los elementos incluyen boro, silicio, germanio, arsénico, telurio, antimonio y polonio. Estos metaloides, se encuentran en su forma elemental, y forman oxianiones estables y solubles que en algunos casos son sumamente tóxicos como arsenato ( $AsO_4^{-3}$ ) (Bienert *et al.* 2008) y telurito ( $TeO_3^{-2}$ )

(Taylor, 1999). Por ejemplo, la toxicidad del  $\text{AsO}_4^{-3}$  es causada por la interferencia con el metabolismo del fosfato ( $\text{PO}_4^{-3}$ ) dada la similitud de sus estructuras (Nies, 1999).

Por su parte, el telurito es altamente tóxico para la mayoría de los microorganismos y en especial para bacterias Gram (-) (Taylor, 1999), sin embargo, mecanismos moleculares que explican su toxicidad aún no se dilucidan. Algunos estudios indican que el telurito es un fuerte oxidante que causa una rápida disminución del contenido de tioles intracelulares, en especial glutatión (Turner *et al.* 1995, 1999, 2001). Además, la exposición de diversas bacterias como *E. coli* (Tantaleán *et al.* 2003; Pérez *et al.* 2007), *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (Borsetti *et al.* 2005) y *Rhodobacter capsulatus* (Tremaroli *et al.* 2007) a telurito resulta en la generación de ROS, especialmente superóxido (Pérez *et al.* 2007; Tremaroli *et al.* 2007). Como consecuencia de este estrés oxidativo se produce carbonilación de proteínas (Contreras y Vásquez, 2010), desmantelamiento de centros de [4Fe-4S] de la aconitasa B y fumarasa A (Imlay, 2006; Calderón *et al.* 2009) y alteración de enzimas fundamentales del metabolismo como fosfofructoquinasa y piruvato quinasa (Valdivia *et al.* 2012), piruvato deshidrogenasa (Castro *et al.* 2008, 2009) y NADH deshidrogenasa I (Díaz-Vásquez *et al.* 2014a, b), entre otras. La MIC de  $\text{TeO}_3^{-2}$  para *E. coli* es 0,004 mM (Taylor, 1999) y es, en consecuencia, 2,5 veces más tóxico que el  $\text{Hg}^{+2}$ .

## 1.2 Resistencia bacteriana a mercurio

El mecanismo de destoxificación de mercurio que han desarrollado las bacterias y arqueas es altamente específico y está basado en el operón *merRPTAD* (resistencia a



**Figura 1. Mecanismo de resistencia a mercurio orgánico e inorgánico en bacterias.** MerA, mercurio reductasa; MerB, organomercurio liasa; MerP proteína periplasmática de unión a mercurio; MerT, transportados de membrada de mercurio; MerG, proteína periplasmática involucrada en la permeabilidad de fenilmercurio, y MerE, proteína de membrana probablemente involucrada en el transporte de mercurio hacia el interior de la célula. Figura adaptada de Rojas *et al.* 2011.

mercurio inorgánico) o *merRTPGCABD* (resistencia a mercurio inorgánico y orgánico) (Barkay *et al.* 2003) (Figura 1). El operón *mer* es el sistema genético mejor conocido de resistencia a un metal que incluye una alta tasa de transformación del tóxico a una forma menos peligrosa y volátil (Schaefer *et al.* 2002; Mathema *et al.* 2011). Este operón ha sido mayoritariamente estudiado en bacterias Gram (-), que en algunas Gram (+) exhibe genes similares pero dispuestos en un orden distinto. El sistema *mer* está ampliamente distribuido en el ecosistema y se encuentra codificado en plásmidos y transposones que se han conservado desde tiempos ancestrales (Yurieva *et al.* 1997; Mathema *et al.* 2011). Este especifica dos genes que sensan Hg<sup>+2</sup> (*merR* y *merD*), tres de transporte o movilización (*merP*, *merT* y *merC*) y dos de destoxificación enzimática de mercurio inorgánico y orgánico (*merA* y *merB*), respectivamente (Schelert *et al.* 2004). La regulación de la transcripción de este operón está bajo el control del factor de transcripción

MerR, que se activa en presencia de  $Hg^{+2}$ . En el periplasma, el  $Hg^{+2}$  se une a MerP y es transferido al transportador de membrana interna MerT. Una vez en el citosol, el  $Hg^{+2}$  se une a moléculas que contienen grupos SH (ej. glutatión), sirviendo como sustrato para la enzima MerA, flavoproteína oxidoreductasa que cataliza la reducción de  $Hg^{+2}$  (dependiente de NADPH) a mercurio elemental ( $Hg^0$ ), el que es volátil y difunde a través de membranas (Summers y Sugarman, 1974).

Por otra parte, la destoxicación de compuestos organomercuriales es mediada por la enzima organomercurio-liasa, MerB, que cataliza la ruptura de enlaces C-Hg liberando metano y  $Hg^{+2}$ , que es luego reducido por MerA (Murtaza *et al.* 2005). La función de MerC aún no está totalmente dilucidada y se sugiere que podría funcionar como transportador de compuestos organomercuriales desde el periplasma al citosol (Mathema *et al.* 2011). A su vez, MerG estaría ubicado en el periplasma y disminuiría la permeabilidad de la célula a fenilmercurio (Uno *et al.* 1997). Finalmente y una vez que las concentraciones de  $Hg^{+2}$  han disminuido en el citoplasma, MerD actúa como antagonista de la transcripción probablemente desplazando a MerR del promotor (Zeng *et al.* 1998; Champier *et al.* 2004).

Se ha demostrado que este sistema de destoxicación de mercurio tiene un origen evolutivo en bacterias y arqueas termófilas, inicialmente como un operón muy básico (Wang *et al.* 2008). Posteriormente, éste habría adquirido más genes con el fin de mejorar la eficiencia y potencial del sistema (Boyd y Barkay, 2012). Existe evidencia que indica que estos genes se han transferido tanto vertical como horizontalmente en una gran variedad de familias y géneros bacterianos. A diferencia de bacterias pertenecientes a filos



como *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Actinobacteria*, los operones *mer* de bacterias de linajes más ancestrales codifican para pocos genes del operón como *merT*, *merP* y *merA* en el caso de *Aquificae* (Freedman *et al.* 2012) y *Thermus/Deinococcus* (Wang *et al.* 2008), los que en general se expresan constitutivamente (Schelert *et al.* 2006; Freedman *et al.* 2012). En arqueas en cambio, se encontraría presente solo *merA* (Boyd y Barkay, 2012).

Aproximadamente 1-10% de las bacterias aeróbicas poseen el sistema *mer*, lo que sugiere la ubicuidad del mercurio en el ambiente y la alta presión selectiva que pueda ejercer (Barkay, 1987; Mindlin *et al.* 2005; Poulain *et al.* 2007). En este contexto, se ha aislado e identificado bacterias de distintos ambientes naturales tanto cálidos como fríos, como por ejemplo el territorio antártico (Osborn *et al.* 1997; De Souza *et al.* 2006; Tashirev *et al.* 2012).

### 1.3 Resistencia bacteriana a telurito

Los mecanismos moleculares específicos de destoxificación de telurito aún no han sido dilucidados. El aumento de ROS en el citosol provoca la oxidación generalizada de tioles, lo que resulta en la activación de los regulones OxyR y SoxRS, que activan una serie de genes que participan en la respuesta a estrés oxidativo como *katE*, *katG*, *sodA* y *sodC*, entre otros (Zheng *et al.* 1998; Liochev *et al.* 1999; Arenas *et al.* 2010, 2011). Adicionalmente, se ha observado que en *Geobacillus stearothermophilus* V, tres genes que participan en el metabolismo de la cisteína están involucrados en resistencia a telurito, incluyendo: i) *cobA*, que codifica para la metiltransferasa SUMT (síntesis de cofactor de



sulfito reductasa, Araya *et al.* 2009), ii) *cysK*, que codifica para la enzima cisteína sintasa (Vásquez *et al.* 2001; Saavedra *et al.* 2004) e iii) *iscS*, que especifica la enzima cisteína desulfurasa (Tantaleán *et al.* 2003). Posteriormente, se determinó que la mayoría de los genes del regulón Cys de *E. coli* se activan frente a la exposición a telurito (Fuentes *et al.* 2007).

Aun cuando no se ha descrito mecanismos específicos de resistencia bacteriana a este oxianión, una forma en que los microorganismos enfrentan su toxicidad es reduciéndolo a Te elemental, una forma menos tóxica (Chasteen *et al.* 2009). Los productos de esta reducción son en general compuestos alquilados volátiles (Chasteen y Bentley, 2003) o telurio elemental ( $\text{Te}^0$ ) (Tucker *et al.* 1966; Taylor *et al.* 1988; Turner *et al.* 1999). Esta reducción puede ser no enzimática y está dada por la interacción del telurito con tioles celulares, principalmente glutatión (Turner *et al.* 1999, 2001). Por otro lado, algunas enzimas también pueden reducir telurito a  $\text{Te}^0$ . Algunas enzimas como catalasa (Calderón *et al.* 2006) y flavoproteínas disulfuro reductasas como dihidrolipoil deshidrogenasa (Castro *et al.* 2009), glutatión reductasa y tiorredoxina reductasa (Rigobello *et al.* 2011) utilizan nucleótidos de piridina como NAD(P)H para llevar a cabo esta reducción de telurito a telurio elemental. Otro ejemplo está dado por algunas oxidasas terminales de la cadena transportadora de electrones de bacterias como *Bacillus selenitireducens*, *Sulfurospirillum barnesii* y *B. beveridgei*, entre otras (Csotonyi *et al.* 2006; Baesman *et al.* 2007, 2009).

Las flavoproteínas disulfuro reductasas poseen una alta similitud de secuencia y catalizan la reducción dependiente de nucleótidos de piridina de una variedad de sustratos

(Argyrou y Blanchard, 2004). Son homodímeros que utilizan una molécula de FAD unida de forma no covalente y un centro disulfuro redox-activo compuesto por dos cisteínas catalíticas por polipéptido (Argyrou y Blanchard, 2004). A este tipo de enzimas pertenece la reductasa mercúrica MerA, por lo que sería interesante estudiar si exhibe actividad reductora de telurito.

En algunas bacterias se han identificado genes que confieren resistencia a telurito que se localizan tanto en plásmidos como en el cromosoma bacteriano. Estos se organizan en operones como por ejemplo *tehAB* y *klaAklkBklaC* en *E. coli* (Taylor *et al.* 1994; Turner *et al.* 1995), *terZABCDEF* en *Proteus mirabilis* y *E. coli* (Kormutakova *et al.* 2000; Topchieva *et al.* 2003), y *trgAB* en *R. sphaeroides* (O'Gara *et al.* 1997).

#### **1.4 Multirresistencia bacteriana a metales: el fenómeno de resistencia cruzada**

Microorganismos que proliferan en ambientes contaminados con MP y metaloides -tanto de origen antropogénico como natural- han adquirido diversos mecanismos de resistencia para sobrellevar esta toxicidad. Especies como *P. putida* SP1 (Zhang *et al.* 2012) y *Raoultella planticola* (Koc *et al.* 2013) han sido descritas como multirresistentes a diversos MP y metaloides. Otro modelo es *Cupriavidus* (previamente *Wautersia*, *Ralstonia*, *Alcaligenes*) *metallidurans* CH34, que posee múltiples determinantes de resistencia a metales que le permiten desarrollarse en ambientes altamente contaminados (Mergeay *et al.* 1985; Nies, 2000; von Rozycki y Nies, 2009). Esta bacteria resiste altas concentraciones de zinc, cobalto y cadmio gracias al sistema de detoxificación *czc*, codificado en el plasmidio pMOL30 (Nies *et al.* 1987). Además, posee el operón *cnrCBA*

que confiere resistencia a cobalto y níquel, codificado en el plásmido pMOL28 (Taghavi *et al.* 1997), el sistema *chr* de resistencia al oxianión cromato (Nies *et al.* 1990), genes de resistencia a cobre y plomo (van der Lelie, 1998) y tres copias del operón *mer*, uno en cada plásmido más una copia en el cromosoma (Diels *et al.* 1985). Posteriormente, esta cepa fue modificada para aumentar su espectro de resistencia a mercurio inorgánico y orgánico vía transconjugación con el plásmido pTP6 (Rojas *et al.* 2011).

Además de los sistemas *czc* y *cnr*, existe evidencia que otros mecanismos - considerados en un inicio específicos para un metal- también pueden conferir resistencia a otros. Es el caso del operón *ars*, que especifica una bomba de expulsión de arsenito que además puede expulsar telurito aumentando así hasta 60 veces la MIC de telurito para *E. coli* (Turner *et al.* 1992). Por otro lado, el gen *trgB* -que forma parte del operón *trgAB* descrito como determinante de resistencia a telurito- confiere resistencia a cobre en la bacteria *R. capsulatus* por un mecanismo aún desconocido (Rademacher *et al.* 2012). Por otro lado, se observó la inducción de los genes *mer* cuando la bacteria resistente a mercurio *Nitrosomonas europaea* se expuso a cadmio (Park y Ely, 2008). También se ha observado que algunas enzimas clave del metabolismo como la NADH deshidrogenasa II pueden reducir más de un metal, como en este caso, telurito y cobre (Rapisarda *et al.* 1999; Díaz-Vásquez *et al.* 2014b, b). Incluso otras enzimas como la glutatión reductasa y tiorredoxina reductasa pueden reducir telurito y selenito (Rigobello *et al.* 2011).

La respuesta de resistencia cruzada ha sido documentada para varios microorganismos y una gran cantidad de tóxicos. Algunos ejemplos incluyen i) la respuesta adaptativa mediada por cadmio que confiere resistencia cruzada contra altas

concentraciones de peróxido de hidrógeno y zinc en *X. campestris* (Banjerdkiy *et al.* 2005); ii) la resistencia a cadmio, mercurio y arsenito conferida por exposición a peróxido de hidrógeno en células de ovario de Hámster Chino (Cantoni *et al.* 1994). Además, microorganismos que han sido evolucionados artificialmente muestran diversos fenotipos de resistencia cruzada incluyendo i) *S. cerevisiae* hiper resistente a cobalto, que también resiste níquel, zinc y manganeso (Cakar *et al.* 2009); ii) *Bacillus boroniphilus* resistente a boro, también presenta resistencia a cobre, hierro y estrés salino (Sen *et al.* 2011). Finalmente, se ha observado que la exposición a bajas concentraciones de telurito pueden inducir una respuesta adaptativa que resulta en un aumento considerable de la MIC de telurito para *Proteus mirabilis* (Toptchieva *et al.* 2003). Se desconoce a la fecha si los mecanismos de resistencia a mercurio podrían conferir resistencia a telurito o viceversa.

### **1.5 Contaminación por mercurio y telurito en Chile y la Antártica**

La naturaleza minera de nuestro país hace que sea uno con los mayores niveles de contaminación por MP y metaloides debido principalmente a la descarga de desechos en una variedad de ecosistemas. La presencia de 174 minas (74 de cobre y 28 de oro y plata) ha aumentado la necesidad de encontrar nuevas formas de descontaminar éstos tóxicos en aguas y tierras contaminadas (SERNAGEOMIN).

Las mayores focos de concentración con mercurio en el mundo son producto de la actividad volcánica, la quema de combustibles fósiles y la extracción de oro y plata por amalgamamiento (Barkay *et al.* 2003). La extracción de oro por formación de amalgamas con mercurio puede llegar a producir hasta 1,32 kg de vapor de mercurio por kg de oro

extraído (Lacerda, 1991). En nuestro país, se ha registrado altos niveles de mercurio en desechos de minas de extracción de oro en Andacollo, Región de Coquimbo (Leiva y Morales, 2013), los que recientemente se han asociado a un alto nivel de riesgo en niños expuestos de localidades rurales cercanas a las minas (Ohlander *et al.* 2013). Otros estudios demuestran que debido a la actividad antropogénica, zonas del sur de Chile también presentan altas concentraciones de mercurio como sedimentos del estuario de Lengua, Región de Bío-Bío (Yáñez *et al.* 2013) y lagos ubicados en el parque nacional Torres del Paine (Hermanns y Biester, 2013). En el caso del telurio, las principales fuentes son minas de oro, cobre y azufre, donde se encuentra formando minerales como calaverita ( $\text{AuTe}_2$ ) y silvanita ( $\text{AgAuTe}_4$ ) (Chasteen *et al.* 2009). En el caso del telurito, aparte de desechos mineros, algunas fuentes hidrotermales asociadas a actividad volcánica son también una fuente de acumulación de este tóxico (Rathgeber *et al.* 2002). En Japón, tanto la actividad minera como industrial (refinería del cobre), han demostrado ser fuentes importantes de contaminación con telurito (Kagami *et al.* 2012). A la fecha no existe registro de la cuantificación de telurito en muestras ambientales de nuestro país; sin embargo, la alta actividad volcánica y minera relacionada con la extracción de cobre permite inferir que nuestros ecosistemas podrían no estar exentos de contaminación con este oxianión.

Durante muchos años el continente antártico ha sido visto como un ambiente aislado y muy lejano a la contaminación producida por la actividad humana. Sin embargo, en las últimas cinco décadas la creciente actividad antropogénica ha creado focos de contaminación localizados como depósitos de basura, desagüe de desechos líquidos no

tratados, incineración de residuos, uso de combustibles fósiles, etc. Además, la Antártica enfrenta hoy una amenaza aún mayor que abarca la contaminación globalizada del continente y que habría comenzado en tiempos de la revolución industrial. Algunos elementos inorgánicos como plomo, cadmio, arsénico y mercurio se encuentran hoy en lugares que jamás habían sido visitados por el hombre, lo que aparentemente podría ser explicado por un fenómeno denominado destilación global. Este proceso resulta del transporte de MP en su forma volátil a través de la atmósfera desde latitudes más cálidas hasta las más polares (Emnet, 2009; von Waldow *et al.* 2010). Entre estos metales, el mercurio es uno de los contaminantes más peligrosos dada su gran toxicidad mencionada anteriormente, y su acumulación en las cadenas alimenticias polares, lo que resulta riesgoso tanto para el hombre, animales, plantas, como también para los microorganismos (Macdonald *et al.* 2005). Además, la contaminación por mercurio aumenta drásticamente en los polos debido a los eventos primaverales de disminución de mercurio atmosférico (MDEs, *Mercury Depletion Events*), que conllevan a un aumento en la deposición de  $Hg^{+2}$  en la superficie del Ártico (Lindberg *et al.* 2002) y de la Antártica (Ebinghaus *et al.* 2002). Mientras sedimentos de la Isla Decepción contienen arsénico, cobre, cadmio y plomo (Mao de Ferro *et al.* 2013), se encontró además mercurio en muestras de agua, nieve, sedimentos y vegetación, indicando la influencia volcánica sobre la presencia de mercurio en esta isla (Mao de Ferro *et al.* 2014). Hasta el momento no hay registro de la concentración de telurito en muestras provenientes de la Antártica.

Las regiones polares y de climas fríos se caracterizan por estar constantemente expuestas a temperaturas bajas extremas, exceso de salinidad, radiación UV y metales

pesados, entre otras, lo que resulta en la generación de estrés oxidativo (Chattopadhyay *et al.* 2011). Por este motivo, el continente antártico se ha convertido en un lugar de muestreo interesante para aislar cepas bacterianas que resistan múltiples tipos de estrés y entre ellos, aquel producido por metales pesados. El estudio de los mecanismos moleculares de resistencia a MP y metaloides tan tóxicos como mercurio y telurito y el daño oxidativo asociado a bacterias psicotolerantes, podría permitir el diseño de nuevas estrategias de biorremediación de sitios contaminados en ambientes de bajas temperaturas. En este sentido, se ha aislado bacterias psicotolerantes de muestras marinas y sedimentos de la Antártica que son resistentes a varios metales incluyendo mercurio (De Souza *et al.* 2007; Lo Giudice *et al.* 2013). Por otro lado, recientemente en nuestro laboratorio se aisló, identificó y caracterizó por primera vez bacterias de muestras ambientales de la Antártica que resisten altas concentraciones de telurito (Arenas *et al.* 2014).

El estudio de los mecanismos moleculares bacterianos para combatir los daños causados por telurito es de gran interés para nuestro laboratorio. Es por esto que, a partir de muestras ambientales antárticas obtenidas durante la expedición INACH ECA-48 (Enero 2012), nos interesamos por aislar bacterias que fueran resistentes simultáneamente a mercurio y telurito. Interesantemente, se encontró que las bacterias aisladas se hacían más resistentes a telurito cuando el medio se suplementaba con mercurio, fenómeno que se asociaba a la presencia del operón *mer*.

La resistencia a telurito en presencia de mercurio fue distinta para los diferentes aislados que contienen el operón *mer*, sugiriendo que el mercurio podría gatillar resistencia simultánea a mercurio y telurito que no depende únicamente de la presencia de



este operón. En este proyecto de Tesis se evaluó el efecto de los mecanismos de resistencia a mercurio sobre la resistencia a telurito que exhiben aislados bacterianos antárticos, analizando principalmente mecanismos contra estrés oxidativo y la capacidad de MerA para reducir telurito.

## **Hipótesis**

“La exposición a mercurio confiere resistencia a telurito en bacterias psicrotolerantes aisladas desde la Antártica debido a la activación de mecanismos de defensa contra estrés oxidativo y a la reducción de telurito por MerA”

## **Objetivo general**

Determinar si la presencia de mercurio induce mecanismos contra estrés oxidativo que confieren resistencia cruzada a telurito, y además demostrar que MerA reduce telurito en bacterias antárticas.

## **Objetivos específicos**

1. Caracterizar bacterias resistentes a mercurio y telurito aisladas de la Antártica y caracterizar el fenotipo de resistencia cruzada.
2. Determinar en los aislados antárticos parámetros de daño y resistencia a estrés oxidativo frente a la exposición a mercurio, telurito y ambos tóxicos.
3. Identificar genes de resistencia a mercurio involucrados en la resistencia cruzada a telurito en bacterias antárticas.
4. Determinar si la enzima mercurio reductasa (MerA) presenta actividad telurito reductasa *in vitro* e *in vivo*.

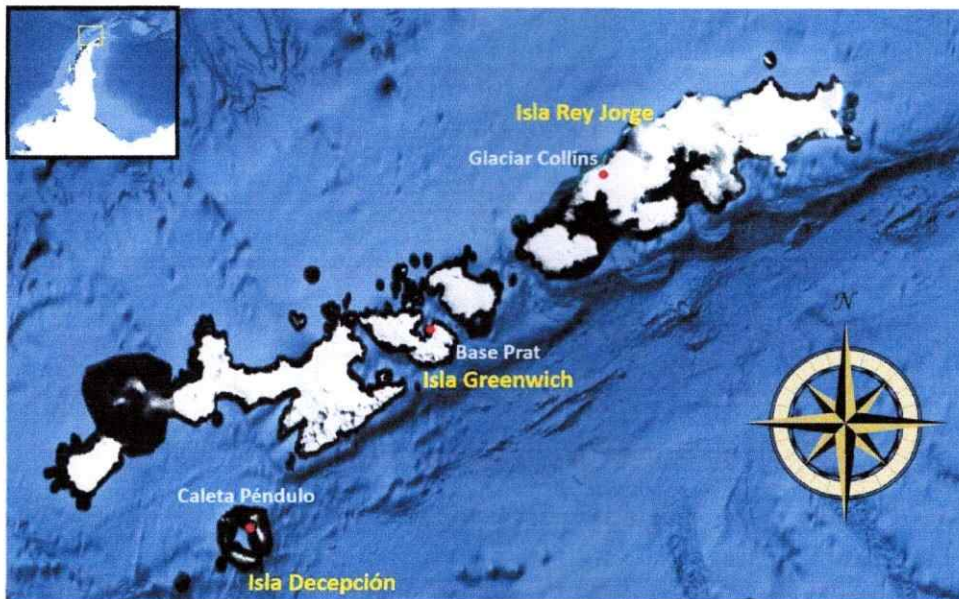
## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Aislamiento de bacterias Antárticas

Todas las muestras fueron recolectadas durante la Expedición Chilena Antártica ECA-48, financiada por el Instituto Antártico Chileno (INACH), en Enero de 2012. La cepa ATH-5 fue aislada de una muestra proveniente del Glaciar Collins (73° 41' S; 65° 55' E), mientras ATH-41 y ATH-43 se obtuvieron de la Isla Greenwich (62° 30' S; 59° 39' W), y ATH-62 de una muestra proveniente de la Isla Decepción (62° 55'; 60° 37' W), todas localizadas en la Península Antártica. Para promover el enriquecimiento bacteriano, las muestras se suspendieron en 1 mL de medio LB suplementado con anfotericina B 2,5 µg/mL -para prevenir la proliferación de hongos- e incubaron por 16 h a temperatura ambiente. Luego, un volumen (60 µL) de cada cultivo se sembró individualmente en placas de LB agar suplementadas con HgCl<sub>2</sub> 40 µM y K<sub>2</sub>TeO<sub>3</sub> 40µM, e incubadas a 25 °C por 48 h. Los aislados puros fueron obtenidos a través de sucesivos pasajes en placas suplementadas con los mismos metales y fueron preservados en *stocks* de glicerol 15% a -80 °C. Para determinar la temperatura óptima de crecimiento, los aislados fueron crecidos de manera individual a 4, 25 y 37 °C.

### 2.2 Secuenciación del gen 16S rDNA y detección del gen *merA*

La secuenciación del gen que especifica el rRNA 16S, se llevó a cabo por PCR de colonias usando GoTaqDNA Polymerase Master Mix (Promega) y los partidores universales 8F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') y 1492R (5'GGTTACCTTGTTACGACTT3') (Turner *et al.*, 1999) a 55 °C como temperatura de



**Figura 2. Lugares de muestreo en la península Antártica.** Los puntos rojos representan los lugares de muestreo y aislamiento de las cepas ATH.

hibridación. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa (1%) y enviados a secuenciar a Macrogen (Korea). Las secuencias fueron analizadas por nBLAST contra la base de datos de genes de 16S bacterianos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). El gen *merA* fue identificado en las cepas ATH por PCR usando DNA genómico como templado y partidores universales para distintos fragmentos del operón *mer* (Tabla 1) (Felske *et al.* 2003). La reacción de PCR consistió en 30 ciclos de: denaturación a 95 °C 30 s, hibridación a (según cada partidore) 30 s y extensión a 72 °C 2 min. Los productos de PCR fueron secuenciados (Macrogen) y sometidos a nBLAST. La secuencia permitió determinar el codón de inicio de los genes *merA*, lo que a su vez facilitó el diseño de partidores *forward* específicos para *merA* de cada aislado. Para diseñar los partidores *reverse* de los genes *merA*, se utilizó las secuencias de los primeros hits del

análisis del nBLAST. Para clonar *merA* de ATH-5, ATH-41 y ATH-43 se incluyó los codones de inicio y excluyó los respectivos codones de término. Las secuencias de los partidores para *merA* de ATH-43 fueron: *forward* 5'-ATGACCGAACTGAAAATCATTG-3' y *reverse* 5'-CCCCCCTGCGCAGCA-3' (diseñado a partir de *P. putida* SP1, # acceso ADJ53344); para el de ATH-41: *forward* 5'-ATGACTGAATTGCAAATCGTTGG-3' y *reverse* 5'-GCCGGCGCAGCAGGAAAG-3' (diseñado a partir de *X. campestris*, # acceso Y17691); y para el de ATH-5: *forward* 5'-ATGACTACTCTGCAAATCAGC-3' y el *reverse* indicado para ATH-41. Las condiciones de PCR fueron las mismas utilizadas con los partidores P1-A5, excepto que la temperatura de hibridación fue 55 °C. Los productos de PCR fueron secuenciados (Macrogen) con el fin de obtener los marcos de lectura abiertos (ORF) completos de cada gen *merA*.

**Tabla 1. Partidores universales para identificar el operón *mer*.**

Partidor	Gen	Secuencia	Dirección	Tm (° C)
T1	<i>merT</i>	GTCTGGATCGGCAACTTGA	<i>Forward</i>	58
P1	<i>merP</i>	GGCTATCCGTCCAGCGTCAA	<i>Forward</i>	64
A1	<i>merA</i>	ACCATCGGCGGCACCTGCGT	<i>Forward</i>	68
A5	<i>merA</i>	ACCATCGTCAGGTAGGGGACCAA	<i>Reverse</i>	72
A7	<i>merA</i>	TGGCGCATTGACAGTBGACCC	<i>Reverse</i>	66-68
A9	<i>merA</i>	GAAYTGGATCCAGACGGCKG	<i>Forward</i>	62-64
A10	<i>merA</i>	GATCATGATCTTGGACGGCACACA	<i>Reverse</i>	72
D1	<i>merD</i>	TCATGGCAAACCTCTCCGC	<i>Reverse</i>	56

### 2.3 Árboles filogenéticos

Las secuencias casi completas de los genes de 16S rRNA y las secuencias

completas de los genes *merA* (secuencia traducida) fueron utilizadas para construir árboles filogenéticos. Para obtener las primeras, los productos de PCR fueron además secuenciados utilizando los partidores universales 518F y 800R (Macrogen). La edición de las secuencias, el alineamiento y la creación de *contigs* se llevó a cabo usando el *software* Vector NTI v10 (Invitrogen). Los *contigs* de los genes 16S rRNA fueron comparados por nBLAST contra las bases de datos de secuencias 16S rRNA de los dominios Bacteria y Arquea de NCBI para establecer las cepas tipificadas más cercanas. También se compararon contra la base de datos de nucleótidos totales (*Nucleotide Collection Databases*, NCBI) para determinar otros organismos filogenéticamente relacionados. La construcción de los árboles filogenéticos se basó en la región V1-V9 de las secuencias de los genes 16S rRNA usando el algoritmo Neighbor Joining (Saitou y Nei, 1987). En tanto, para *merA* se construyeron árboles filogenéticos mediante el uso del algoritmo Maximum-likelihood con valores bootstrap de 1000 réplicas con el *software* MEGA versión 6.0 (Tamura *et al.* 2013). Todas las secuencias fueron depositadas en GenBank con los siguientes números de acceso: KR15900 (16S rRNA\_ATH-5), KR15899 (16S rRNA\_ATH-41), KR15898 (16S rRNA\_ATH-43), KR18929 (16S rRNA\_ATH-62), KR818931 (*merA*\_ATH-5), KR827601 (*merA*\_ATH-41), y KR818930 (*merA*\_ATH-43).

#### **2.4 Susceptibilidad a antibióticos y caracterización bioquímica**

Para los análisis de susceptibilidad a antibióticos, las células fueron crecidas hasta fase exponencial y sembradas en placas de agar Mueller-Hinton (Difco). Posteriormente

se colocó en la superficie de la placa una argolla multidisco con antibióticos para bacterias Gram (-) (Valtek) y se incubó a temperatura ambiente por 48 h. Los halos de inhibición del crecimiento fueron medidos y comparados con los valores del *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI). Para la caracterización bioquímica se utilizó el test de API (BioMérieux) según las instrucciones del fabricante.

## **2.5 Curvas de crecimiento, áreas de inhibición del crecimiento y determinación de concentraciones mínimas inhibitorias**

Las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) de  $K_2TeO_3$  y  $HgCl_2$  fueron determinadas en medio LB suplementado con concentraciones crecientes de los respectivos tóxicos. Se depositó una alícuota de cultivo en fase estacionaria a una dilución 1:100. Para determinar la MIC de  $K_2TeO_3$  en presencia de  $HgCl_2$ , todos los cultivos fueron suplementados con  $\frac{1}{4}$  de la MIC de  $HgCl_2$  (determinada previamente para cada cepa) y concentraciones crecientes de  $K_2TeO_3$ . Para la construcción de las curvas de crecimiento, las células de un cultivo en fase estacionaria fueron inoculadas en medio LB en una dilución 1:100 (volumen final = 1 mL). Luego se trataron en las siguientes condiciones: MIC de  $K_2TeO_3$ ,  $\frac{1}{4}$  MIC de  $HgCl_2$  y ambos tóxicos combinados a esas concentraciones y se crecieron con agitación a 25 °C por 15 h. La  $OD_{600}$  fue monitoreada usando el multilector Tecan Infinite 200 PRO.

Para determinar las áreas de inhibición del crecimiento, todas las cepas fueron crecidas hasta una  $OD_{600} \sim 0,3$  y sembradas en placas LB agar suplementadas o no con  $\frac{1}{4}$

de la MIC de  $\text{HgCl}_2$  correspondiente a cada cepa. Luego se colocó discos de papel estériles en el centro de la placa a los que se agregó 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{K}_2\text{TeO}_3$  400 mM y las placas se incubaron a 25 °C por 48 h.

## 2.6 Cuantificación de especies reactivas de oxígeno y tioles totales

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) fueron determinadas usando la sonda 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato ( $\text{H}_2\text{DCFDA}$ , Sigma-Aldrich) como se describió anteriormente (Pérez *et al.* 2007). Brevemente, los cultivos se crecieron hasta una  $\text{OD}_{600} \sim 0,3$  y se trataron con  $\frac{1}{4}$  MIC de  $\text{HgCl}_2$ ,  $\frac{1}{2}$  MIC de  $\text{K}_2\text{TeO}_3$  o con ambos tóxicos simultáneamente a las mismas concentraciones a 25 °C por 30, 60 y 90 min. Las mediciones se llevaron a cabo después de cada tratamiento excitando la sonda a 490 nm y midiendo la intensidad de la fluorescencia a 519 nm en un multilector Tecan Infinite 200 PRO. La intensidad de fluorescencia fue normalizada por la  $\text{OD}_{600}$ .

El contenido total de tioles celulares fue cuantificado por el método de Ellman (1959) usando 5,5'-ditiobis-(ácido-2-nitrobenzoico) (DTNB, Sigma-Aldrich), como se comunicó previamente (Turner *et al.* 1999). Las condiciones experimentales fueron las mismas que para la determinación de ROS. La absorbancia del ácido trinitrobenzoico ( $\text{TNB}^{-2}$ ) fue medida espectrofotométricamente a 412 nm (coeficiente de extinción molar 13600  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Para la calibración del ensayo se construyó una curva estándar con glutatión reducido (Sigma-Aldrich). Los valores fueron normalizados por la concentración de proteínas determinadas por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y se aplicó la prueba



*Student's t-test* para todos los análisis estadísticos cuando fue requerido.

## **2.7 Determinación de la concentración de NADPH intracelular**

Para cuantificar los niveles de NADPH intracelulares se utilizó el protocolo de Zhang *et al.* (2000) con algunas modificaciones. Brevemente, las células se crecieron en un volumen total de 40 mL hasta un OD<sub>600</sub> ~0,3 y se trataron en las mismas condiciones que los experimentos de cuantificación de ROS y tioles. Luego se cosecharon, lavaron con *buffer* PBS, suspendieron en 1,5 mL de *buffer* de extracción (Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, EDTA 0,01 M y Tritón X-100 0,05%) y sonicaron con 6 pulsos de 15 s. El extracto crudo se obtuvo centrifugando 15 min a 13500 x g. Posteriormente se mezcló 500 µL de extracto crudo con 290 µL de *buffer* de extracción, 10 µL (5 U) de glutatión reductasa (GOR) de *E. coli* purificada (Sigma-Aldrich) y 200 µL de diglutatión 5 mM (GSSG, Sigma-Aldrich). Como control negativo la misma mezcla de reacción no contuvo GOR o GSSG. Todas las reacciones se iniciaron agregando GSSG y se incubaron a 25 °C por 5 min; la absorbancia a 340 nm se midió inmediatamente en un multilector Tecan Infinite 200 PRO. Se definió A<sub>1</sub> como la absorbancia de las reacciones control (sin GOR o GSSG) y como A<sub>2</sub> aquella de las reacciones experimentales. La absorbancia del NADPH consumido se obtuvo restando A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>. Para calcular la concentración de NADPH a partir de las restas de absorbancia se construyó una curva de calibración de NADPH (Sigma-Aldrich).

## **2.8 Ensayo de viabilidad celular**

La viabilidad celular se determinó vía recuento de unidades formadoras de colonia

(UFC) sembrando 100  $\mu$ l de diluciones seriadas de las cepas tratadas (30 min) con las mismas concentraciones de tóxico utilizadas en las curvas de crecimiento e incubando a 25 °C por 48 h.

## 2.9 Secuenciación, ensamble y anotación del genoma de la cepa ATH-43

La cepa ATH-43 se creció en medio LB suplementado con HgCl<sub>2</sub> 40  $\mu$ M a 25 °C por 48 h y se extrajo DNA utilizando el *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega). La calidad y cantidad del DNA fue determinada por electroforesis en geles de agarosa (0,8%) teñido con bromuro de etidio, además de la razón de absorbancia 260/280 nm usando el multilector Tecan Infinite 200 PRO.

El borrador de la secuencia genómica de *P. putida* ATH-43 fue llevada a cabo con la plataforma Illumina Hiseq 2000 usando una librería *mate pair* de 3 kb (Macrogen). En total se obtuvo 10,05 millones de lecturas con una longitud promedio de 101 nt. Todas las lecturas fueron filtradas según su calidad y ensambladas usando el *software* A5 para ensamblaje de genomas microbianos *de novo* (Tritt *et al.* 2012). El genoma ensamblado de *P. putida* ATH-43 consiste en 5.8 Mpb distribuidos en 260 *contigs* organizados en 64 *scaffolds* con una cobertura de 172X.

La predicción de los marcos de lectura abiertos y la anotación fue llevada a cabo usando procedimientos estándares (Tanenbaum *et al.* 2010). Los genes fueron predichos usando Glimmer 3.02 (Salzberg *et al.* 1998). Las potenciales secuencias codificantes fueron anotadas por comparación con bases de datos públicas. BLAST 2.2.31 (Altschul *et al.* 1990) fue usada para encontrar secuencias homólogas con las bases de datos COG,

UNIPROT y NCBI; y Hmmer 3.1 fue usada contra PFAM y TIGRFAM. La reconstrucción automática metabólica fue llevada a cabo usando el *software* PRIAM (Claudel-Renard *et al.* 2003).

## 2.10 Promedio de identidad de nucleótidos y análisis del pangenoma

El promedio de identidad de nucleótidos (ANI, *Average Nucleotide Identity*) fue determinado con pyANI usando ANIm, que se basa en modelos ocultos de Markov. Para el análisis del pangenoma se utilizó GET\_HOMOLOGS con tres algoritmos de agrupamiento (*best-hit* bidireccional, COGtriangles y OrthoMCL). Sólo los resultados congruentes entre los tres algoritmos fueron utilizados en el análisis final. Los genomas de *P. putida* usados para estos análisis fueron: *P. putida* W619 (CP000949), SQ1 (JTCJ00000000), F1 (CP000712), KT2440 (AE015451), SF1 (LDPF00000000), BIRD-1 (CP002290), DLL-E4 (CP007620), H8234 (CP005976) y NBRC (AP013070).

## 2.11 Purificación de RNA y PCR en tiempo real (qPCR)

El RNA purificado para secuenciar los transcriptomas y para qPCR se obtuvo como sigue. Un cultivo de ATH-43 (100 mL) fue crecido hasta una OD<sub>600</sub> ~0,3 y se dividió en cuatro alícuotas iguales que se trataron con HgCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>TeO<sub>3</sub> o ambos tóxicos a las mismas concentraciones usadas para los experimentos de cuantificación de tioles y ROS, a 25 °C por 10 min. Posteriormente, las células fueron cosechadas y el RNA fue aislado y cuantificado usando el *Favorprep tissue total RNA purification mini kit* (Favorgene) y el kit *Quant-it Ribogreen* (Invitrogen), respectivamente, atendiendo a las instrucciones de

los fabricantes.

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en un termociclador *Light Cycler 1.5* usando el kit RNA *MasterSYBR Green* (Roche Applied Science). El programa de qPCR consistió en una etapa de transcripción reversa a 40 °C por 10 min, seguida de 45 ciclos de denaturación a 95 °C por 30 s, hibridación a 55 °C por 30 s, y extensión a 72 °C por 30 s. Las secuencias de los partidores usados se muestran en la tabla 2.. Todos los niveles relativos de los transcritos fueron obtenidos con el método del  $\Delta\Delta C_t$  (Livak y Schmittgen, 2001).

**Tabla 2. Partidores para qPCR**

Gen	Secuencia	Dirección
<i>merA</i>	GTTCCACCGATTCCAGGACTG	<i>forward</i>
<i>merA</i>	CAGTACGAACTCGCCGTTGG	<i>reverse</i>
<i>ahpC</i>	CAACAGCCAGGTCAAACCCTT	<i>forward</i>
<i>ahpC</i>	ATGACGTGAGTCGGGTCACC	<i>reverse</i>
<i>sodB</i>	CATCTTCAACAACGCCGCTC	<i>forward</i>
<i>sodB</i>	TAGGCGTGTTCCCAGACGTC	<i>reverse</i>
<i>katG</i>	GAAGCTCGCCCATTTC AACC	<i>forward</i>
<i>katG</i>	AGTGGGTCGCGAATGAAGAA	<i>reverse</i>
<i>16S rRNA</i>	GATTCCAACGGCTAGTTCACATC	<i>forward</i>
<i>16S rRNA</i>	CCATTGCCTTCCTGCTTGA	<i>reverse</i>
<i>gapA</i>	GATTCCAACGGCTAGTTCACATC	<i>forward</i>
<i>gapA</i>	GGTGCAAGCGTTAATCGGAA	<i>reverse</i>

## 2.12 RNAseq: Secuenciación, ensamble y anotación

### 2.12.1 Integridad del RNA total

Un total de 12 muestras [3 por cada tratamiento (mercurio, telurito, ambos tóxicos y las muestras control)] fueron secuenciadas por RNAseq en la empresa AUSTRAL-

*omics*. La integridad del RNA total fue analizada en un equipo 2100 Bioanalyzer (Agilent), con el kit RNA 6000 nano y protocolo de análisis expert Prokaryote (Agilent). Sólo muestras con RIN (*RNA Integrity Number*) superior a 7 fueron utilizadas para estudios transcriptómicos.

### **2.12.2 Cuantificación de las muestras seleccionadas por fluorescencia**

Para la elaboración de las bibliotecas de secuenciación se usó la misma cantidad de RNA por muestra. Para estimar la concentración de las mismas se utilizó el Kit Quant-iT RiboGreen RNA Assay en un fluorímetro DQ300 Hoefer. Las muestras se ajustaron a una concentración final de 1 µg por cada 20 µL de solución.

### **2.12.3 Remoción del RNA ribosomal y cuantificación de la concentración de mRNA**

Este paso es obligatorio dado que los mensajeros bacterianos no poseen extremos 3'-polyA. Para ello se llevó a cabo pruebas con los kits comerciales Ribo-Zero (Bacteria) y Ribominus Transcriptome Isolation Kit (levaduras y bacterias). Los mejores resultados se obtuvieron con el primero. Posterior a la remoción del rRNA, fue necesario nuevamente estimar la concentración con el fin de igualar las cantidades de mRNA. Todas las muestras se ajustaron a 3,5 µg de RNA/20 µL utilizando el Kit Quant-iT RiboGreen RNA Assay en un fluorímetro DQ300 Hoefer.

#### **2.12.4 Elaboración de bibliotecas, síntesis de cDNA y ligamiento de adaptadores**

Para elaboración de las bibliotecas de secuenciación se utilizó el Kit Illumina TruSeq TruSeq\_RNA\_Sample Prep. Este protocolo permite comenzar la elaboración con RNA total o mRNA purificado, opción que se seleccionó para las muestras. El mRNA fue fraccionado con las enzimas correspondientes por 8 min. Las bibliotecas fueron marcadas con distintas secuencias identificadoras o index para permitir la separación de las lecturas pertenecientes a las distintas muestras analizadas.

#### **2.12.5 Secuenciación**

Con el fin de igualar las concentraciones de las bibliotecas obtenidas (10 nM), se estimó su concentración por qPCR en un equipo LightCycler Nano System (Roche) y el kit KAPA Library Quantification – Illumina sequencing platforms, utilizando 2 diluciones distintas de cada biblioteca (1:32000, 1:64000). Como concentración inicial se consideró el promedio de las dos concentraciones obtenidas para cada muestra. En resumen, las bibliotecas fueron ajustadas a 10 nM y mezcladas en una proporción equimolar. El pool de bibliotecas fue desnaturalado con NaOH 0,2 N, llevado a una concentración 12 pM y mezclado con 1% de PhiX 12 pM (control de secuenciación, PhiX Control v3 Illumina). Finalmente se llevó a cabo una secuenciación con 600 µL de este pool y se cargó en el equipo de secuenciación MiSeq Illumina de AUSTRAL-omics, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, usando el kit de secuenciación MiSeq Reagent Kit v2 (500 ciclos).

## **2.12.6 Análisis bioinformático**

### **2.12.6a Limpieza de lecturas según calidad**

Para el proceso de limpieza total o parcial de lecturas de mala calidad, se utilizó 2 *softwares*: Trimmomatic (Bolger *et al.* 2014), para remover los adaptadores de Illumina, y el script en perl “prinseq-lite.pl” (<http://prinseq.sourceforge.net/manual.html>), para remover bases y/o lecturas de mala calidad.

### **2.12.6b Ensamble del transcriptoma de referencia**

Para el ensamble se utilizó el software Trinity (Grabherr *et al.* 2011), además de corroborar los transcritos identificados con el ensamble del genoma previo disponible. Se predijo los ORFs del genoma usando Glimmer3 (Delcher *et al.* 1999). Posteriormente se concatenó el transcriptoma *de novo* ensamblado con Trinity, en conjunto con los ORFs predichos para luego ser agrupados (98%) usando la herramienta “cd-hit” (Li y Godzik, 2006).

### **2.12.6c Mapeo de lecturas**

El procedimiento de mapeo de las lecturas se realizó utilizando el *software* CLC Genomic Workbench, obteniéndose archivos con formato “bam”, que contienen la información de las lecturas mapeadas al transcriptoma de referencia.

#### **2.12.6d Conteo de lecturas**

Este procedimiento se realiza para obtener una matriz de abundancia, la que fue utilizada posteriormente por los *softwares* estadísticos. Para este conteo se utilizó el algoritmo de RSEM (Li y Dewey, 2011), el que mediante una estimación proporciona un valor de abundancia real.

#### **2.12.6e Expresión diferencial**

Para la expresión diferencial los análisis estadísticos fueron realizados usando DESeq2 (Love *et al.* 2014) de Bioconductor para el *software* R (<https://www.r-project.org/>). El algoritmo, luego de estimar transcritos expresados diferencialmente al obtener un valor de “*p*”, realiza una normalización de los mismos con respecto al total de lecturas contabilizadas en cada condición. Esto entrega finalmente un valor de *p* ajustado que será utilizado para establecer los transcritos expresados diferencialmente. En este análisis particular, se usó un valor de *p* ajustado al 5%. Los resultados de los transcriptomas se muestran en términos de número de veces de cambio con respecto al control, además del transcriptoma global en término de log(2) del RPKM (*Reads per Kilobase per Million*).

#### **2.12.6f Anotación**

Finalmente, se realizó el proceso de anotación del transcriptoma de referencia. Mediante esta anotación se obtuvo información general tanto de la biología del organismo



(anotación funcional, GO), como de los productos génicos encontrados (anotación contra *nt* del NCBI). La herramienta utilizada para la anotación fue Blast2GO (Conesa *et al.* 2005), el que realiza una combinación de algoritmos contra distintas bases de datos para la unificación de estos 2 tipos de anotación.

### 2.13 Clonamiento de *merA* presente en el plásmido pTP6

El ORF del gen *merA* fue amplificado a partir del plásmido pTP6 (Smalla *et al.* 2006) que fue cedido gentilmente por el Dr. Michael Seeger (Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile). Los partidores se diseñaron a partir de la secuencia completa del plásmido (número de acceso: AM048832.1). Las secuencias correspondientes de los partidores fueron: *forward* 5'-CACCATGCAAGAGTTAAACGAAGTTGGT-3' y *reverse* 5'-GCCGGCACAGCACGATAGCT-3'. La reacción de PCR se realizó de la misma manera que en 2.2 usando una temperatura de hibridación de 60 °C. Posteriormente el producto de PCR fue clonado en el vector de expresión pET101/D-TOPO (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Una vez clonado, éste se usó para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* TOP10 (Invitrogen). Los transformantes se seleccionaron en placas de LB agar suplementadas con ampicilina 100 µg/mL. Luego se propagó algunos clones para extraer DNA plasmidial usando el kit Zippy Plasmid Miniprep (ZymoResearch). Los plásmidos chequeados se utilizaron para transformar *E. coli* BL21 quimiocompetentes. Las transformantes se seleccionaron en placas LB con ampicilina y los clones positivos fueron identificados por PCR de colonia y almacenados en stocks de

glicerol al 12,5% a -80 °C.

#### 2.14 Purificación de MerA de pTP6

La purificación de MerA a partir de *E. coli* BL21 se llevó a cabo como sigue. Brevemente, 2 L de cultivo crecido en LB hasta OD<sub>600</sub> ~0,3 fue tratado con IPTG 1 mM por 1 h a 37 °C. Luego de sedimentar a 8000 x g por 5 min, el pellet se suspendió en *buffer* de unión (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM pH 7,4, NaCl 0,5M e imidazol 10 mM) suplementado con PMSF 0,1 mM y se sonicó en hielo por 6 min con pulsos de 15 s. Los restos celulares fueron eliminados por centrifugación a 10000 x g por 10 min, rescatándose el sobrenadante. El extracto crudo fue cargado en una columna de cromatografía de afinidad que contenía Ni<sup>+2</sup> inmovilizado (HisTrap HP, GE Healthcare) y luego de lavar con 10 mL de *buffer* de unión, la proteína se eluyó con 2 mL de *buffer* de elución (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM pH 7,4, NaCl 0,5 M e imidazol 0,5 M). Las fracciones que presentaron mayor concentración de proteínas fueron mezcladas, filtradas y concentradas por Amicon UltraSpin (<100 kDa) a 14000 x g por 10 min a 4 °C. Las proteínas fueron visualizadas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes (SDS-PAGE) cuyo gel concentrador contuvo acrilamida/bisacrilamida 5%, Tris-HCl 1,0 M pH 6,8, SDS 0,1%, persulfato de amonio (PSA) 0,1% y 10 µL de TEMED (Merck). A su vez, el gel separador contenía acrilamida/bisacrilamida 12%, Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,1%, PSA 0,1% y 15 µL de TEMED. Las muestras fueron cargadas con *buffer* de carga (glicerol 10%, Tris-HCl 50 mM pH 6,8, SDS 2%, β-mercaptoetanol 100 mM y azul de bromofenol 0,1%), calentadas a 90 °C por 10 min y fraccionadas a ~50 V. Como marcador de masa

molecular se utilizó el estándar Prestained protein MW High-range (Gibco BRL). Después de la electroforesis el gel fue lavado repetidamente con agua destilada y se reveló incubándolo 2 h en azul de Coomassie R250 0,125%, metanol 50% y ácido acético 10%. Posteriormente, el gel se lavó por 1 h con agua destilada con agitación constante y luego sumergido por 2 h en solución de destañido que contuvo metanol 10% y ácido acético 5%.

### **2.15 Western blot**

Geles SDS-PAGE no teñidos se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa a 200 mA por 3 h a 4 °C y se bloquearon toda la noche a 4 °C con PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM) conteniendo leche descremada (1%). Luego de lavar con *buffer* TBST (TBS [Tris-HCl 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7.5] y Tween 20 0,1%), las membranas se incubaron con el anticuerpo Anti-His tag (Cterm)/AP Ab (Invitrogen) a una dilución de 1:2000 en TBS con leche (1%) por 3 h con agitación a temperatura ambiente. El revelado se realizó utilizando los reactivos BCIP 0,05 g/mL (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) y NBT 0,02 g/mL (nitro-blue-tetrazolium) disueltos en *buffer* FAL (NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Tris-HCl 100 mM pH 9,5).

### **2.16 Actividad mercurio y telurito reductasa de MerA del pTP6 *in vitro***

La actividad mercurio reductasa de la enzima MerA de pTP6 se monitoreó cuantificando la oxidación de NADPH *in vitro*. El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos UV-Star Ultracruz (Santa Cruz) conteniendo el *buffer* de reacción compuesto por *buffer* fosfato de potasio 50 mM pH 7,4, β-mercaptoetanol 1 mM, HgCl<sub>2</sub> 0,2 mM, MerA

purificada 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y NADPH 200  $\mu\text{M}$ . La reacción se inició agregando el NADPH y la absorbancia a 340 nm se determinó en un multilector Tecan Infinite 200 PRO.

Por otro lado, la actividad telurito reductasa se midió en placas de 96 pocillos conteniendo *buffer* TR (Tris-HCl 50 mM pH 7,4,  $\beta$ -mercaptoetanol 1 mM y  $\text{K}_2\text{TeO}_3$  1 mM), NADPH 250  $\mu\text{M}$  y MerA purificada 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Se determinó la absorbancia a 500 nm en un multilector Tecan Infinite 200 PRO. Se definió una unidad enzimática (U) como la cantidad de enzima necesaria para aumentar en 0,001 unidades la absorbancia a 500 nm en 1 min (Chiong *et al.* 1988).

### **2.17 Actividad de mercurio reductasa y telurito reductasa en extractos crudos de cepas ATH**

Las cuatro cepas se crecieron en 100 ml de medio LB hasta  $\text{OD}_{600} \sim 0,3$  y se trataron con  $\frac{1}{4}$  de MIC de los metales o mercurio/telurito por 1 h a temperatura ambiente. Los cultivos control no recibieron tratamiento. Brevemente, las células se sedimentaron por 5 min a 8000 x g, se lavaron 2 veces con 1 mL de *buffer* fosfato de sodio pH 7,4, suspendieron en 500  $\mu\text{L}$  de *buffer* fosfato de sodio y sonicaron 5 min con pulsos de 15 seg. El lisado se centrifugó a 10000 x g por 15 min, se recuperó el sobrenadante y las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford. Para determinar la actividad mercurio reductasa, 200  $\mu\text{g}$  de proteínas fueron mezclados con *buffer* MR (Tris-HCl 50 mM pH 7,5,  $\text{HgCl}_2$  100  $\mu\text{M}$ , EDTA 0,5 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 1 mM y NADPH 200  $\mu\text{M}$ ) en un volumen final de 1 mL. La reacción se inició agregando NADPH, cuya desaparición se siguió a 340 nm. Una unidad de actividad mercurio reductasa fue definida como 1  $\mu\text{mol}$

de NADPH consumidos  $\text{min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ . En el caso de la actividad telurito reductasa, 200  $\mu\text{g}$  de proteínas fueron mezclados con *buffer* TR (Tris-HCl 50 mM pH 7,5,  $\text{K}_2\text{TeO}_3$  100  $\mu\text{M}$ ,  $\beta$ -mercaptoetanol 1 mM y NADPH 200  $\mu\text{M}$ ) en un volumen final de 1 mL. La reacción se inició agregando NADPH y la formación de teluro se monitoreó a 500nm. Todos los ensayos se llevaron a cabo a 25 °C por 10 min en un multilector Tecan Infinite 200 PRO.

### 3. Resultados

#### 3.1 Identificación y caracterización de bacterias antárticas resistentes a mercurio y telurito

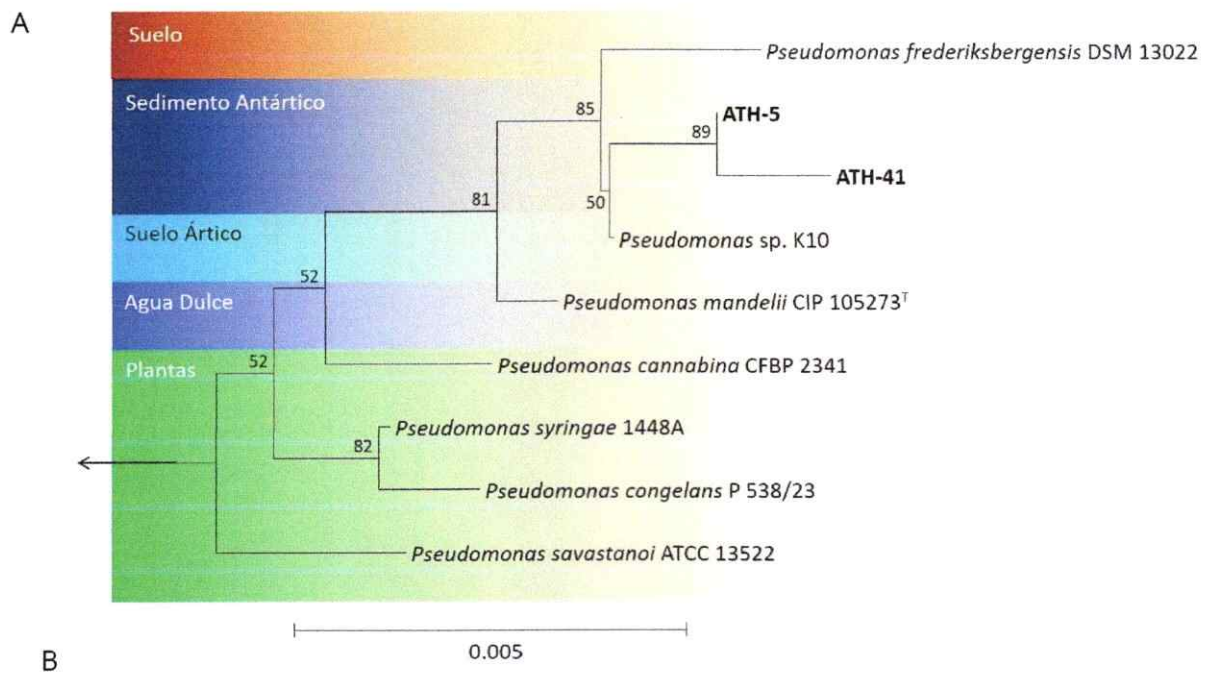
A partir de 19 diferentes muestras provenientes del territorio Antártico Chileno se obtuvieron 4 aislados (cepas ATH) que mostraron resistencia simultánea a mercurio y telurito (Tabla 3). Mientras ATH-5 se aisló del Glaciar Collins (Isla Rey Jorge), ATH-41 y ATH-43 lo fueron de la Base Prat (Isla Greenwich) y ATH-62 de Caleta Péndulo (Isla Decepción). Todas las cepas son Gram(-) y crecen entre 20 y 25 °C, excepto ATH-43, que puede crecer hasta 37 °C. La secuencia de los genes que codifican para el rRNA 16S reveló que ATH-5, ATH-41 y ATH-43 pertenecen al género *Pseudomonas*, mientras que ATH-62 está relacionada con el género *Psychrobacter*.

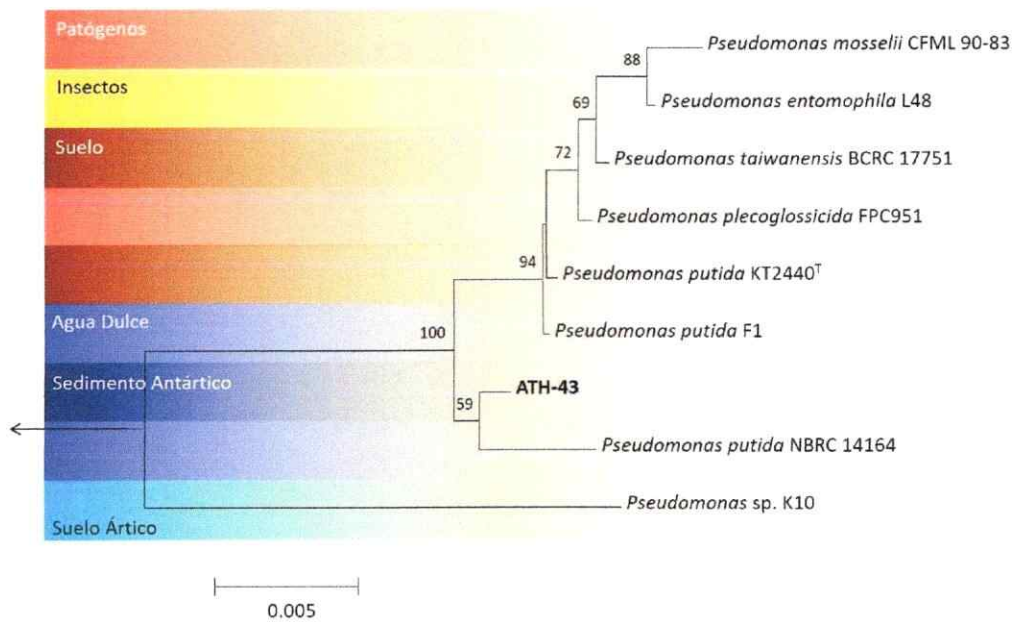
Tabla 3. Características geográficas y fenotípicas de las cepas ATH.

Cepa	Lugar de aislamiento	T Rango de crecimiento(°C)	Especie más cercana (% identidad)	<i>merA</i> más cercano (especie,% identidad)
ATH-5	Glaciar Collins	20-25	<i>Pseudomonas mandelii</i> (99%)	Tn5044 ( <i>Xanthomonas campestris</i> , 98%)
ATH-41	Base Prat, Isla Greenwich	20-25	<i>Pseudomonas mandelii</i> (99%)	Tn5044 ( <i>Xanthomonas campestris</i> , 87%)
ATH-43	Base Prat, Isla Greenwich	20-37	<i>Pseudomonas putida</i> (99%)	Tn5041 ( <i>Pseudomonas putida</i> DLL-E4, 99%)
ATH-62	Caleta Péndulo, Isla Decepción	20-25	<i>Psychrobacter aquimaris</i> (99%)	ND

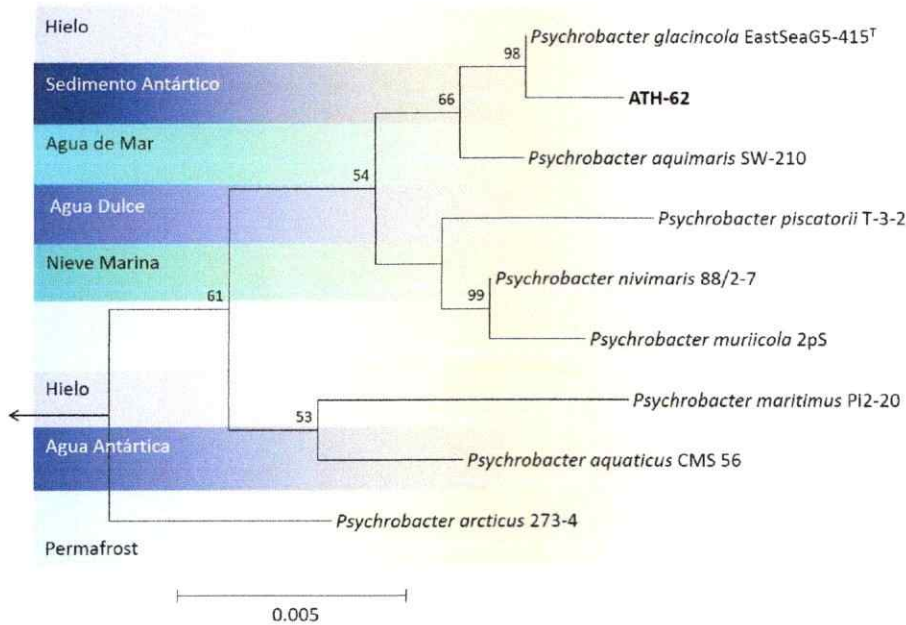
ND: No determinado

Una comparación más detallada de las secuencias de rRNA 16S de NCBI, mostró que la cepa tipificada más cercana a ATH-5 y ATH-41 fue *P. mandelii* CIP 105273<sup>T</sup>, mientras que para ATH-43 fue *P. putida* NBRC 14164<sup>T</sup> y para ATH-62 el halófilo *P. aquimaris* SW-210<sup>T</sup> (Yoon *et al.* 2005). Árboles filogenéticos basados en las secuencias 16S mostraron que ATH-5 y ATH-41 están relacionadas filogenéticamente con *P. frederikbergensis* DSM 13022<sup>T</sup> y *Pseudomonas* sp. K10 (**Figura 3A**), mientras que ATH-43 lo está con varias especies de *P. putida* (**Figura 3B**) y ATH-62 con *P. glacincola* EastSeaG5-415 (**Figura 3C**).





C



**Figura 3. Árboles filogenéticos basados en las secuencias casi completas de los rRNA 16S de las cepas Antárticas.** Los números de los nodos representan el porcentaje de réplicas de 1000 *bootstrap* (valores bajo el 50% no se muestran). A, Árbol filogenético de las cepas ATH-5 y ATH-41. B, Árbol filogenético de la cepa ATH-43. C, Árbol filogenético de la cepa ATH-62. Se consideraron las posiciones 28-1447 (árboles A y B) y 31-1452 (árbol C) de la secuencia del gen rRNA 16S de *E. coli* K12. La escala representa 0,005 sustituciones por posición por nucleótido. Las flechas indican la secuencia *outgroup* correspondiente a *E. coli* K12 (AP012306).



Mientras ATH-5, ATH-41 y ATH-43 son resistentes a casi todos los antibióticos excepto amikacina, gentamicina y ciprofloxacino, ATH-62 fue sensible a todos los antibióticos ensayados (Tabla 4). Los resultados del test API de ATH-5, ATH-41 y ATH-43 fueron muy similares, a diferencia de ATH-62 que utiliza todas las fuentes de carbono probadas (Tabla 5). Para identificar el operón *mer*, se usó partidores universales que amplifican una secuencia específica que incluye parte del extremo 3' de *merP* y parte del 5' de *merA* (para más detalles, ver Métodos). De este modo se detectó el operón *mer* en ATH-5, ATH-41 y ATH-43 (Tabla 3) y no se detectó en la cepa ATH-62, a pesar de reiterados intentos utilizando diferentes partidores y condiciones de PCR.

Las secuencias obtenidas a partir de la amplificación de los partidores P1-A5 de ATH-5, ATH-41 y ATH-43 fueron utilizadas para diseñar partidores específicos para amplificar los ORF de *merA*. Una vez disponible las secuencias, un análisis de BLAST mostró que *merA* de ATH-5 y ATH-41 estaba relacionado con *merA* del transposón Tn5044 de *X. campestris* (Tabla 3). Por otro lado, *merA* de ATH-43 exhibió una alta identidad con el gen *merA* de *P. putida* DLL-E4 (Tabla 3). Un árbol filogenético basado en las secuencias traducidas de los genes *merA* de los aislados ATH comprobó que éstas están filogenéticamente relacionadas principalmente con secuencias encontradas en elementos transponibles (Tn5041, Tn5044 y Tn5046) de diferentes especies de *Pseudomonas* (Figura 4).

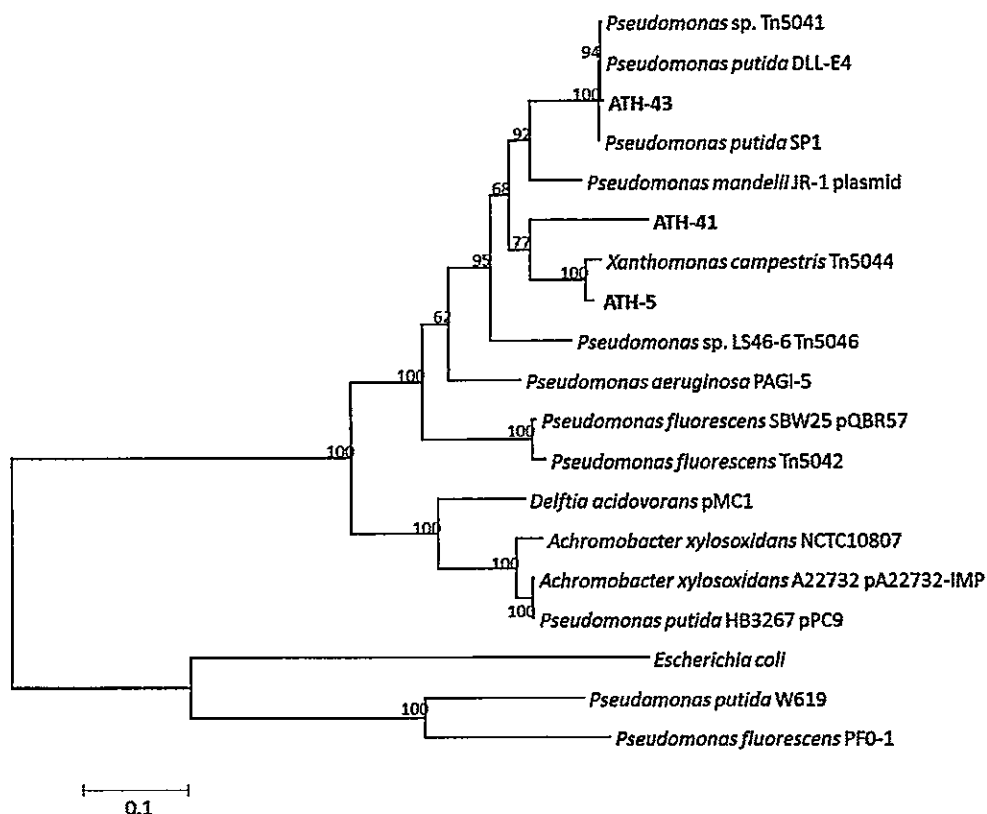
**Tabla 4. Ensayo de susceptibilidad a antibióticos de las cepas ATH.**

Antibiótico	ATH-5	ATH-41	ATH-43	ATH-62
Cefotaxima (CTX 30 µg)	R	R	R	S
Amikacina (AK 30 µg)	S	S	S	S
Gentamicina (GE 10 µg)	S	S	S	S
Ciprofloxacina (CIP 5 µg)	S	S	S	S
Cefalotina (CF 30 µg)	R	R	R	S
Amp-Sulbactam (SAM 10/10 µg)	R	R	R	S
Ceftazidima (CAZ 30 µg)	R	R	R	S
Cefuroxima (CXM 30 µg)	R	R	R	S
Sulfatrimethoprim (SXT 25 µg)	R	R	R	S
Cloranfenicol (C 30 µg)	R	R	R	S

S: Sensible; R: Resistente

**Tabla 5. Test API de las cepas ATH.**

Test	ATH-5	ATH-41	ATH-43	ATH-62
β-Galactosidasa	-	-	-	+
Arginina-dihidrolasa	+	+	+	+
Lisina descarboxilasa	-	-	-	-
Ornitina descarboxilasa	-	-	-	+
Triptófano deaminasa	-	-	+	-
Ureasa	-	-	-	-
Gelatinasa	-	-	-	-
<b>Fermentación de</b>				
Citrato	+	+	+	+
Glucosa	-	-	+	+
Manosa	+	+	-	+
Inositol	+	+	-	-
Sorbitol	-	-	-	+
Ramnosa	-	-	-	+
Sacarosa	-	-	-	+
Melibiosa	-	-	+	+
Amigdalina	-	-	-	+
Arabinosa	-	-	-	+
<b>Producción de</b>				
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-
Indól	-	-	-	-
NO <sub>2</sub>	+	+	-	+
N <sub>2</sub>	-	-	-	-



**Figura 4.** Árbol filogenético de secuencias *merA* de ATH-5, ATH-41 y ATH-43. Árbol se basó en el algoritmo Maximum-likelihood (secuencias de nucleótidos traducidas). Los números de los nodos representan réplicas de 1000 *bootstrap* (valores bajo el 50% no se muestran). El árbol fue enraizado a la secuencia paróloga de *MerA*, la enzima glutatión reductasa (*Gor*) de tres especies diferentes (*E. coli*, *P. putida* W619 y *P. fluorescens*). La escala representa 0,1 sustituciones por posición por nucleótido.

### 3.2 El mercurio aumenta la resistencia a telurito de las *Pseudomonas* antárticas

Experimentos preliminares mostraron que ATH-43 crece en presencia de telurito 40  $\mu$ M sólo si los cultivos son suplementados con concentraciones sub-letales de mercurio. Estas observaciones llevaron a probar si este fenómeno se extrapolaba a todos los aislados identificados. Como primera aproximación experimental se determinó las MIC de los metales y metaloides en estudio para cada aislado. Mientras ATH-43 mostró

la mayor MIC de mercurio (HgMIC) y la menor de telurito (TeMIC), ATH-5 y ATH-41 exhibieron casi la misma sensibilidad a ambos tóxicos. Por otro lado, y aunque mostró tener una HgMIC similar en relación a las otras cepas, ATH-62 mostró la mayor resistencia a telurito (**Tabla 6**).

Para determinar si el mercurio puede inducir la resistencia a telurito en las cepas ATH, se determinó la TeMIC en presencia de concentraciones subletales de mercurio. Los resultados mostraron que ésta aumentó 8,3 veces en ATH-43 en comparación con la situación sin mercurio. En el caso de ATH-5, la TeMIC aumentó 1,5 veces mientras que en ATH-41 permaneció inalterada. Por último, la TeMIC para ATH-62 disminuyó 2,3 veces en presencia de mercurio (**Tabla 6**).

**Tabla 6. Concentraciones mínimas inhibitorias ( $\mu\text{M}$ ) de mercurio, telurito y telurito en presencia de mercurio ( $\text{TeO}_3^{-2}/\text{Hg}^{+2}$ ).**

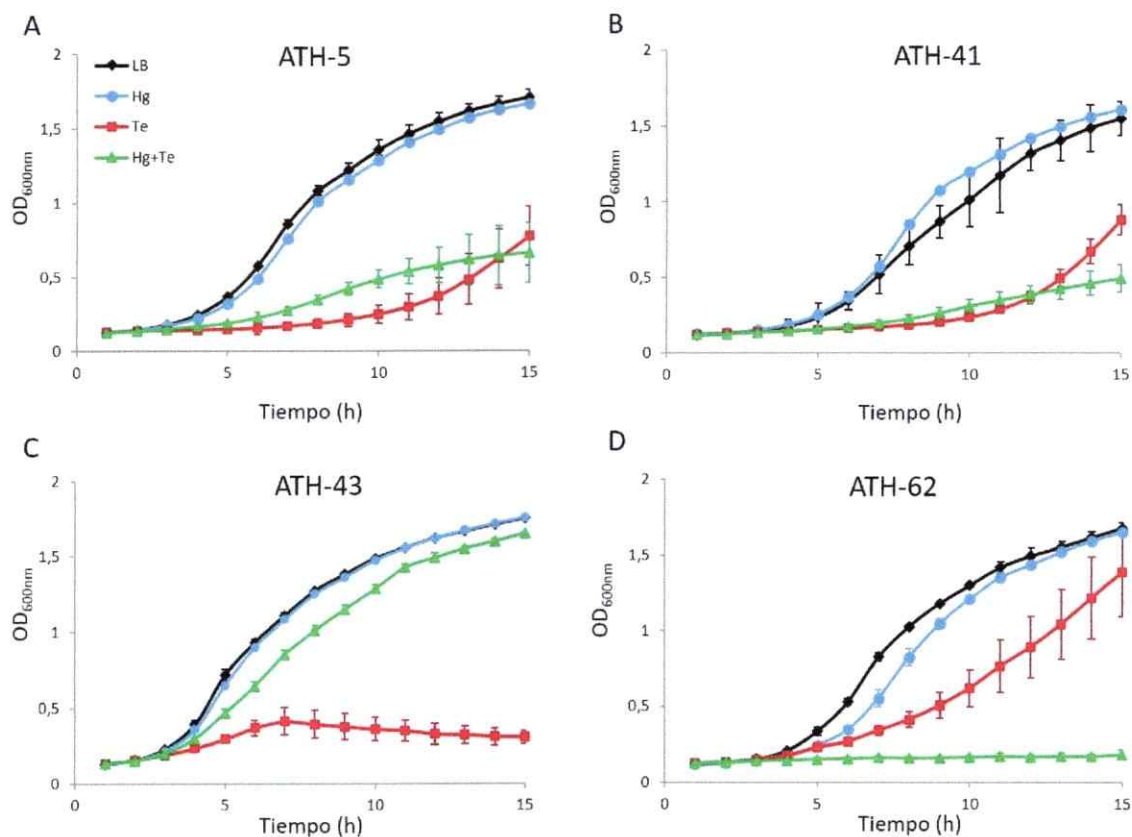
Cepa	$\text{Hg}^{+2}$	$\text{TeO}_3^{-2}$	$\text{TeO}_3^{-2}/\text{Hg}^{+2}$
ATH-5	100	80	120
ATH-41	100	120	120
ATH-43	200	24	200
ATH-62	80	700	300

Luego se construyó curvas de crecimiento en cuatro condiciones distintas: sin tóxico (control), con mercurio, con telurito y con ambos tóxicos (**Figura 5**). Las curvas de crecimiento de ATH-5 y ATH-41 fueron similares en todos los tratamientos (**Figura 5A y B**). Crecieron de igual manera en el control como en presencia de mercurio, pero con telurito y mercurio/telurito el crecimiento decayó drásticamente con un leve repunte de ATH-5 en el tratamiento de mercurio/telurito (**Figura 5A**). Por otro lado, el tratamiento

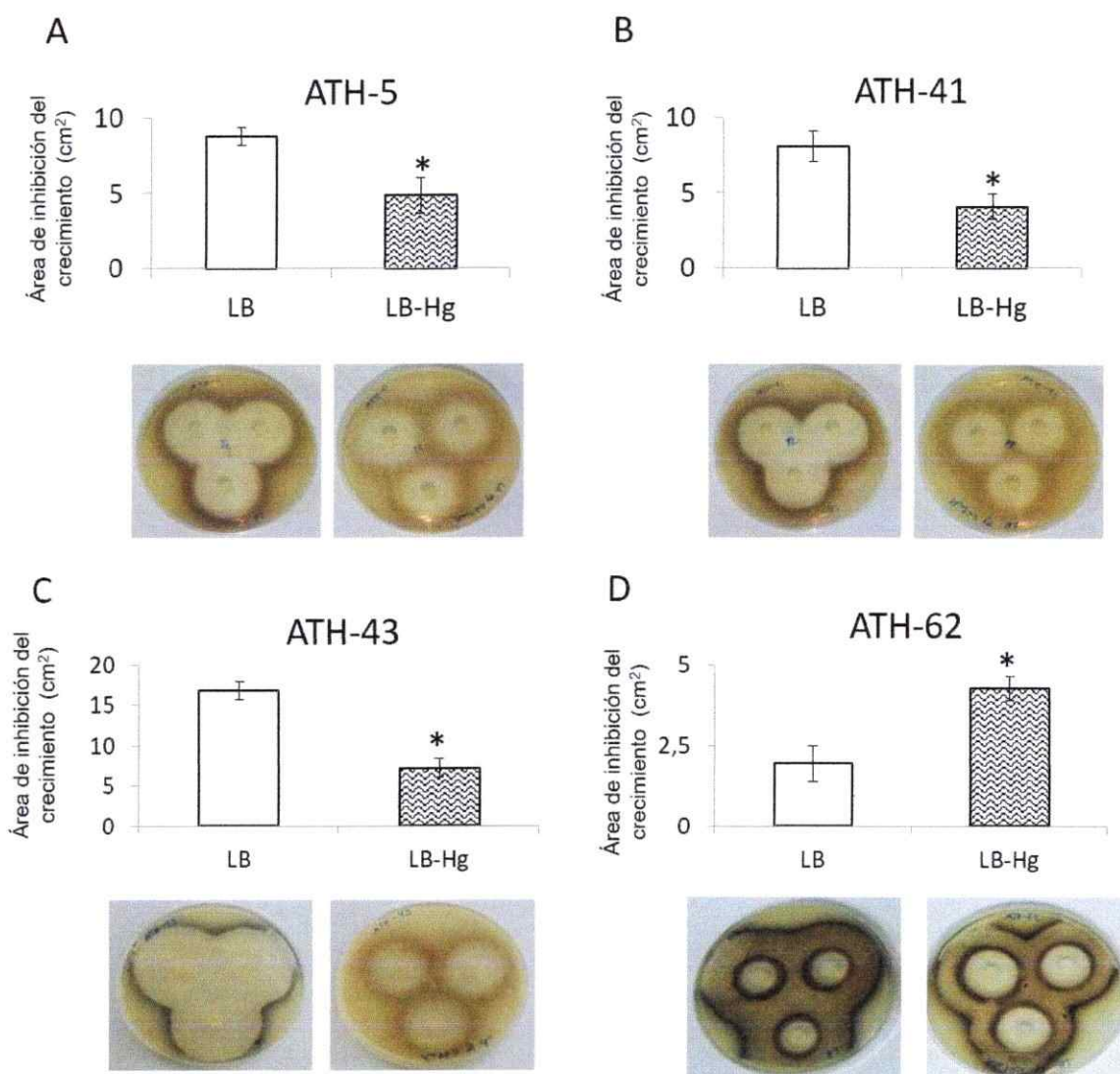


con mercurio no alteró el crecimiento de ATH-43, y como era esperado, la presencia de telurito inhibió rápidamente su crecimiento (**Figura 5C**). Interesantemente, el tratamiento combinado de los tóxicos no afectó el crecimiento de ATH-43, el que fue similar al control y en presencia de mercurio. Por su parte y a diferencia de las *Pseudomonas*, ATH-62 mostró un retraso en el crecimiento en presencia de telurito y una inhibición total con ambos tóxicos (**Figura 5D**).

Como una tercera aproximación experimental para caracterizar el fenotipo de potenciación de la resistencia a telurito dada por mercurio, se determinó áreas de inhibición del crecimiento en presencia de telurito cuando existe o no mercurio en el medio (**Figura 6**). Como se mencionó, ATH-43 exhibió el efecto de potenciación más evidente y de hecho, el área del halo de inhibición de crecimiento disminuyó 2,5 veces en presencia de mercurio (**Figura 6C**). Tanto en ATH-5 como ATH-41 se observó una leve pero significativa disminución del área en presencia de mercurio (**Figura 6A y 6B**). Con ATH-62 se evidenció un efecto contrario, en que el área de inhibición aumentó 2,2 veces en presencia de mercurio en relación a su control (**Figura 6D**). En conjunto, estos resultados sugieren que el mercurio potencia la resistencia a telurito en las cepas de *Pseudomonas* antárticas, especialmente ATH-43, no observándose este fenómeno en *Psychrobacter* sp. ATH-62.



**Figura 5. Curvas de crecimiento de las cepas antárticas.** El crecimiento de ATH-5 (A), ATH-41 (B), ATH-43 (C) y ATH-62 (D) fue monitoreado midiendo la OD<sub>600</sub> por 15 h en cuatro condiciones experimentales: control (rombo negro), mercurio (círculo azul), telurito (cuadrado rojo) y mercurio/telurito (triángulo verde). Los datos representan la media ± DE de tres experimentos independientes.



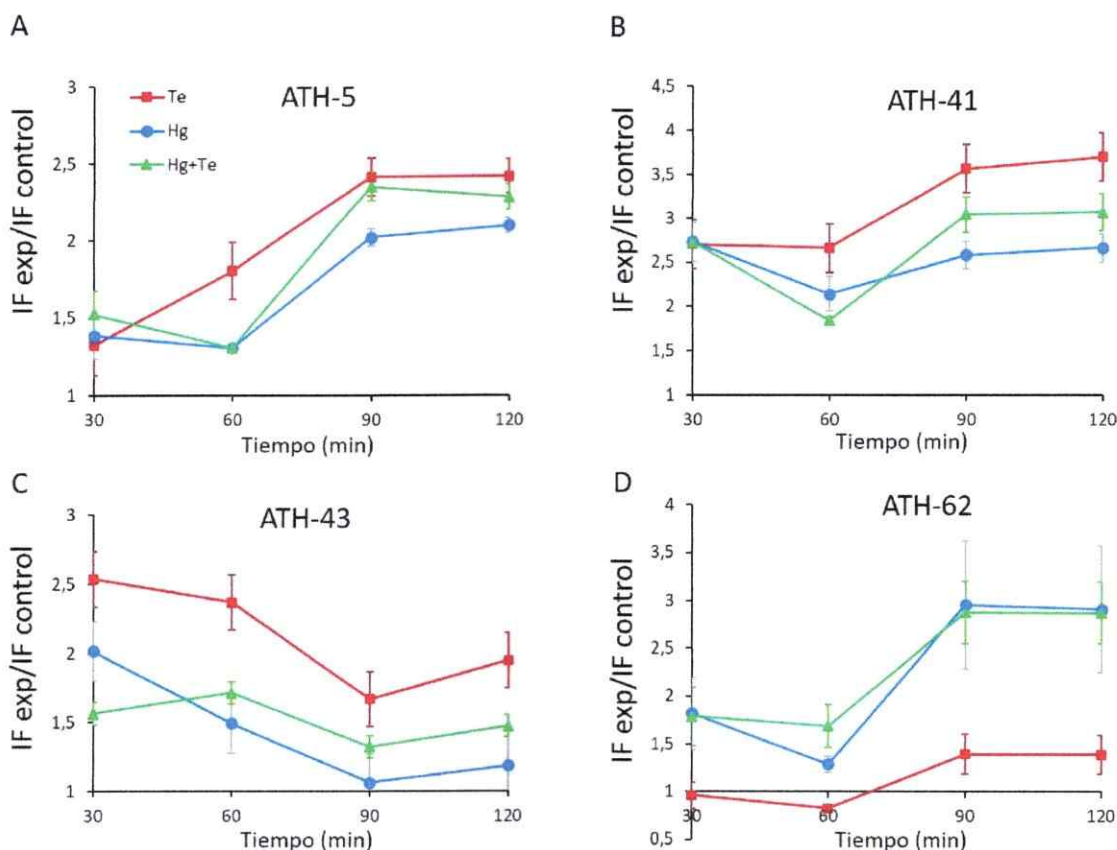
**Figura 6. Áreas de inhibición del crecimiento de las cepas ATH.** Las células se crecieron en placas LB suplementadas o no con mercurio. Los halos de inhibición se midieron luego de incubar a 25 °C por 24 h. Las áreas de inhibición de ATH-5 (A), ATH-41 (B), ATH-43 (C) y ATH-62 (D) se muestran como el promedio  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. El asterisco representa un valor  $p < 0,05$ . Bajo cada gráfico de barras se muestran 2 fotografías representativas de cada experimento.

### 3.3 Determinación del contenido de ROS y tioles en las cepas antárticas expuestas a mercurio y telurito

Previamente se ha demostrado que tanto mercurio como telurito inducen la producción de ROS (Gao *et al.* 2013; Pérez *et al.* 2007), y que también exhiben gran

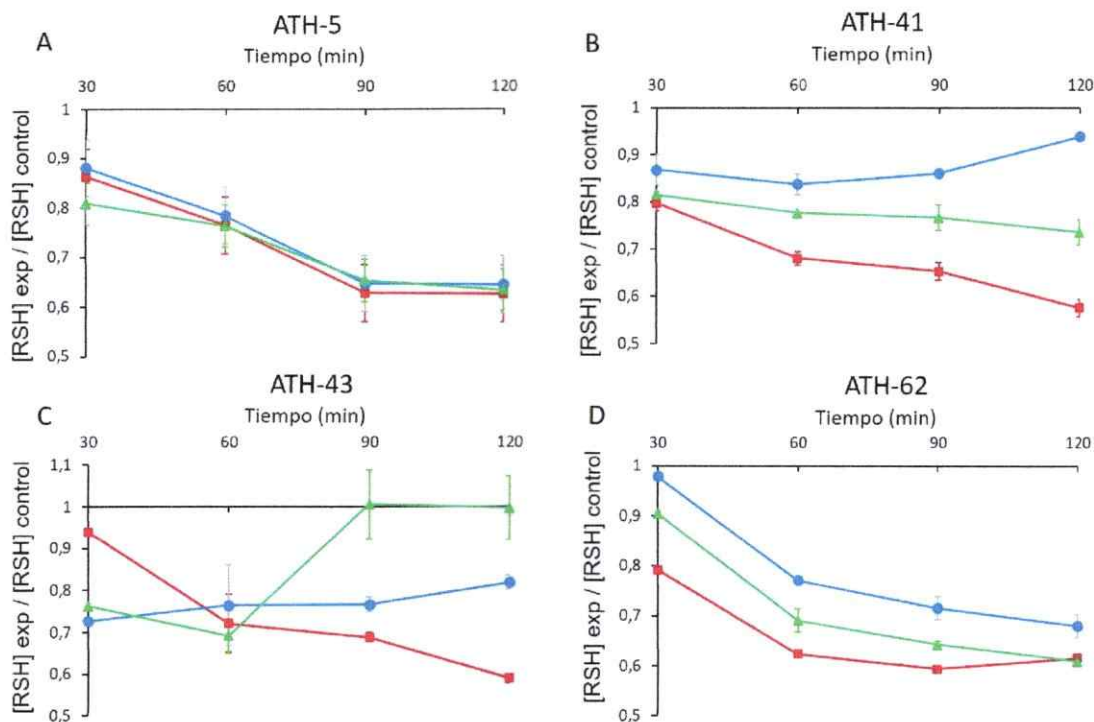


afinidad por moléculas que contienen grupos sulfhidrilo (Turner *et al.* 1995, 1999). En este contexto, se cuantificó los niveles de ROS en términos de intensidad de fluorescencia, bajo las mismas condiciones experimentales descritas anteriormente (Figura 7). En general, los resultados muestran que los niveles de ROS en ATH-5 y ATH-41 aumentan más del doble en presencia de los mismos (Figura 7A y B). Los tratamientos con mercurio y mercurio/telurito mostraron una tendencia a disminuir los niveles de ROS a los 60 min, los que aumentaron a tiempos mayores. Por su parte, ATH-43 mostró más ROS con telurito que con mercurio o ambos (Figura 7C). Interesantemente y a los 90 min, los tratamientos con mercurio y mercurio/telurito mostraron concentraciones relativas similares de ROS con respecto al control (Figura 7C). Al contrario que las *Pseudomonas*, en ATH-62 el telurito no alteró significativamente los niveles de ROS en relación al control, lo que sí ocurrió durante la exposición a mercurio o mercurio/telurito (Figura 7D). Estos resultados muestran que el telurito aumenta la producción de ROS en los aislados, la que sin embargo disminuye en presencia de mercurio, especialmente en ATH-43. En ATH-62 en tanto, la presencia de mercurio no favoreció la disminución del contenido de ROS, siendo evidente en el tratamiento combinado con mercurio/telurito.



**Figura 7. Cuantificación de ROS en las cepas antárticas.** Las células fueron crecidas hasta  $OD_{600} \sim 0,3$  y expuestas a mercurio (círculos azules), telurito (cuadrados rojos), y mercurio/telurito (triángulos verdes). El contenido de ROS en ATH-5 (A), ATH-41 (B), ATH-43 (C) y ATH-62 (D) fue determinado espectrofotométricamente a 519 nm luego de 30, 60 o 90 min de exposición como se indicó en Métodos. Los resultados se muestran como intensidad de fluorescencia de los tratamientos normalizados contra la intensidad de fluorescencia de los datos del tratamiento control. Los datos representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes,  $p < 0,05$ .

Dada la capacidad del telurito y mercurio de interactuar con tioles reducidos (RSH), el contenido de RSH fue analizado en las distintas condiciones experimentales (**Figura 8**). Este disminuyó drásticamente en ATH-5 en todos los tratamientos y no recuperó los niveles iniciales aun después de 120 min (**Figura 8A**). Por otro lado, aunque los niveles de RSH también disminuyeron en ATH-41, se observó una tendencia general a su recuperación en el tiempo en el tratamiento con mercurio (**Figura 8B**). La reducción

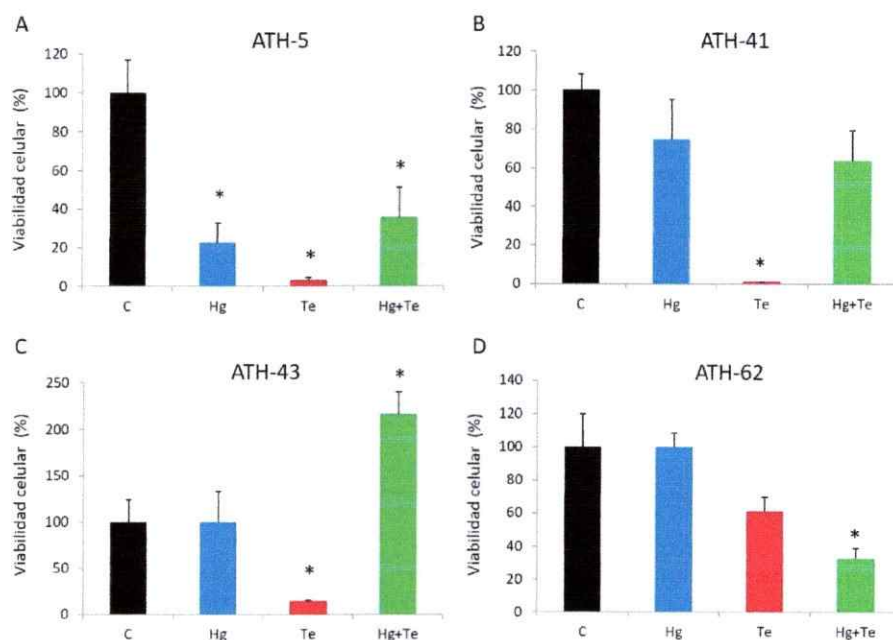


**Figura 8. Contenido de tioles en las cepas antárticas.** Las células fueron crecidas hasta  $OD_{600} \sim 0,3$  y expuestas a mercurio (círculos azules), telurito (cuadrados rojos), y mercurio/telurito (triángulos verdes).. La cuantificación de tioles en ATH-5 (A), ATH-41 (B), ATH-43 (C) y ATH-62 (D) se determinó a 412 nm luego de 30, 60 o 90 min de exposición. Los resultados se muestran como concentraciones de tioles (RSH) relativas a la concentraciones de RSH del control. Los datos se muestran como la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes,  $p < 0,05$ .

inicial en el contenido de tioles en ATH-43 se recuperó a niveles del control luego de 90 min de tratamiento combinado (**Figura 8C**). ATH-62 tuvo una respuesta similar a la de ATH-5, en que el contenido de tioles disminuyó con todos los tratamientos y permaneció a concentraciones bajas (**Figura 8D**).

### 3.4 Viabilidad de células ATH expuestas a mercurio y telurito

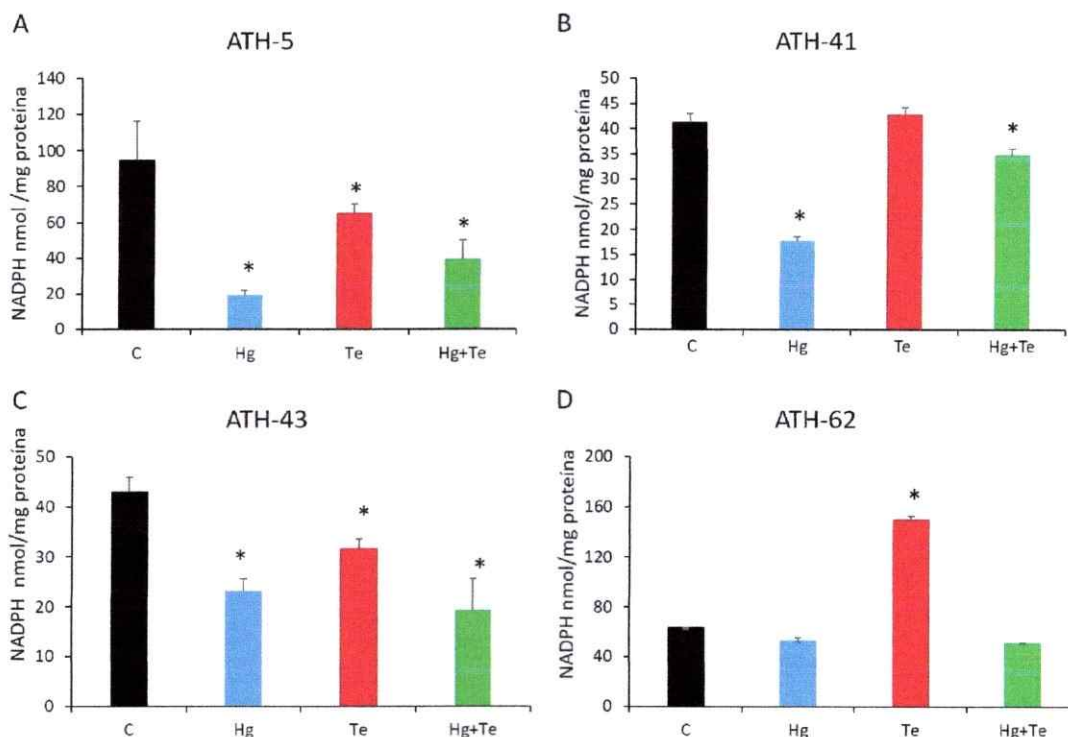
Para determinar si la presencia de mercurio protege las cepas ATH de la exposición a telurito, se cuantificó su viabilidad en las cuatro condiciones experimentales. La viabilidad de las cepas del género *Pseudomonas* disminuyó drásticamente en el tratamiento con telurito, situación que fue más leve para ATH-62 (Figura 9 A-D). En el caso de los tratamientos con mercurio y mercurio/telurito, la viabilidad siempre fue mayor que con telurito excepto para ATH-62. Interesantemente, la viabilidad se duplicó en ATH-43 tratada con ambos tóxicos (Figura 9C). Estos resultados indican que la presencia de mercurio aumenta la viabilidad celular de las cepas de *Pseudomonas* en relación al tratamiento con telurito, especialmente en ATH-43.



**Figura 9. Viabilidad celular de las cepas antárticas.** Las células se crecieron hasta  $OD_{600} \sim 0,3$  y expusieron a mercurio, telurito, y mercurio/telurito por 30 min. La viabilidad de ATH-5 (A), ATH-41 (B), ATH-43 (C) y ATH-62 (D) se determinó por conteo de unidades formadoras de colonias en placas LB agar. El número de UFC en el control sin tratamiento se consideró como 100% de viabilidad. Los datos se muestran como media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes,  $p < 0,05$ .

### 3.5 Cuantificación de los niveles de NADPH en las cepas ATH expuestas a los tóxicos

Dado que la reducción de mercurio y telurito es catalizada por enzimas que dependen de NADPH (Arenas-Salinas *et al.* 2016), se cuantificó los niveles de este cofactor en extractos crudos luego de exponer los cultivos a las cuatro condiciones experimentales. En general, el tratamiento con los tóxicos provocó una disminución del *pool* intracelular de NADPH, con la excepción de ATH-62 en que éste aumentó en presencia de telurito (**Figura 10 A-D**). Estos resultados muestran que el tratamiento con los tóxicos estimula el consumo de NADPH, al menos en las cepas de *Pseudomonas*.



**Figura 10. Cuantificación de los niveles de NADPH en las cepas antárticas.** Las células se crecieron hasta  $OD_{600} \sim 0,3$  y expusieron a mercurio, telurito, y mercurio/telurito por 60 min. Los niveles de NADPH fueron cuantificados espectrofotométricamente a 340 nm luego de 60 min de exposición en extractos crudos de ATH-5 (A), ATH-41 (B), ATH-43 (C) y ATH-62 (D). Los datos representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes,  $p < 0,05$ .

### 3.6 Características del genoma de *Pseudomonas* sp. ATH-43

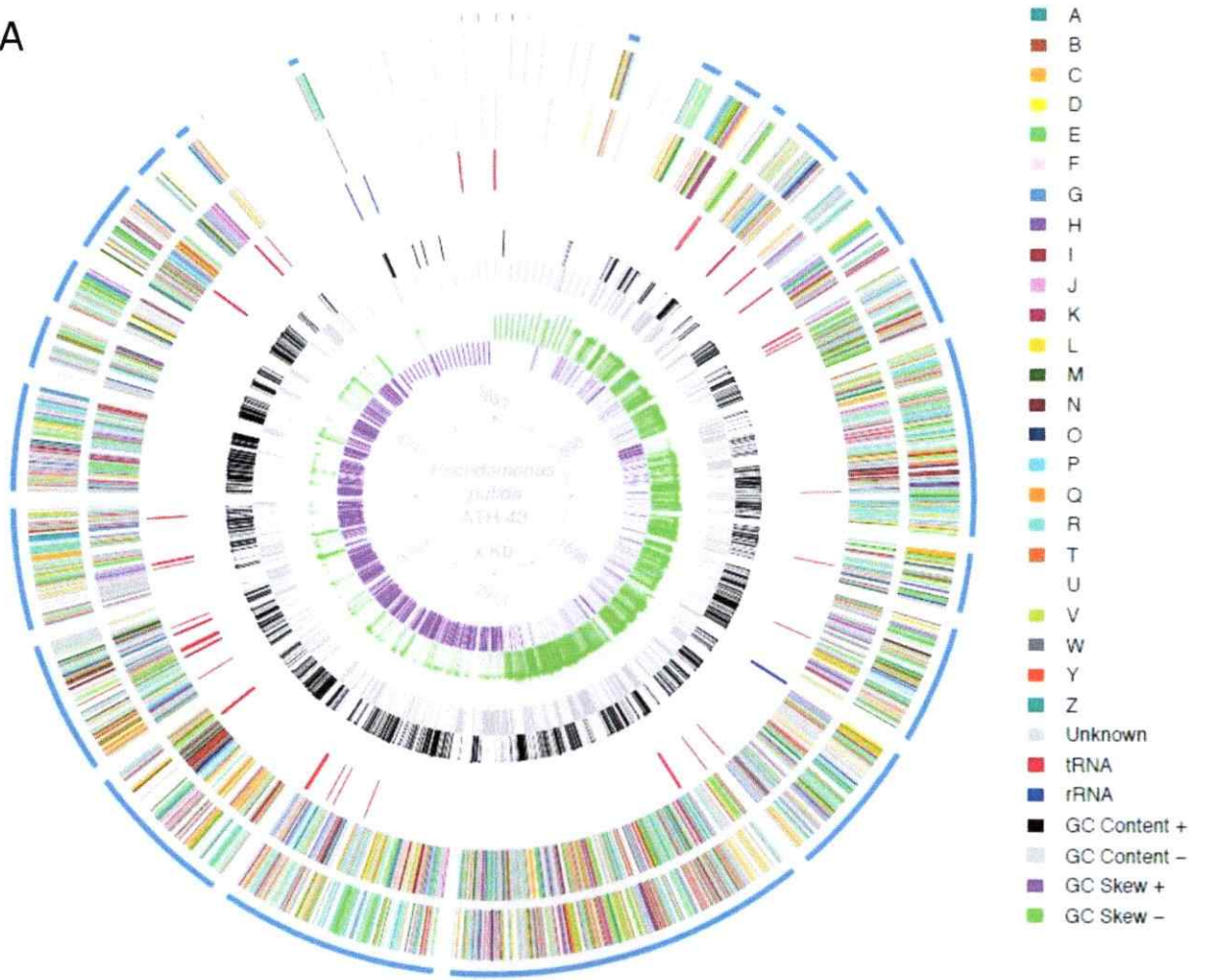
Se eligió secuenciar el genoma de la cepa ATH-43 porque mostró tener el fenotipo más exacerbado con respecto a la potenciación de la resistencia a telurito en presencia de mercurio. El genoma ensamblado consiste en 5.830.220 pb, con un G+C promedio de 61,5% (Figura 11, Tabla 7). Se identificó 79 genes de tRNA y dos *clusters* de rRNA. De un total de 5.124 secuencias codificantes para proteínas, 4.436 ORFs (86,5%) tuvieron un *match* con secuencias disponibles en bases de datos públicas y de éstas, 3.372 (65,8%) fueron asignadas a categorías de *clusters* de grupos ortólogos (COG) (Figura 11B). La predicción de ORFs reveló la presencia inusual de múltiples determinantes genéticos relacionados con tolerancia a metales pesados y metaloides, incluyendo genes y operones de resistencia a Hg<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup>, Pb<sup>+2</sup>, CrO<sub>4</sub><sup>-2</sup>, AsO<sub>4</sub><sup>-3</sup>, SeO<sub>2</sub><sup>-2</sup> y TeO<sub>3</sub><sup>-2</sup> (Tabla 8). También se encontraron genes de resistencia a antibióticos como tetraciclina, macrólidos, penicilinas, aminoglicósidos y estreptomicina, entre otros (Tabla 9). Adicionalmente, la predicción computacional mostró la presencia de siete genes que codifican para proteínas de estrés por frío, 773 proteínas hipotéticas y una importante batería de genes que participan en la respuesta a estrés oxidativo, incluyendo la inusual micotiol sintasa encontrada exclusivamente en bacterias Gram (+). El *whole-genome shotgun Project* fue depositado en GeneBank bajo el número de acceso LBME00000000 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LBME00000000.1>). Un análisis de identidad de nucleótidos promedio (ANI) realizado con 10 genomas de *P. putida* mostró la estrecha relación de ATH-43 con *P. putida* W619 y SQ1 (Figura 12A). Por esta razón, la cepa

ATH-43, se denominará en adelante como *Pseudomonas putida* ATH-43. Finalmente, un análisis del pan-genoma de estas 10 cepas reveló que ATH-43 cuenta con 741 genes accesorios únicos y que 1.370 genes, correspondientes al *core*-genoma, son compartidos por todas las cepas (Figura 12B).

**Tabla 7. Propiedades y características generales del genoma a *P. putida* ATH-43.**

Propiedad	Característica
Calidad de terminación	Draft
NCBI Bioproject ID	PRJNA278654
GeneBank ID	LBME00000000
Librería usada	Mate-pair de 3 kb
Plataforma de secuenciación	Illumina HiSeq 2000
<i>Software</i> de ensamble	A5
Método de anotación	Glimmer v3.02
Cobertura	172X
Tamaño del genoma	5.830.220
Contenido G+C	61,5%
DNA <i>scaffolds</i>	64
Genes totales	5.203
Genes de RNA	6
tRNA	79
Pseudogenes	201
Genes codificantes para proteínas	5.124

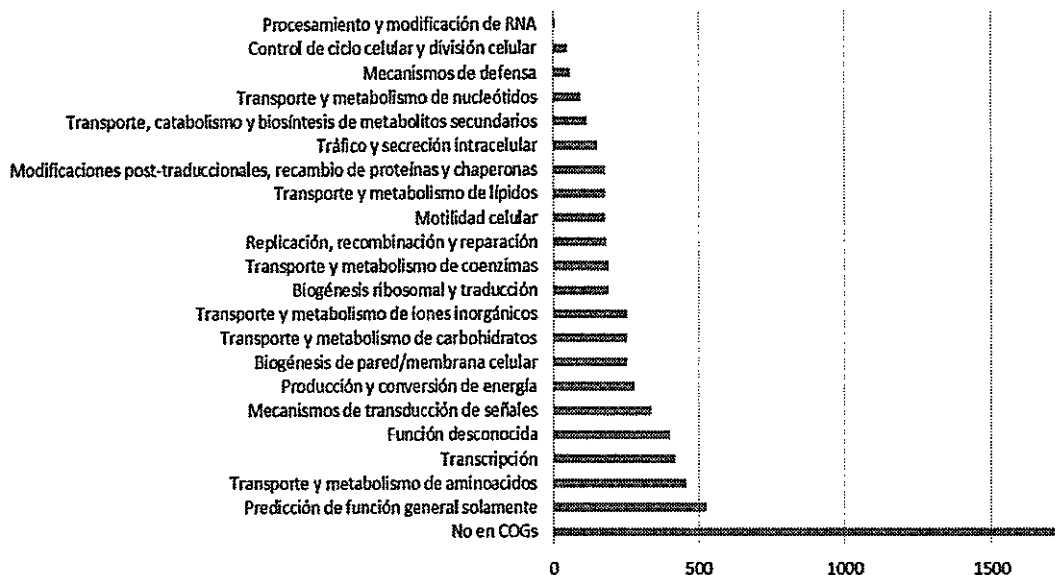
A





B

Genes asignados a categorías COG



**Figura 11. Genoma de *P. putida* ATH-43.** A, Diagrama circular del genoma de ATH-43 con las secuencias codificantes coloreadas según categorías COG. Las marcas desde afuera hacia adentro corresponden a: límites de los *scaffolds* (azul), ORF de la hebra *forward*, ORF de la hebra *reverse*, genes de RNA (tRNA en rojo y rRNA en azul), contenido G+C y valor GC *skew*. A procesamiento y modificación de RNA; B estructura y dinámica de la cromatina; C producción y conversión de energía; D control del ciclo celular y división celular; E transporte y metabolismo de aminoácidos; F transporte y metabolismo de nucleótidos; G transporte y metabolismo de carbohidratos; H transporte y metabolismo de coenzimas; I transporte y metabolismo de lípidos; J biogénesis ribosomal y traducción; K transcripción; L replicación, recombinación y reparación; M biogénesis de pared/membrana celular; N motilidad celular; O modificaciones post-traduccionales, recambio de proteínas y chaperonas; P transporte y metabolismo de iones inorgánicos; Q transporte, catabolismo y biosíntesis de metabolitos secundarios; R predicción de función general solamente; *Unknown* función desconocida; T mecanismo de transducción de señales; U tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular; V mecanismos de defensas; W estructuras extracelulares; Y estructura nuclear; Z citoesqueleto.

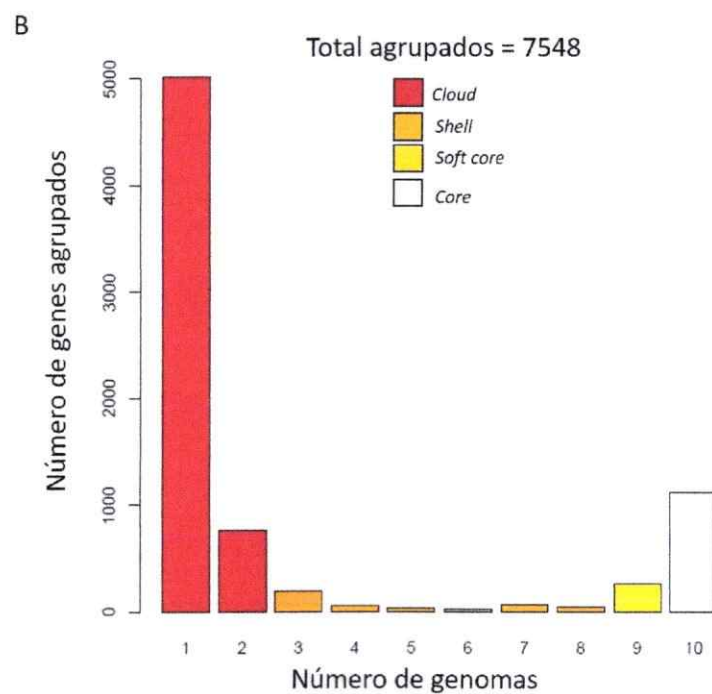
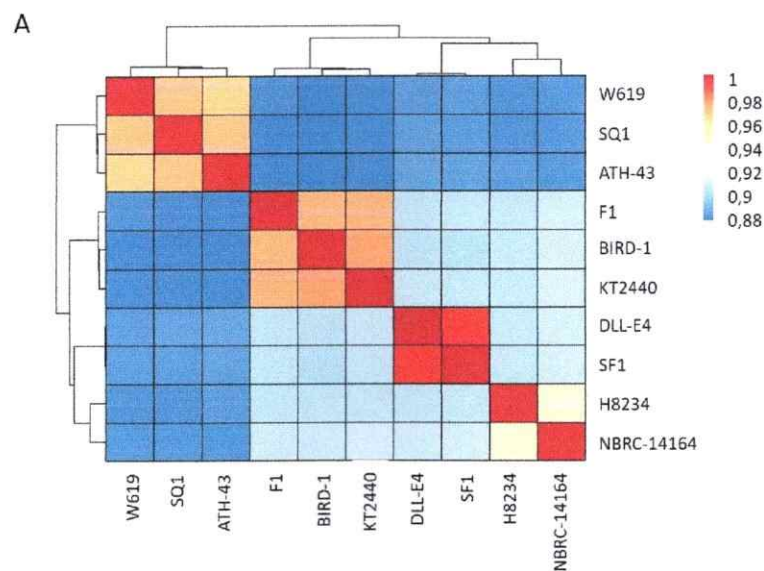
Solo se muestran los *scaffolds* > 200 pb que contuvieron genes de RNA o CDS. B, Genes asignados a las categorías COGs.

**Tabla 8. Determinantes moleculares de resistencia a metales presentes en el genoma de *P. putida* ATH-43.**

Proteína ID	Función predicha	Tamaño (aa)
WP_046787459.1	Arsenato reductasa	117
WP_046784685.1	Proteína de resistencia a arsénico	366
WP_046786777.1	Represor del operón de resistencia a arsénico	118
WP_046786778.1	Proteína de resistencia a arsénico ArsH	238
WP_046787908.1	Bomba de arsénico	427
WP_046785961.1	Oxidoreductasa CzcO-like	439
WP_010794431.1	Regulador transcripcional en respuesta a Cd(II)/Pb(II)	135
WP_003253425.1	Proteína de resistencia cobalto-zinc-cadmio CzcC	394
WP_003253428.1, WP_003139539.1	Bomba de eflujo de metales pesados CzcA	1049-1053
WP_046786982.1	Proteína de eflujo de metales CzcA	1017
WP_046787010.1	Regulador transcripcional de respuesta a Cd(II)/Pb(II)	147
WP_046784398.1	Proteína de resistencia a cobre, CopA	461
WP_012316198.1	Represor sensible a cobre CsoR	105
WP_024616827.1	Proteína B de resistencia a cobre	349
WP_046784684.1	Proteína ChrB	313
WP_046784612.1	Transportador de cromato	449
WP_046785841.1	Proteína de importe de níquel NikE	273
WP_046785842.1	Proteína de importe de níquel NikD	256
WP_046785843.1	Transportador ABC de níquel subunidad NikC	281
WP_046785844.1	Transportador ABC de níquel subunidad NikB	313
WP_046785845.1	Regulador transcripcional de respuesta a níquel NikR	138
WP_012314853.1	Transportador ABC de níquel	483
WP_017849614.1	Represor transcripcional de mercurio MerD	97
WP_031633059.1	Mercurio reductasa MerA	563
WP_003131881.1	Proteína de resistencia a mercurio MerC	144
WP_003131880.1	Proteína de transporte periplasmático de mercurio MerP	92
WP_017849617.1	Proteína transportadora de mercurio MerT	71
WP_003131870.1	Regulador transcripcional de mercurio MerR	146
WP_046786593.1	Tiopurina S-metiltransferasa, Se/Te	215

**Tabla 9. Determinantes moleculares de resistencia a antibióticos presentes en el genoma de *P. putida* ATH-43.**

Proteína ID	Función predicha	Tamaño (aa)
WP_046785721.1, WP_052750419.1	Aminoglicosido fosfotransferasa	395
WP_000480968.1	Aminoglicosido/hidroxiurea quinasa	120
WP_046784847.1	Proteína de unión a penicilina LpoA	605
WP_046785450.1	Beta-lactamasa	379
WP_046784924.1	Metalo-beta-lactamasa	285
WP_046785130.1	Proteína de unión a penicilina 2	629
WP_046787854.1	Proteína de unión a penicilina 1C	766
WP_046788176.1	Proteína de unión a penicilina 1B	748
WP_046786991.1	Amidasa de penicilina	767
WP_001082319.1	Estreptomicina quinasa	267
WP_046784587.1	Proteína de resistencia a fosmidomicina	403
WP_046788159.1	Proteína de resistencia a glioxalasa/bleomicina	137
WP_046784822.1	Exportador de macrólidos MacB	389
WP_046785625.1	Proteína de resistencia a múltiples antibióticos marR	157
WP_046784331.1	Proteína de resistencia Multidrug MdtB	1021
WP_046784686.1	Transportador de resistencia a drogas Bcr/CflA	393
WP_046784877.1	Transportador de eflujo Multidrug	154
WP_046784918.1, WP_046784919.1, WP_046784917.1	Transportador MFS	457-525
WP_046788034.1, WP_046788086.1	Transportador Multidrug DMT	285-293
WP_046786089.1	Proteína de resistencia Multidrug	399
WP_046784313.1, WP_046784333.1, WP_046784346.1, WP_046788222.1, WP_046785657.1, WP_012314115.1	Factor transcripcional TetR	169-245



**Figura 12. Análisis ANI y pan-genoma de *P. putida* ATH-43.** A, *Heatmap* que representa la comparación del promedio de identidad de nucleótidos (ANI) entre 10 genomas de *P. putida*. Los colores representan el grado de identidad de las secuencias genómicas entre cepas, siendo rojo 100% y azul 88% idénticas, respectivamente. B, gráfico de barras del pan-genoma mostrando el número de genes compartidos en *Cloud* (0-20%), *Shell* (20-90%), *Soft core* (90-99%) y *Core*-genoma (100%). En paréntesis se muestra el porcentaje de genomas.

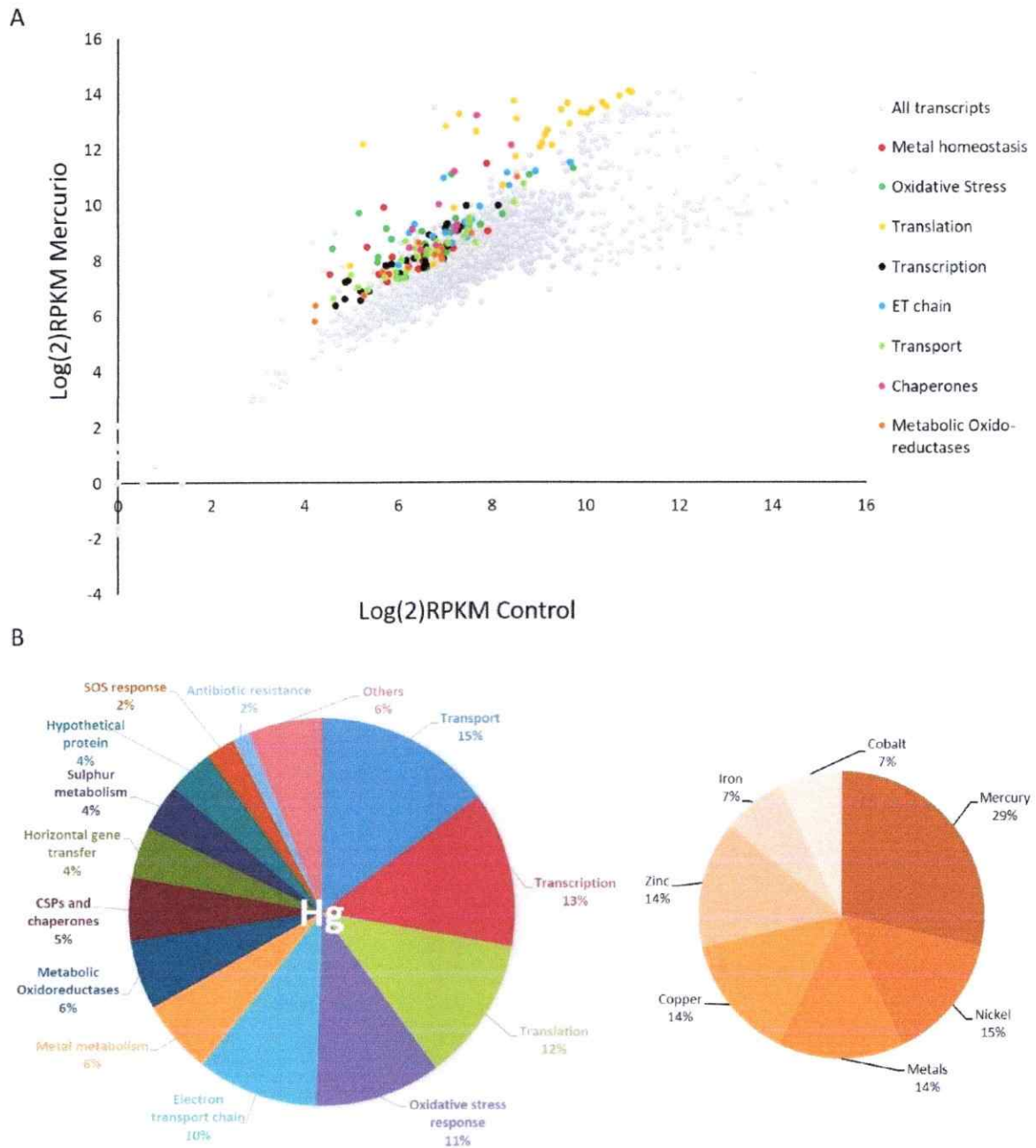
### 3.7 Análisis de RNA-seq de *P. putida* ATH-43 en presencia de mercurio, telurito y mercurio/telurito

Con el propósito de determinar cuáles son los genes que podrían participar en la resistencia cruzada a telurito gatillada por mercurio, se llevó a cabo experimentos de RNA-seq en las mismas cuatro condiciones experimentales descritas. El tiempo de tratamiento con los tóxicos fue de 10 minutos, el cual corresponde al tiempo donde se observó la mayor expresión del operón *mer* por qPCR. En total se obtuvo ~28 millones de lecturas que se sometieron a filtros de calidad. Después de realizar los análisis estadísticos pertinentes, se eligió aquellos genes que fueron expresados significativa y diferencialmente y que mostraron una tasa de cambio (FC)  $\geq 2$ . Los resultados mostraron que en presencia de mercurio 335 genes se expresan diferencialmente (212 sobreexpresados y 123 reprimidos) en relación al control. El transcriptoma global normalizado por RPKM (*Reads per kilobase per million*) (Figura 13A) muestra que los genes sobreexpresados en esta condición están relacionados principalmente con transporte, transcripción, traducción, estrés oxidativo, resistencia a metales y cadena transportadora de electrones, entre otros (Figura 13B). Interesantemente también se observó inducción de genes de respuesta a otros metales como cobalto, fierro, zinc, cobre y níquel (Figura 13B).

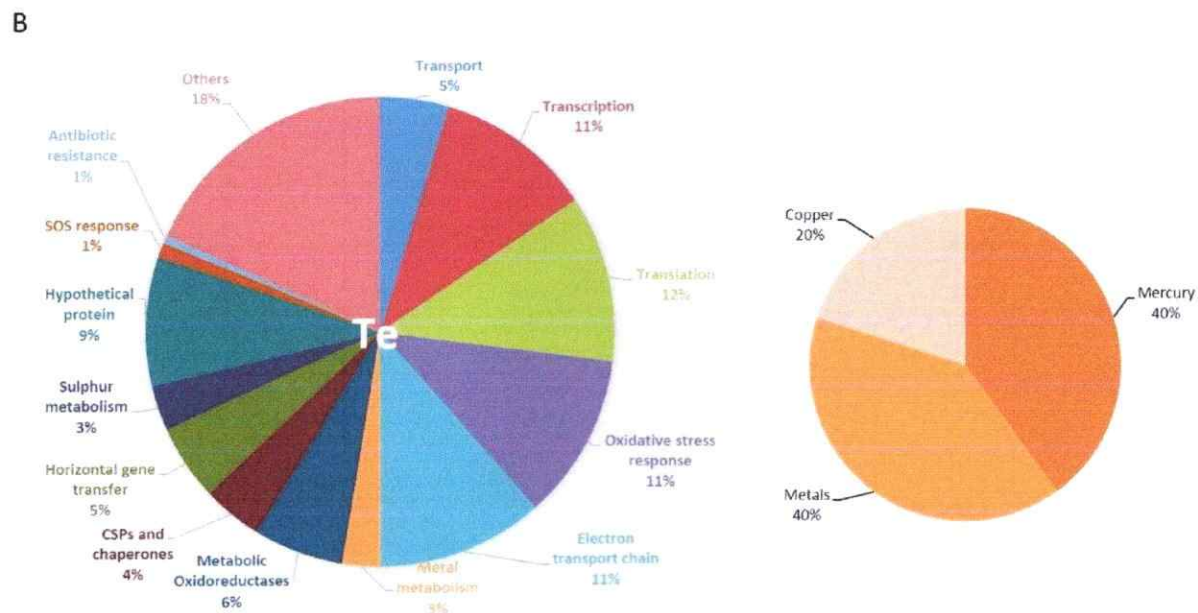
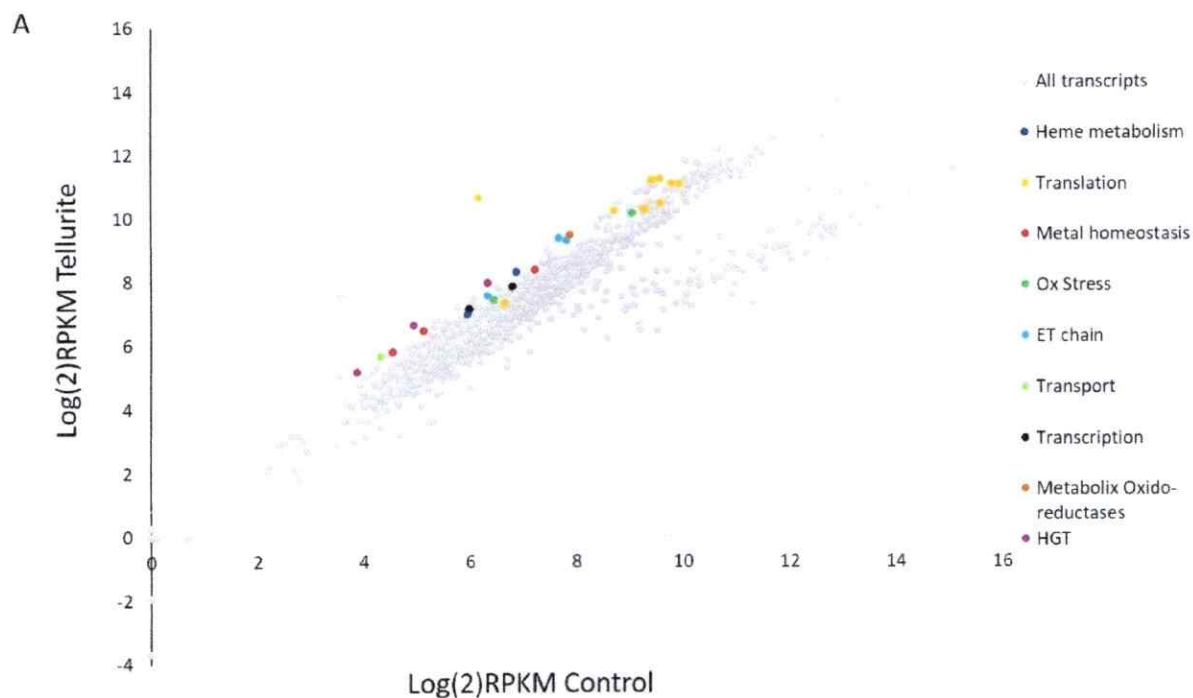
En relación al transcriptoma de ATH-43 expuesta a telurito, los resultados mostraron que en esta condición 153 genes se expresaron diferencialmente (107 sobreexpresados y 46 reprimidos). La distribución de los transcritos es muy similar a la del control y menos dispersa que en el caso de mercurio como se observa en la Figura

**14A.** La mayor cantidad de genes sobreexpresados están relacionados con traducción, transcripción y estrés oxidativo (**Figura 14B**). También se observó la expresión de genes de resistencia a otros metales pesados como cobre, mercurio y metales en general (**Figura 14B**).

Similar al tratamiento con  $Hg^{+2}$ , el transcriptoma del tratamiento con mercurio/telurito mostró que 287 genes se expresaron diferencialmente (227 sobreexpresados y 60 reprimidos). Interesantemente, la dispersión de los transcritos en el gráfico de RPKM fue muy similar al observado en el tratamiento con mercurio (**Figura 15A**). Igualmente se observó sobreexpresión de genes involucrados en transporte, transcripción, traducción, estrés oxidativo, resistencia a metales pesados y metaloides (mercurio, cobre, níquel, hierro, telurito y metales en general) y cadena transportadora de electrones (**Figura 15B**).

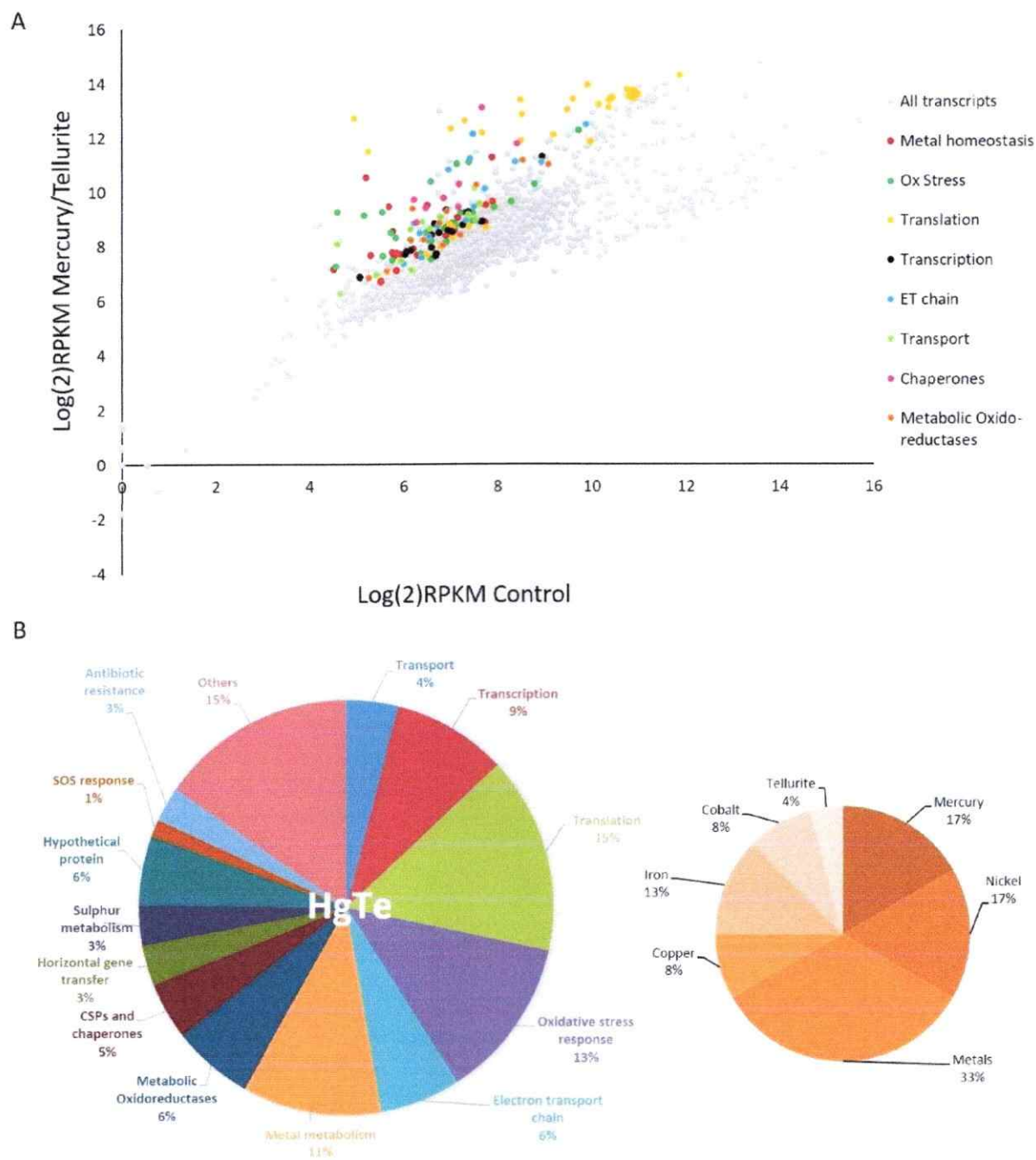


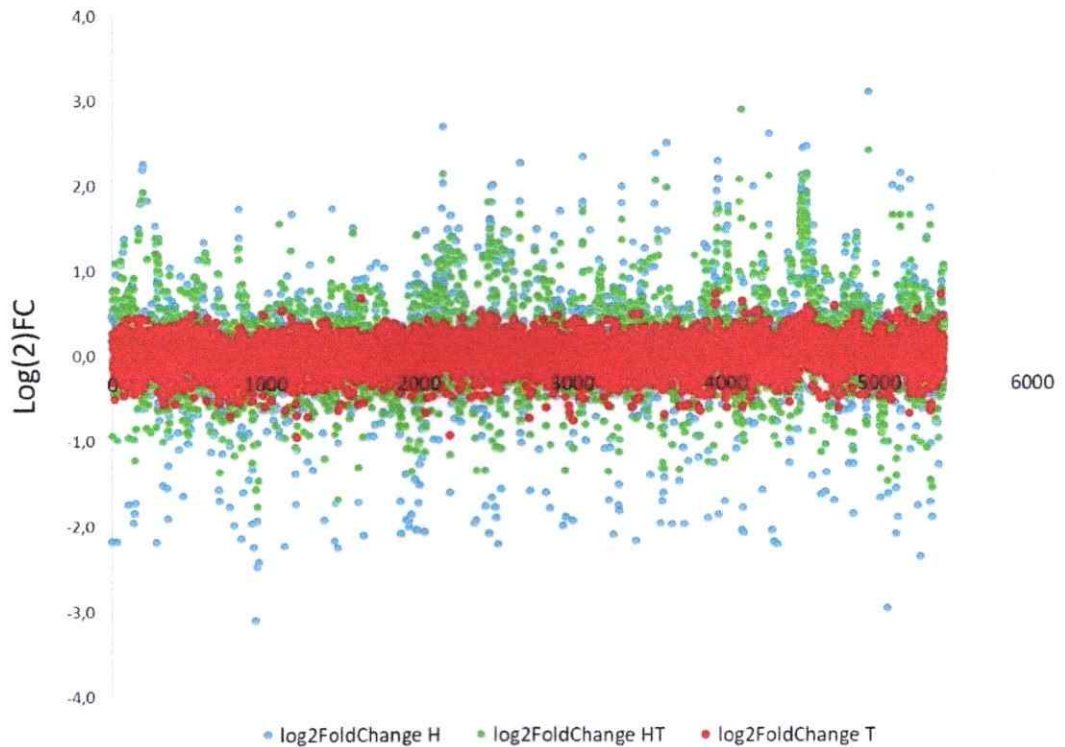
**Figura 13. Transcriptoma de ATH-43 tratada con mercurio.** A, Gráfico que representan los valores de  $\log(2)$  de los RPKM del tratamiento versus el control. Algunos transcritos sobreexpresados fueron coloreados según su función biológica, como se indica. Las líneas grises paralelas limitan el espacio donde el FC fue  $< 2$ . B, Gráfico de torta de los genes sobreexpresados clasificados por función (izquierda) y resistencia a metales (derecha).



**Figura 14. Transcriptoma de ATH-43 tratada con telurito.** A, Gráfico que representan los valores de  $\log(2)$  de los RPKM del tratamiento versus el control. Algunos transcritos sobreexpresados fueron coloreados según su función biológica, como se indica. Las líneas grises paralelas limitan el espacio donde el FC fue  $< 2$ . B, Gráfico de torta de los genes sobreexpresados clasificados por función (izquierda) y resistencia a metales (derecha).



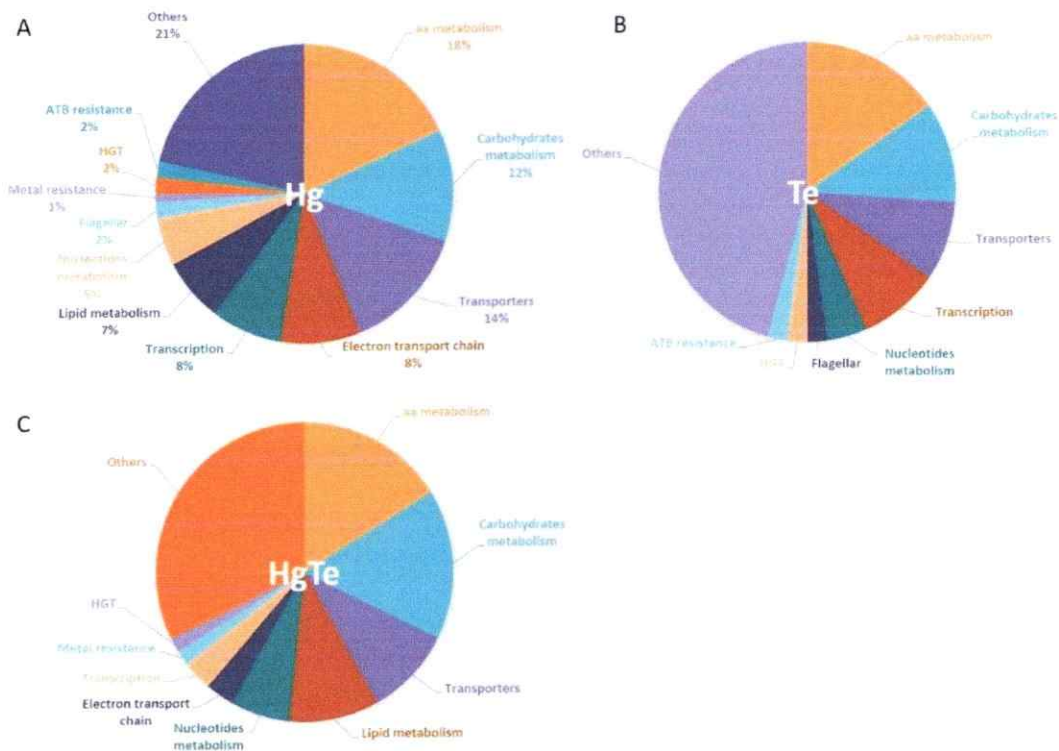




**Figura 16. Transcriptomas de los tres tratamientos en términos de FC en relación al control en ATH-43.** Los transcriptomas del tratamiento con mercurio (azul), telurito (rojo) y mercurio/telurito (verde) están representados como  $\log_2(FC)$ .

Al analizar los FC -en relación al control- de los genes en los 3 transcriptomas, se puede apreciar que el mercurio gatilla una mayor expresión génica diferencial en relación a telurito (**Figura 16**). Estos resultados sugieren que ATH-43 puede responder mejor al estrés causado por mercurio que por telurito.

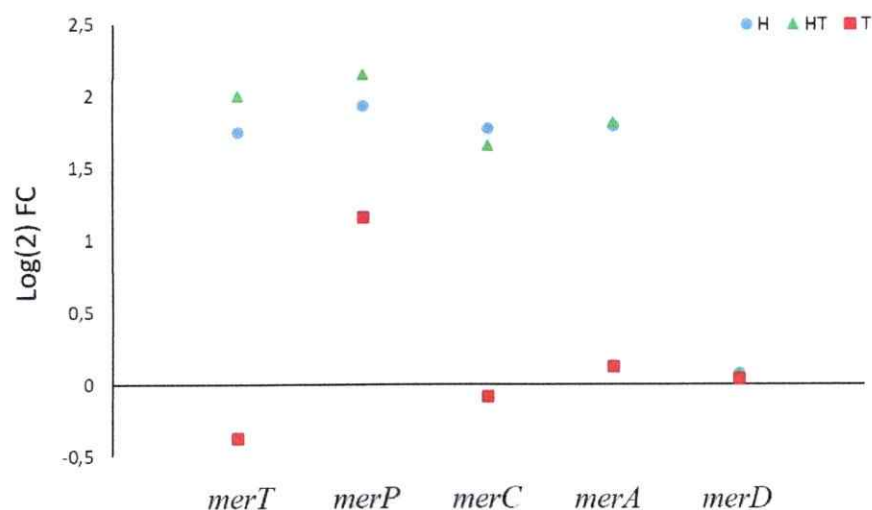
Con respecto a los genes inhibidos en los tres tratamientos, la mayoría está relacionada con metabolismo de aminoácidos, carbohidratos, lípidos y nucleótidos, además de transportadores y proteínas que participan en la cadena transportadora de



**Figura 17. Clasificación de genes inhibidos en los tres transcriptomas de ATH-43.** Los gráficos de torta representan las categorizaciones más representativas de los genes inhibidos en los tratamientos con mercurio (A), telurito (B) y mercurio/telurito (C).

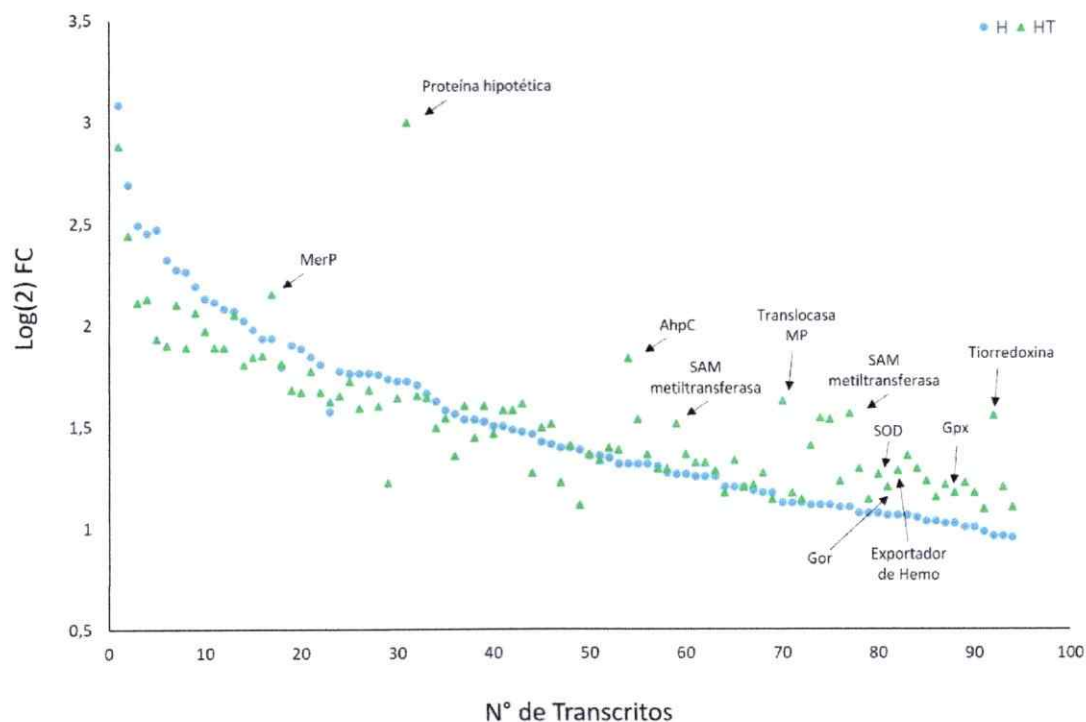
electrones (**Figura 17**). Todo esto sugiere que el metabolismo de la célula se ve severamente afectado en presencia de estos metales.

Para determinar si los genes del operón *mer* están participando en la respuesta de resistencia cruzada a telurito gatillada por mercurio, se analizó el perfil de expresión de cada uno de los genes en los tres tratamientos. La expresión relativa de *merT*, *merP*, *merC* y *merA* fue considerablemente mayor en los tratamientos con mercurio y mercurio/telurito que sólo con telurito (**Figura 18**).



**Figura 18. Expresión relativa de genes del operón *mer* en los 3 transcriptomas de ATH-43.** Expresión relativa de genes del operón *mer* representados como  $\log(2)$  FC con respecto al control. Los tratamientos corresponden a mercurio (círculo azul), telurito (cuadrado rojo) y mercurio/telurito (triángulo verde). La línea gris representa sobreexpresión ( $FC > 2$ ).

Al analizar los genes que se sobreexpresan en los tratamientos con mercurio y mercurio/telurito, se determinó que 95 lo hacen en común (**Figura 19**). Interesantemente, un importante número de ellos se indujo considerablemente más en presencia de mercurio/telurito *vs* solo mercurio incluyendo los que codifican para MerP, una proteína hipotética, translocasa de metales pesados, alquilhidroperóxido reductasa, SAM-metiltransferasa, superóxido dismutasa, glutatión reductasa, glutarredoxina peroxidasa, tiorredoxina, y un exportador de grupo hemo, entre otros. Por otro lado, determinamos que 27 genes se sobreexpresan en común en las tres condiciones (**Tabla 10**). El 75% de estos genes está más sobreexpresado en las condiciones con mercurio y mercurio/telurito e incluyen genes relacionados con traducción, transcripción, estrés oxidativo, resistencia a metales, cadena transportadora de electrones y transgerencia horizontal de genes. Finalmente, los resultados de RNA-seq se validaron para tres genes elegidos (*merA*, *katG*,



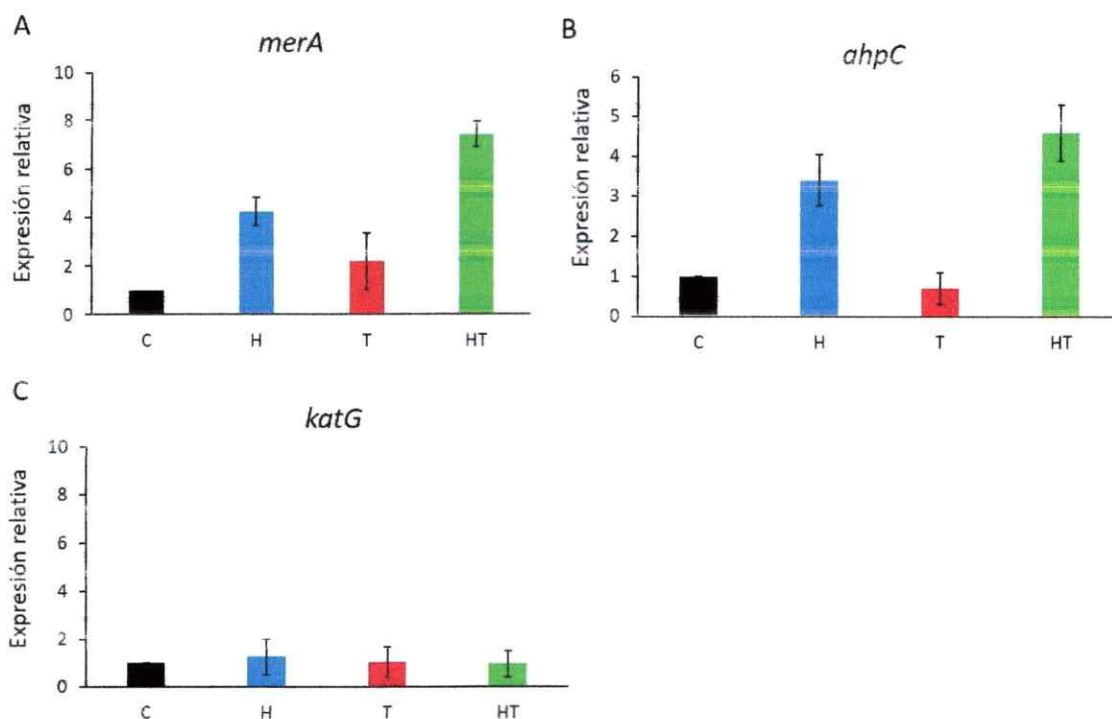
**Figura 19. Expresión relativa de los genes de ATH-43 que se sobreexpresan en común en presencia de mercurio y mercurio/telurito.** La expresión relativa se representa como  $\log_2$  FC con respecto al control. Los tratamientos corresponden a mercurio (círculo azul) y mercurio/telurito (triángulo verde).

*ahpC*) por qPCR. Con excepción de *katG*, los otros 2 genes mostraron inducción con mercurio y mercurio/telurito en relación al control (**Figura 20**).

En su conjunto, estos resultados sugieren que el mercurio puede gatillar una respuesta transcripcional específica que involucra la activación de la transcripción, traducción, respuesta a estrés oxidativo y a estrés por metales pesados, la que a su vez podría ser responsable de la resistencia cruzada a telurito. Las Tablas conteniendo los genes expresados diferencialmente en todas las condiciones experimentales se encuentran adjuntas en el ANEXO.

**Tabla 10. Genes expresados en común en las 3 condiciones experimentales en ATH-43.**

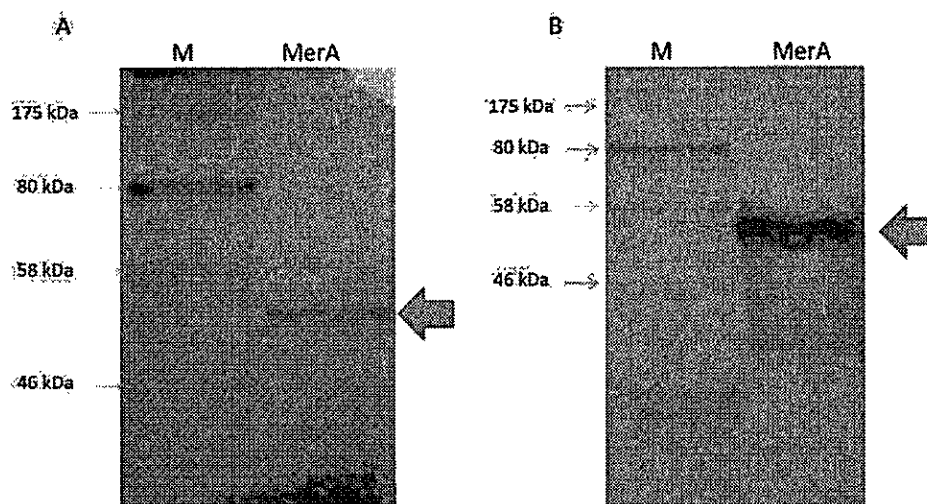
ID Transcrito	Log(2)FC tratamiento con Hg	Log(2)FC tratamiento con Te	Log(2)FC tratamiento con Hg/Te	Predicción de función
transcripts_2942	2,69	1,27	2,44	metal-binding protein
transcripts_5049	2,49	1,59	2,11	30s ribosomal protein s8
transcripts_742	2,26	1,45	1,89	30s ribosomal protein s9
transcripts_5046	2,19	1,35	2,06	30s ribosomal protein s5
transcripts_5047	2,07	1,20	2,05	50s ribosomal protein l18
transcripts_741	2,02	1,25	1,80	50s ribosomal protein l13
transcripts_5050	1,98	1,44	1,84	30s ribosomal protein s14
transcripts_4682	1,93	1,16	2,15	merP
transcripts_4476	1,90	1,31	1,68	cold-shock protein
transcripts_3029	1,75	1,20	1,60	dna mismatch repair protein
transcripts_1622	1,72	1,19	1,64	transcriptional regulator
transcripts_1264	1,70	1,28	1,65	dihydrolipoamide dehydrogenase
transcripts_4705	1,62	1,30	1,49	copper oxidase
transcripts_192	1,50	1,23	1,46	cold-shock protein
transcripts_5382	1,50	1,18	1,58	ferredoxin
transcripts_2583	1,48	1,15	1,26	metallothionein
transcripts_3863	1,47	1,20	1,61	nadh:ubiquinone oxidoreductase
transcripts_369	1,46	1,21	1,27	glutathione peroxidase
transcripts_4492	1,42	1,18	1,49	alkyl hydroperoxide reductase
transcripts_2458	1,30	2,24	1,29	transposase
transcripts_4111	1,27	1,18	1,29	cysteine synthase
transcripts_1394	1,26	1,25	1,36	cytochrome c biogenesis protein
transcripts_4688	1,20	1,22	1,33	transposase
transcripts_3848	1,11	1,16	1,54	sulfite reductase
transcripts_1999	1,11	1,77	1,53	transcriptional regulator
transcripts_1393	1,06	1,16	1,28	Heme exporter protein
transcripts_3765	1,05	1,24	1,29	cold shock protein



**Figura 20. Validación del RNA-seq por qPCR.** Se llevó a cabo qPCR de los genes *merA* (A), *ahpC* (B) y *katG* (C) a partir de muestras de RNA de cultivos tratados con mercurio (azul), telurito (rojo) y mercurio/telurito (verde). La expresión relativa se representa como el FC con respecto al control (negro). Los datos representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos diferentes.

### 3.8 Actividad telurito reductasa de la enzima MerA del plásmido pTP6

La resistencia bacteriana a mercurio involucra la expresión de los genes *mer* y consiste en la reducción de mercurio (II) a mercurio (0) catalizada por la flavoproteína MerA. Recientemente, nuestro laboratorio demostró que ciertas enzimas de la familia de las pirimidin dinucleótido oxidoreductasas dependientes de NADPH pueden reducir telurito a teluro elemental (Arenas-Salinas *et al.* 2016). Dado que MerA pertenece a esta familia, se hipotetizó que esta enzima podría contribuir a la resistencia de ATH-43 a telurito reduciendo el tóxico. Como primera aproximación se clonó el gen *merA* del plásmido ambiental pTP6 (Smalla *et al.* 2006) y se transformó *E. coli*. La Figura 21

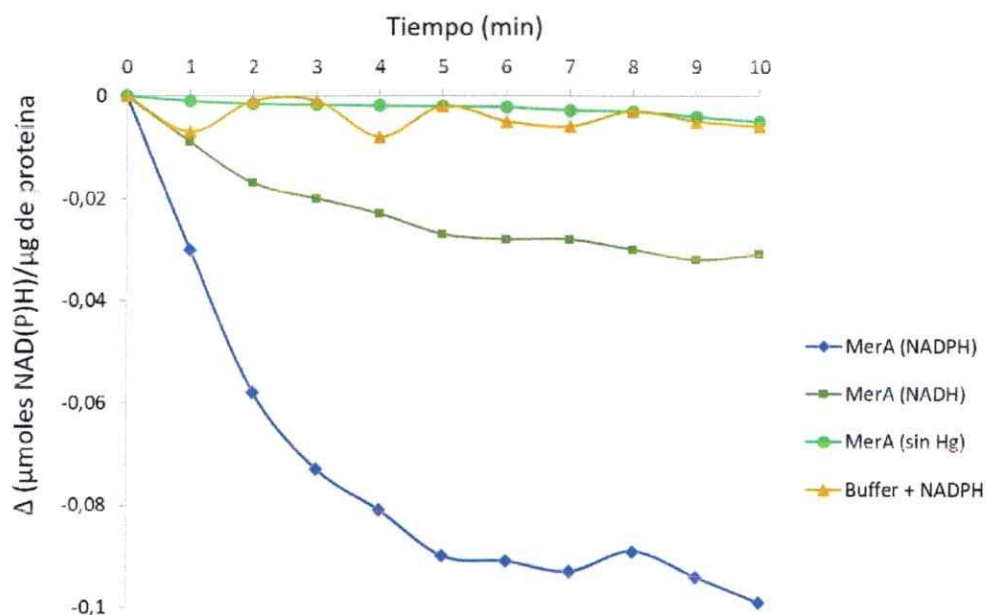


**Figura 21. Purificación de MerA del plásmido pTP6.** A, Gel SDS-PAGE. La proteína purificada por columnas de níquel (ver Métodos) se indica con la flecha azul. B, *Western blot* de MerA purificada revelado con anticuerpos anti-Histag.

muestra la proteína purificada en un gel SDS-PAGE y un *Western blot* de la misma revelado con un anticuerpo comercial anti-Histag. La enzima corresponde a un dímero de ~57 kDa por subunidad (flechas).

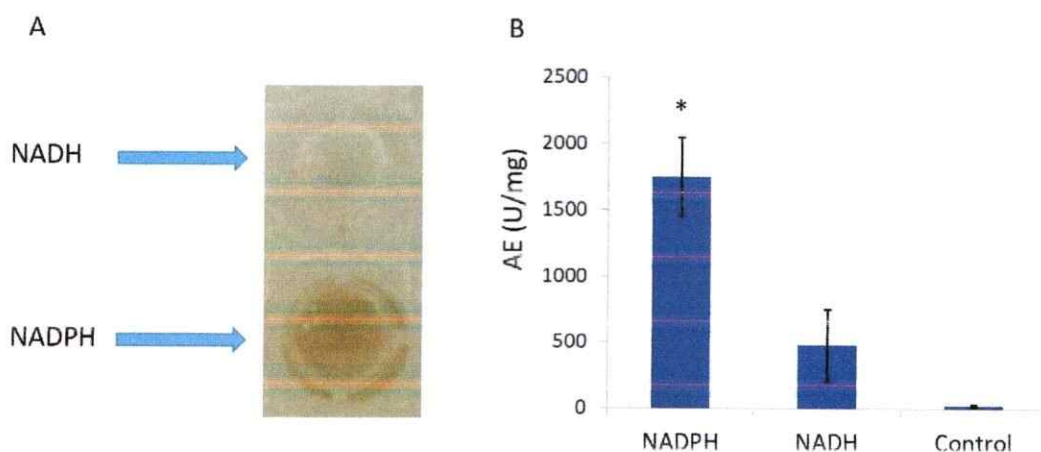
Para comprobar la actividad canónica de MerA, se ensayó su habilidad para reducir mercurio *in vitro*. Los resultados mostraron que la enzima reduce efectivamente el catión mercúrico, lo que fue monitoreado midiendo espectrofotométricamente el consumo de NADPH. Como se esperaba, se observó que MerA usa preferentemente éste en lugar de NADH como sustrato dador de electrones (**Figura 22**).





**Figura 22. Actividad reductasa mercúrica de MerA del plásmido pTP6 in vitro.** La actividad se ensayó en presencia de NADPH (rombo azul) o NADH (cuadrado verde). Los controles no contuvieron enzima (triángulo naranja) o  $Hg^{+2}$  (círculo verde). La reacción se monitoreó midiendo el consumo de NADPH a 340 nm. La imagen es representativa de 3 experimentos independientes.

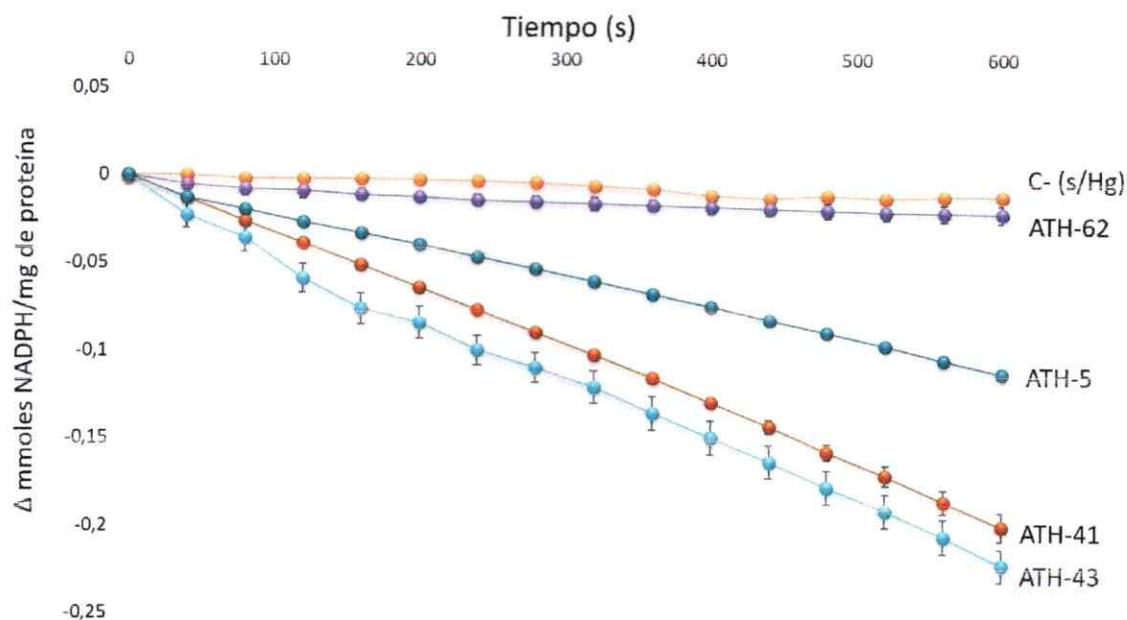
La potencial actividad telurito reductasa de MerA se observó inicialmente por el ennegrecimiento de la mezcla de reacción sugiriendo la producción de telurito elemental (Tucker *et al.* 1962) (**Figura 23A**). Al igual que en el caso de la actividad reductora de mercurio, la enzima también utiliza de preferencia el cofactor NADPH para reducir telurito (**Figura 23B**).



**Figura 23. Actividad telurito reductasa de MerA del plásmido pTP6 in vitro.** A, Ensayo cualitativo de actividad enzimática. B, Actividad telurito reductasa específica de MerA. Los datos representan la media  $\pm$  DE de tres ensayos independientes,  $p < 0,05$ .

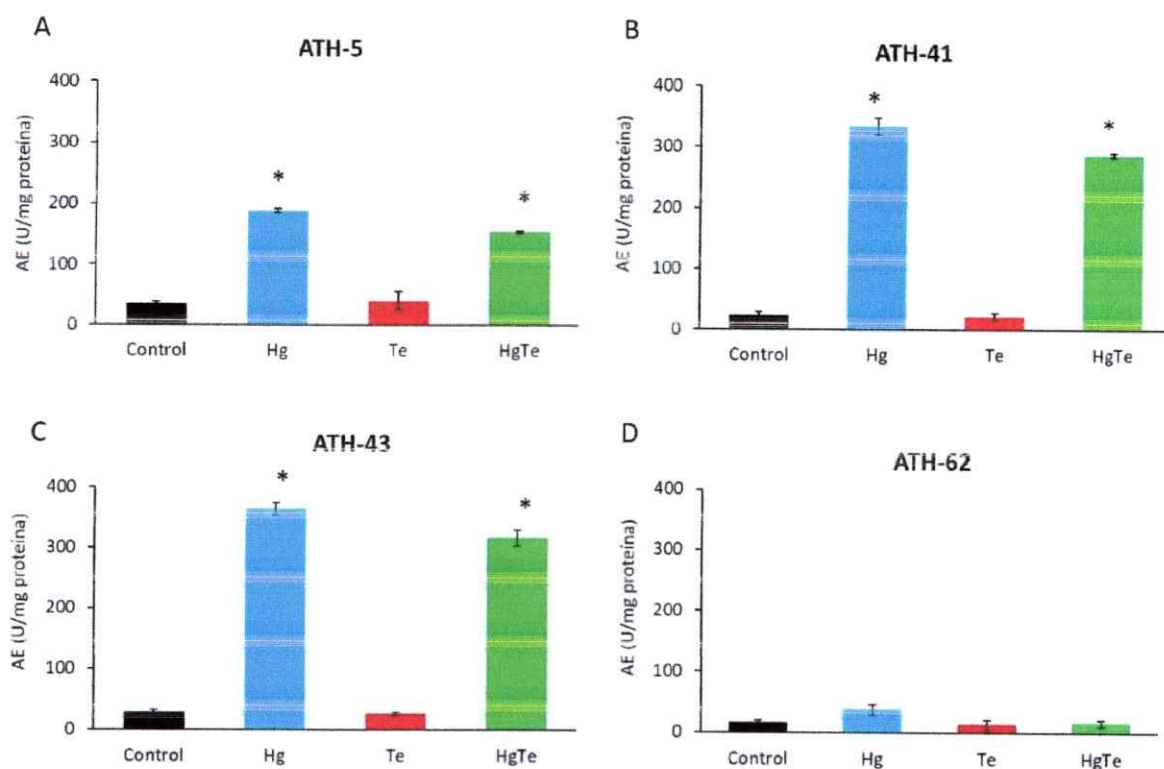
### 3.9 Actividad mercurio y telurito reductasa en extractos crudos de cepas ATH

Se determinó ambas actividades utilizando MerA purificadas de las cepas ATH en estudio. Sin embargo y a pesar de utilizar varias estrategias experimentales diferentes, no fue posible obtener las enzimas puras. Por ello, se los ensayos enzimáticos se llevaron a cabo utilizando extractos crudos de cepas ATH que fuesen expuestas previamente a los mismos tratamientos experimentales utilizados durante este trabajo. ATH-41 y ATH-43 mostraron mayor actividad mercurio reductasa que las otras dos (**Figura 24**). Este resultado es consistente con la ausencia de MerA en ATH-62 (**Tabla 3**), sugiriendo *a priori* que la resistencia a mercurio exhibida por esta bacteria sería independiente del operón *mer*.

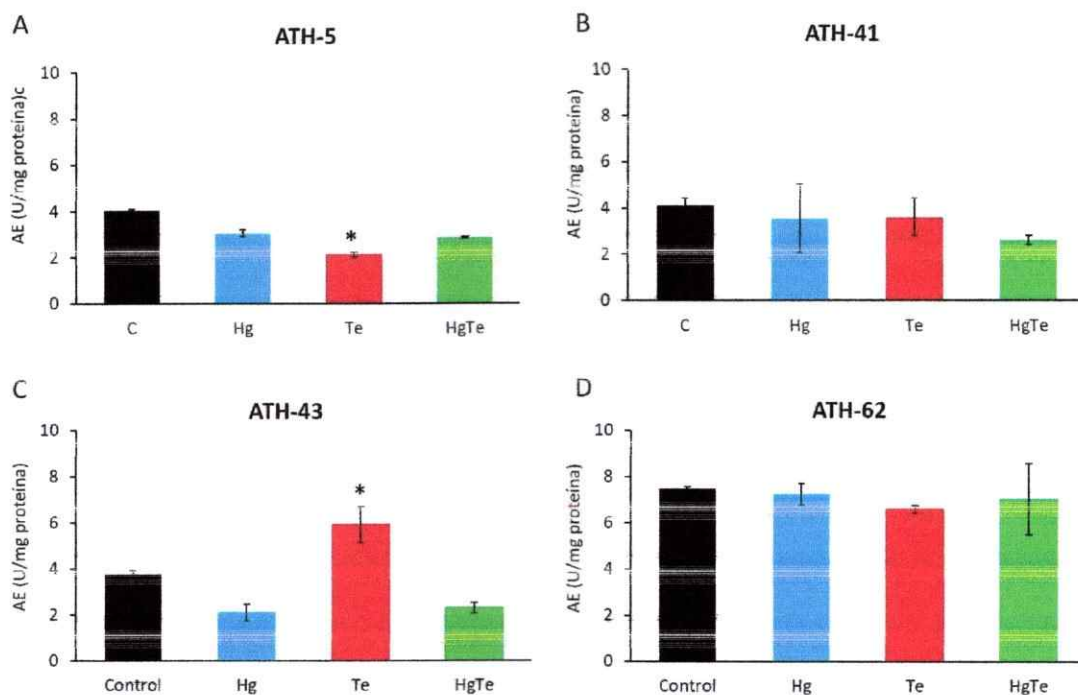


**Figura 24. Actividad mercurio reductasa en extractos crudos de cepas ATH.** Los extractos crudos de las cuatro cepas fueron obtenidos a partir de cultivos tratados previamente con mercurio (1/4 MIC) por 1 h a temperatura ambiente. La actividad mercurio reductasa fue seguida espectrofotométricamente por el consumo de NADPH a 340 nm. Los datos representan la media  $\pm$  DE de tres ensayos independientes,  $p < 0,05$ .

Posteriormente, se analizó si la presencia de los tóxicos estimulaba la actividad mercurio reductasa en extractos crudos de las cepas en estudio. Se observó que la actividad específica mercurio reductasa estaba aumentada en ATH-5, ATH-41 y ATH-43 previamente expuestas a mercurio o mercurito/telurito (**Figura 25A-B-C**). Al igual que en el experimento anterior, ATH-41 y ATH-43 mostraron la actividad específica más alta cepas (**Figura 25B-C**), a diferencia de ATH-62, que nuevamente mostró tener muy baja actividad, similar a la del control (**Figura 25D**).



**Figura 25. Cuantificación de la actividad mercurio reductasa en extractos crudos de las cepas ATH.** Extractos crudos de ATH-5 (A), ATH-41 (B), ATH-43 (C) y ATH-62 (D) previamente expuestas a mercurio (azul), telurito (rojo) y mercurio/telurito (verde) fueron ensayados para actividad reductasa mercúrica. El control sin tóxicos se muestra en negro. Los datos representan la media  $\pm$  DE de tres ensayos independientes,  $p < 0,05$ .



**Figura 26. Cuantificación de la actividad telurito reductasa en extractos crudos de las cepas ATH.** Extractos crudos de ATH-5 (A), ATH-41 (B), ATH-43 (C) y ATH-62 (D) previamente expuestas a mercurio (azul), telurito (rojo) y mercurio/telurito (verde) fueron ensayados para actividad telurito reductasa. El control sin tóxicos se muestra en negro. La actividad fue seguida espectrofotométricamente por la aparición de telurio elemental a 500 nm. Los datos representan la media  $\pm$  DE de tres ensayos independientes,  $p < 0,05$ .

Finalmente, se cuantificó actividad telurito reductasa en los mismos extractos crudos anteriores (**Figura 26**). Al contrario de lo esperado, los resultados mostraron que en todas las cepas la actividad telurito reductasa no se incrementa en extractos de células previamente expuestas a mercurio o mercurio/telurito. La única excepción fue ATH-43 expuesta a telurito, que mostró una actividad telurito reductasa levemente superior al control (**Figura 26C**). En conjunto, estos resultados sugieren que la resistencia cruzada a telurito gatillada por mercurio no dependería de la reducción de telurito catalizada por MerA.

#### 4. Discusión

Este trabajo muestra que los mecanismos de resistencia a mercurio de un grupo de bacterias psicrotolerantes aisladas de la Antártica están involucrados en la resistencia a telurito. En este contexto, cuatro aislados (ATH-5, ATH-41, ATH-43 y ATH-62) fueron caracterizados como bacterias resistentes simultáneamente a mercurio y a telurito (Tabla 3). Los aislados ATH-5, ATH-41 y ATH-43 pertenecen al género *Pseudomonas*, mientras que ATH-62 forma parte del género *Psychrobacter*. Los árboles filogenéticos mostraron que ATH-5 y ATH-41 están asociados con la bacteria psicrótrofa *Pseudomonas mandelii* CIP105273<sup>T</sup> que fue aislada de aguas minerales (Verhille *et al.* 1999), y al aislado ártico *Pseudomonas* sp. K10 (número de acceso JF313066) (Figura 3A). Por otro lado, la filogenia de ATH-43 está filogenéticamente relacionada con especies de *P. putida* aisladas de distintos ecosistemas incluyendo agua y sedimentos de tierra contaminados (Subramanian *et al.* 1985) (Figura 3B). En cambio, se encontró que ATH-62 estaba emparentada con especies de *Psychrobacter* aisladas exclusivamente de ambientes fríos como permafrost (Vishnivetskaya *et al.* 2006), hielo marino (Romanenko *et al.* 2004) y agua antártica (Heuchert *et al.* 2004), entre otras (Figura 3C).

Los genes *mer* solo fue detectado en las cepas de *Pseudomonas*. Las relaciones filogenéticas de los genes *merA* de ATH-5, ATH-41 y ATH-43 mostraron que estaban relacionados con genes *merA* de elementos transponibles ubicuos en la naturaleza (Osborn *et al.* 1997). Aun cuando *merA* de ATH-5 y ATH-41 se relaciona con el mismo gen presente en el transposón Tn5044 de *X. campestris*, *merA* de ATH-41 formó una rama

distinta dentro del árbol filogenético. Esto podría representar un nuevo tipo de *merA* lo que también se refleja en la baja identidad de secuencia con otros genes *merA* (Figura 4). A diferencia del operón *mer* de ATH-41, el de ATH-5 contiene el gen accesorio *merC*, indicando que aunque son especies estrechamente relacionadas, no comparten la misma estructura genética de este operón (no mostrado). Por otro lado, el gen *merA* de ATH-43 se relacionó filogenéticamente con genes *merA* de otras cepas de *P. putida* contenidos en el transposón Tn5041, incluyendo la cepa multi-resistente a metales *P. putida* SP1 (Zhang *et al.* 2012). Los transposones Tn5044 y Tn5041 que confieren resistencia a mercurio, son considerados como vehículos de diseminación de la misma en poblaciones bacterianas (Kholodii *et al.* 1997, 2000b, 2002). Interesantemente, el operón *mer* de Tn5044 es expresado exclusivamente a temperaturas bajo 30 °C (Kholodii *et al.* 2000a, 2002). Con respecto a ATH-62, no fue posible detectar la presencia de este operón, sugiriendo que esta bacteria posee otros mecanismos moleculares para sobrellevar la toxicidad del mercurio. En este sentido, además del operón *mer*, se ha descrito otros mecanismos de detoxificación de mercurio tales como la reducción del ingreso y la biosorción de este ión por proteínas ubicadas en la superficie celular (Osborn *et al.* 1997; Kinoshita *et al.* 2013).

Adicionalmente, la resistencia a mercurio mediada por el operón *mer* ha sido asociada con la presencia de determinantes de resistencia a antibióticos, ya que estos genes también se encuentran comúnmente en elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones (Cervantes-Vega *et al.* 1986; Seiler y Berendok, 2012; Henriques *et al.* 2016). En esta línea y apoyando la teoría de la co-selección entre metales pesados y

antibióticos, una posibilidad es que la ausencia de resistencia a antibióticos observada en ATH-62 se correlacione con la ausencia del operón *mer*, mientras que con las cepas de *Pseudomonas* ocurre la situación inversa (Knapp *et al.* 2011) (Tabla 4).

A través de varias aproximaciones experimentales como curvas de crecimiento, MICs, y la determinación de áreas de inhibición del crecimiento, se observó que cuando ATH-5, ATH-41 y ATH-43 eran crecidas en presencia de mercurio, la resistencia a telurito aumentaba (Figura 5 y 4, Tabla 6). Mientras que ATH-5 y ATH-41 mostraron un fenotipo de resistencia cruzada débil, ATH-43 exhibió una fuerte potenciación de la resistencia a telurito en presencia de mercurio. Por el contrario, ATH-62 resultó tener una respuesta totalmente opuesta. De hecho, la presencia de mercurio no favoreció el fenotipo de resistencia cruzada, sugiriendo que éste podría -al menos en parte- ser explicado por la presencia de los genes *mer*. A la fecha, los mecanismos de resistencia a telurito han estado limitados a algunos estudios que establecen la participación de respuesta generalizada contra estrés oxidativo (Turner *et al.* 1999; Turner *et al.* 2001; Pérez *et al.* 2007; Tremaroli *et al.* 2007), metabolismo de cisteína (Vásquez *et al.* 2001; Saavedra *et al.* 2004; Fuentes *et al.* 2007), volatilización de compuestos alquilados de telurio (Chasteen y Bentley, 2003), así como reducción no enzimática (Turner *et al.* 1999; Turner *et al.* 2001) o enzimática. Algunas de las enzimas que exhiben actividad telurito reductasa pertenecen a la familia de las flavoproteínas, incluyendo glutatión reductasa (Pugin *et al.* 2014), tioredoxina reductasa (Rigobello *et al.* 2011), dihidrolipoil deshidrogenasa (Castro *et al.* 2008) y alquilhidroperóxido reductasa (Arenas-Salinas *et al.* 2016), entre otras. Con la finalidad de estudiar la respuesta molecular asociada con el fenómeno de potenciación



observado, se evaluó el contenido de las especies reactivas de oxígeno en las cepas ATH sometidas a distintos tratamientos. Se encontró que ambos, telurito y mercurio, gatillaban la producción de ROS en todas las cepas de *Pseudomonas*, pero no en ATH-62 (Figura 7).

Está bien documentado que el telurito induce la producción de superóxido durante su reducción a telurio elemental en diversas especies bacterianas (Pérez *et al.* 2007; Tremaroli *et al.* 2007; Arenas *et al.* 2014). En base a ello y dado que ATH-62 mostró la MIC de telurito más alta, se podría especular que esta cepa podría contener determinantes genéticos de resistencia a telurito específicos. A su vez, éstos podrían estar involucrados en el control de la producción y la detoxificación de ROS en las células expuestas al tóxico. Por otro lado, en las condiciones ensayadas los niveles de ROS disminuyeron a niveles del control sólo en ATH-43, sugiriendo que ésta podría exhibir potentes mecanismos moleculares para sobrellevar el estrés oxidativo. Se ha observado por análisis proteómicos que en bacterias sensibles a mercurio como *E. coli* y *Corynebacterium glutamicum* aumenta la respuesta a estrés oxidativo general. Esto incluye un aumento de proteínas como SodA (superóxido dismutasa A), SodB, CysK (cisteína sintasa), ZntA (transportador de zinc), TrxR (tiorredoxina reductasa), Gor (glutación reductasa), y algunas HSP (*heat shock protein*) relacionadas con el restablecimiento de puentes disulfuro (Onnis-Hayden *et al.* 2009; Gao *et al.* 2013). De esta forma, ATH-43 podría contener determinantes moleculares especializados involucrados en la respuesta a estrés oxidativo que se activan como consecuencia de la exposición a mercurio. Estos mecanismos podrían ser complementarios al sistema de detoxificación codificado por el

operón *mer*, y como consecuencia, también útiles para la destoxificación de telurito.

Con respecto al contenido de tioles celulares, ambos mercurio y telurito, disminuyeron los niveles de tioles en todas las cepas ATH (**Figura 8**). De todos los metales pesados en la naturaleza, el mercurio exhibe la afinidad más alta por grupos sulfhidrilo y por este motivo, su toxicidad se debe a efectos oligodinámicos que causan inactivación enzimática, depleción de tioles y estrés oxidativo (Barkay *et al.* 2003). Por otro lado, está demostrado que el telurito es un fuerte oxidante que también genera un rápido descenso de los niveles de tioles, especialmente glutatión en bacterias Gram(-) (Turner *et al.* 1995; Turner *et al.* 1999; Turner *et al.* 2001; Vrionis *et al.* 2015). Interesantemente y durante la exposición a mercurio/telurito, los niveles de tioles fueron similares a los del control sólo en ATH-43 (**Figura 8C**). Este efecto sinérgico podría ser consecuencia de una activación inducida por telurito de mecanismos -aun desconocidos- que participen en la recuperación de tioles. Este fenómeno no fue observado cuando ATH-43 se expuso a otros metales que depletan tioles como cadmio, cobre y cromo (no mostrado). Al contrario de ATH-43, el mercurio no causó una rápida depleción de tioles en ATH-62 (**Figura 8D**), sugiriendo que el fenotipo de resistencia a mercurio de esta cepa podría estar relacionado a la biosorción en la superficie celular o reducción de la entrada de mercurio, como ocurre en la bacteria *Weisella viridescens* (Kinoshita *et al.* 2013). Los ensayos de viabilidad celular mostraron que el tratamiento con telurito es considerablemente tóxico después de media hora de exposición (**Figura 9**), siendo el efecto más severo en las cepas de *Pseudomonas*. Sin embargo, y consecuente con los resultados anteriores, la presencia de ambos tóxicos resultó en un aumento importante

(100%) en la viabilidad celular de ATH-43 en relación a los otros tratamientos, mostrando un efecto sinérgico. Este efecto también podría explicarse por una estimulación de la proliferación celular inducida por estos agentes y al aumento de la síntesis de proteínas ribosomales las cuales podría influir en un aumento de la tasa de crecimiento metabólico (Jensen y Pedersen, 1990). La viabilidad celular de ATH-5 y ATH-41 fue mayor cuando ambos tóxicos estuvieron presentes en relación a aquella observada en presencia de telurito. A la fecha no existen estudios que muestren que tratamientos conjuntos con dos metales pesados, ni metaloides cause un aumento en la viabilidad celular en bacterias.

El contenido de NADPH disminuyó en los tratamientos con metales en las cepas de *Pseudomonas*, indicando que en estas bacterias la metabolización de mercurio y de telurito podría ser dependiente de este cofactor (**Figura 10**). Se ha demostrado que la reducción de ambos metales se lleva a cabo por enzimas que dependen de NADPH (Sandstrom y Lindskog, 1987; Argyrou y Blanchard, 2004; Arenas-Salinas *et al.* 2106). Sin embargo, en la cepa de *Psychrobacter* ocurre un efecto opuesto, donde se genera acumulación de NADPH en células tratadas con telurito, lo que podría favorecer su reducción. En este contexto, se ha observado que en *E. coli* expuesta a concentraciones subletales de telurito ocurre una activación de la ruta de las pentosa fosfato y en consecuencia un incremento de la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, lo que resulta en una acumulación de NADPH (Sandoval *et al.* 2011).

Como un intento por explicar el fenómeno de resistencia cruzada observado en ATH-43, se secuenció el genoma para identificar los posibles determinantes genéticos responsables de este fenotipo. En general, el tamaño del genoma, el % de G+C y la

marcada transición del GC skew es similar al de otros genomas de *P. putida* (Wu *et al.* 2010). Interesantemente, contiene una cantidad inusualmente mayor de genes que codifican para tRNA, lo que se ha propuesto como un mecanismo de adaptación al frío en otros microorganismos (Dutta y Chaudhuri, 2010). En comparación con otras Gamaproteobacterias, se encontró un mayor número de genes en las categorías de mecanismos de transducción de señales y metabolismo y transporte de iones inorgánicos, lo que es concordante con otros genomas de *P. putida* (Wu *et al.* 2010). Esto podría indicar la presencia de mecanismos específicos sofisticados de control de la expresión génica en ambientes altamente variables. Adicionalmente, se encontró 13 elementos IS, 21 transposasas y 17 integrasas (no mostrado). Estas características están frecuentemente asociadas con la adquisición horizontal de genes que otorgan funciones accesorias como resistencia a metales pesados y degradación de compuestos aromáticos, entre otras. La gran cantidad de genes relacionados con resistencia a metales, estrés oxidativo y antibióticos encontrados en ATH-43 (Tablas 8 y 9) podría ser un reflejo de esta situación. Esto no es usual en genomas de *P. putida* y otras gamaproteobacterias, lo que podría reflejar la ocurrencia de una alta presión selectiva en el territorio antártico. Por otro lado, un análisis de ANI y de comparación de pangenoma mostró que ATH-43 está estrechamente relacionada con *P. putida* W619 y *P. putida* SQ1. Mientras la bacteria endofítica W619 que presenta numerosos genes de resistencia a metales pesados se aisló de rizósfera de álamo (Taghavi *et al.* 2009; Wu *et al.* 2010), SQ1 fue aislada de sedimento litoral de un lago pre-alpino y puede degradar el azúcar vegetal sulfoquivonosa (Felux *et al.* 2015). El genoma de ATH-43 representa el primer genoma secuenciado de una *P.*

*putida* antártica.

Los resultados de RNA-seq de ATH-43 en las 4 condiciones experimentales mostraron que la exposición a mercurio y mercurio/telurito induce fuertemente la transcripción de genes de transporte, traducción, transcripción, estrés oxidativo, estrés por metales, oxidoreductasas metabólicas, cadena transportadora de electrones, chaperonas y metabolismo de azufre (Figuras 13 y 15). De igual manera, todas estas funciones biológicas estuvieron representadas en el transcriptoma de cultivos expuestos a telurito (Figura 14). Este resultado apoya experimentos de microarreglos realizados con anterioridad en *E. coli*, en que se observó la sobreexpresión de genes relacionados con los mismos procesos biológicos en presencia de concentraciones subletales de telurito (Molina-Quiroz *et al.* 2014). Sin embargo, la magnitud de la expresión de estos genes fue significativamente menor en comparación con los tratamientos con mercurio (Figura 16). Esto podría indicar que ATH-43 no ha evolucionado aun respuestas para enfrentarse a telurito, pero sí a mercurio. De esta forma, los mecanismos de resistencia a mercurio podrían, indirectamente, jugar un rol en depurar telurito en esta bacteria. En este contexto, y concordante con resultados proteómicos de *E. coli* (Onnis-Hayden *et al.* 2009) y *C. glutamicum* (Gao *et al.* 2013), análisis de perfiles transcriptómicos de organismos vegetales como *Medicago truncatula* y *M. sativa* muestran un aumento en la expresión de genes involucrados en defensa contra estrés oxidativo. Estos últimos codifican para superóxido dismutasas, catalasas, peroxidasas, disulfido isomerasas, proteínas de estrés térmico y pequeños RNAs no codificantes (Cheng y Yang, 2012; Zhou *et al.* 2013; Montero-Palmero *et al.* 2014). También, se ha visto que en algunas bacterias como

*Caulobacter crescentus* la exposición a cadmio, uranio y cromato induce la expresión de uno, tres y dos pequeños RNAs no codificantes, respectivamente (Hu *et al.* 2005). Se desconoce a la fecha si la exposición a mercurio induce la expresión de pequeños RNAs que pudiesen estar involucrados en la respuesta contra este estrés. Por otro lado, entre los genes más expresados en ATH-43 en respuesta a mercurio, se encuentran aquellos que codifican para proteínas ribosomales. En este sentido, un análisis proteómico de *P. putida* KT2440 y Sp3 expuestas a mercurio mostró un considerable aumento de proteínas ribosomales, además de proteínas generales de respuesta a estrés, transporte y oxidoreductasas metabólicas (Leonhauser *et al.* 2007).

Con respecto a los genes reprimidos en los tratamientos con metales, se observó disminución en la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en el metabolismo de aminoácidos, azúcares, lípidos, nucleótidos y transporte. Estos resultados son concordantes con el estudio proteómico de Leonhauser *et al.* (2007) en que ciertas proteínas relativas a la síntesis de aminoácidos, transportadores de azúcares, transportadores ABC y algunas porinas de membrana extrema disminuyen en relación al control.

Al analizar particularmente la expresión de los genes *mer*, se evidenció mayor expresión de *merP* y *merT* en el tratamiento con mercurio/telurito que con mercurio por sí solo (Figura 18). Esto podría estar favoreciendo el ingreso controlado de ambos tóxicos, favoreciendo así su destoxicación (Barkay *et al.* 2003). Además, la exposición a telurito resultó en la inducción de la expresión de *merP*. Este tipo de expresión cruzada se ha comunicado anteriormente, donde por ejemplo metales como cadmio y zinc pueden

activar la expresión del operón *mer* en *Nitrosomonas europaea* por mecanismos que no involucran necesariamente su reducción enzimática o destoxicación (Park y Ely, 2008). En este sentido, se ha sugerido que los genes *mer* podrían actuar como “genes centinela”, ya que su expresión es regulada positivamente por ciertos metales y las proteínas Mer podrían actuar como quelantes de los mismos (Park y Ely, 2008). Si bien el telurito induce la expresión de *merP*, esto no pareciera ser suficiente para conferir resistencia a este tóxico.

Por otro lado, se comparó los genes que se expresaban en común en los tratamientos con mercurio y mercurio/telurito, donde se observó un efecto sinérgico sobre la expresión de ciertos genes en el tratamiento conjunto (**Figura 19**). Algunos de ellos codifican para MerP, una proteína hipotética, una translocasa de metales pesados y dos metiltransferasas. En este contexto, se ha demostrado que ciertas metiltransferasas podrían ayudar en la destoxicación de telurito vía formación de compuestos orgánicos volátiles de telurio (Araya *et al.* 2009). Por otro lado, tanto MerP como la proteína de función desconocida (rica en residuos de histidina) podrían actuar como quelantes de metales y la translocasa de metales pesados podría participar en la expulsión de los tóxicos (Lemire *et al.* 2013). Este efecto sinérgico se observó además para algunos genes relacionados con estrés oxidativo que codifican para la alquilhidroperóxido reductasa (*ahpC*), tiorredoxina, superóxido dismutasa (*sod*), glutatión reductasa (*gor*) y glutatión peroxidasa (*gpx*). Los productos de estos genes que se expresan en presencia de mercurio, podrían estar controlando de manera indirecta el estrés oxidativo causado por telurito. Curiosamente no se detectó la expresión de catalasa en ninguno de los tratamientos. Este resultado puede

deberse a los tiempos de exposición a los tóxicos (10 min), o a los distintos mecanismos moleculares que gobiernan la regulación de la respuesta contra estrés oxidativo. En este contexto, se ha determinado que en *P. putida* existen otros factores de transcripción como Ohr, PerR, LysR y MerR-like que controlan la expresión de determinados genes y regulones involucrados en la respuesta a estrés oxidativo. Esto ocurre en forma distinta a la situación de los factores de transcripción SoxR y OxyR en *E. coli* (Wu *et al.* 2010). De hecho, en el proteoma de *P. putida* KT2440 expuesta a mercurio tampoco se encontró catalasas (Leonhauser *et al.* 2007). Por último, se observó que uno de los genes sobreexpresados en el tratamiento conjunto corresponde a una proteína exportadora de hemo. Recientemente, nuestro laboratorio ha demostrado que otro mecanismo de toxicidad de telurito estaría dado por interferencia de la síntesis de hemo provocando la acumulación de algunos intermediarios que serían altamente tóxicos (Morales *et al.* manuscrito en preparación). En este contexto, la presencia de este exportador podría facilitar la expulsión de hemo y en consecuencia, reducir la acumulación de intermediarios tóxicos generados por la presencia de telurito.

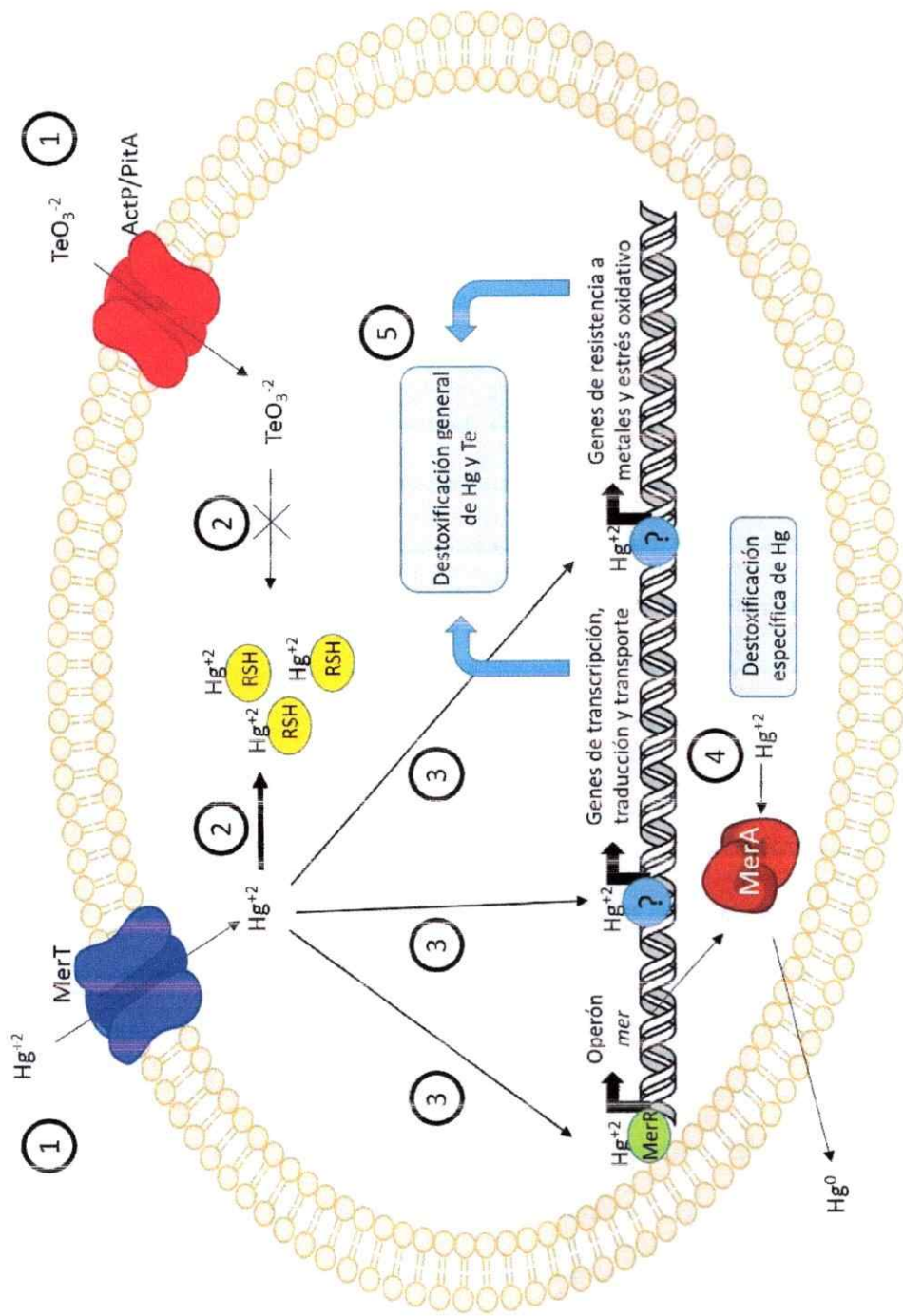
Finalmente, la idea del objetivo específico 4 de esta Tesis era demostrar si la enzima MerA reduce o no telurito para así ayudar a la resistencia al tóxico en ATH-43. Como primera aproximación se utilizó una MerA recombinante codificada en el plásmido ambiental pTP6, que fue aislado de un río contaminado con mercurio en Kazakhstán (Smalla *et al.* 2006). Aparte de la actividad canónica (reductasa mercúrica, con una notoria preferencia por NADPH) (Figura 22), esta enzima también exhibió actividad telurito reductasa dependiente de NADPH *in vitro* (Figura 23). Se ha demostrado que, en general,



estas flavoenzimas poseen preferencia por este cofactor (Argyrou y Blanchard, 2004). Por otro lado, resultados de nuestro laboratorio determinó, vía predicciones bioinformáticas, las características estructurales que debían estar presentes en ciertas enzimas (incluida MerA) para exhibir actividad telurito reductasa (Arenas *et al.* 2016). Un ensayo comparativo con la enzima glutatión reductasa, identificada por su alta actividad reductora de telurito (Pugin *et al.* 2015), mostró que la eficiencia de MerA en la reducción de telurito es similar a la de Gor (Muñoz, 2014). Además, recientemente se demostró que MerA purificada de *Synechocystis* PCC6803 puede reducir el catión uranilo, rompiendo por primera vez la paradigmática especificidad de MerA por iones de mercurio (Marteyn *et al.* 2013).

Contradictoriamente a los resultados *in vitro*, aquellos obtenidos *in vivo* con las cepas ATH sugieren que MerA no estaría involucrada en la reducción de telurito en la célula. Como se esperaba, extractos crudos de cultivos previamente expuestos a mercurio o mercurio/telurito mostraron alta actividad mercurio reductasa, dado que el operón *mer* es rápidamente inducido en presencia de este metal (Barkay *et al.* 2003) (Figura 25). Esto no se observó en ATH-62, apoyando nuevamente la idea que esta cepa carece de este mecanismo de detoxificación. Sin embargo, cuando se ensayó actividad telurito reductasa en los mismos extractos crudos, no se detectó aumentos de esta actividad en cultivos tratados con mercurio o mercurio/telurito (Figura 26). Este resultado sugiere que MerA no participaría en la reducción de telurito, y en consecuencia, en su resistencia. Si bien esta enzima muestra actividad reductora de telurito *in vitro*, ello no debiese ocurrir obligatoriamente *in vivo*, donde el telurito podría interactuar con otras moléculas del

citosol (e.g. metalotioneinas). Por otro lado, se ha demostrado que el telurito es reducido al interactuar con tioles celulares como GSH, generandose anión superóxido, que a su vez representa una de las principales causas de su toxicidad (Turner *et al.* 1999; Vrionis *et al.* 2015). En este sentido, la alta afinidad del mercurio por tioles resultaría en una disminución del *pool* intracelular de RSH, lo que resultaría en una menor reducción de telurito y por tanto en una menor generación de superóxido. La **figura 27** representa un modelo del mecanismo molecular por el cual la presencia de mercurio en el interior de la célula, podría estar favoreciendo la resistencia cruzada a telurito en la cepa ATH-43. Estudios adicionales son necesarios para entender en mayor detalle el mecanismo de resistencia cruzada a telurito gatillada por la presencia de mercurio en las cepas ATH.



**Figura 27. Modelo del mecanismo molecular deresistencia cruzada a telurito, gatillada por la presencia de mercurio en la cepa ATH-43. 1) Mercurio y telurito ingresan a la célula por canales de transporte específico, MerT y ActP/PitA, respectivamente. 2) Ambos tóxicos poseen afinidad por tioles celulares (enzimas o moléculas), sin embargo, la afinidad de mercurio por tioles es mucho mayor que la del telurito. De este modo, se bloquea la reducción enzimática y no enzimática de telurito, eviando así la producción de anión superóxido. 3) Paralelamente, la presencia de mercurio activa la transcripción de distintos grupos de genes incluyendo: operón *mer*, genes relacionados con transporte, transcripción y traducción; y genes que participan en la respuesta a estrés oxidativo y resistencia a metales pesados. 4) El mecanismo específico de desintoxicación de mercurio, mediado por el operón *mer*, participa en la reducción de iones de mercurio. 5) Mecanismos generales de resistencia a estrés, estarían participando tanto en la desintoxicación de mercurio, como de telurito.**

## 5. Conclusiones

Se aislaron 4 cepas bacterianas de muestras Antárticas resistentes a mercurio y telurito. Las cepas fueron denominadas cepas ATH. Tres de ellas pertenecen al género *Pseudomonas* y la otra a *Psychrobacter*.

Las cepas de *Pseudomonas* aumentan su resistencia a telurito sólo en presencia de mercurio, especialmente en la cepa ATH-43.

El mecanismo de resistencia cruzada a telurito en respuesta a mercurio observado en cepas de *Pseudomonas* antárticas, estaría dado principalmente por mecanismos contra estrés oxidativo.

Análisis transcriptómicos de la cepa ATH-43 demostró que la presencia de mercurio estaría gatillando la expresión de genes relacionados con la detoxificación de metales pesados y estrés en general.

MerA reduce telurito *in vitro*, y aparentemente no *in vivo*. Por ende, la reducción del oxianión de telurio a su forma menos tóxica (telurio elemental) no representaría un mecanismo de resistencia en las cepas ATH.



## 6. Proyecciones

Determinar si el fenómeno de potenciación a la resistencia a telurito gatillada por la presencia de mercurio, ocurre en cepas aisladas de otras zonas geográficas.

Cuantificar la velocidad de ingreso de mercurio y telurito en las cepas ATH y correlacionarlo con el fenómeno de potenciación.

Secuenciar los genomas de las otras cepas con el fin de realizar genómica comparativa que pueda correlacionarse con los distintos grados de resistencia a telurito.

Purificar las enzimas MerA de todas las cepas ATH y evaluar su actividad mercurio y telurito reductasa en términos bioquímicos para su comparación en cuanto a eficiencia de reducción.

## 7. Referencias

- Altimira F, Yáñez C, Bravo G, González M, Rojas L, y Seeger M (2012) Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. *BMC Microbiology*, 12:193.
- Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, y Lipman D (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410.
- Araya M, Tantaleán J, Pérez J, Fuentes D, Calderón I, Saavedra C, Burra R, Chasteen T, y Vásquez C (2009) Cloning, purification and characterization of *Geobacillus stearothermophilus* V uroporphyrinogen-III methyltransferase: evaluation of its role in resistance to potassium tellurite in *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*, 160: 125-133.
- Arenas F, Díaz W, Leal C, Perez-Donoso J, Imlay J, y Vásquez C (2010) The *Escherichia coli* *btuE* gene, encodes a glutathione peroxidase that is induced under oxidative stress conditions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 398: 690-694.
- Arenas F, Covarrubias P, Sandoval J, Pérez-Donoso J, Imlay J, y Vásquez C (2011) The *Escherichia coli* *BtuE* protein functions as a resistance determinant against reactive oxygen species. *PLoS ONE*, 6: e15979.
- Arenas F, Pugin B, Henríquez N, Arenas-Salinas M, Díaz-Vásquez W, Pozo M, Muñoz C, Chasteen T, Pérez-Donoso J, y Vásquez C (2014) Isolation, identification and characterization of highly tellurite-resistant, tellurite-reducing bacteria from Antarctica. *Polar Science*, 8: 40-52.
- Arenas-Salinas M, Vargas-Pérez J, Morales W, Pinto C, Muñoz-Díaz P, Cornejo F, Pugin B, Sandoval J, Díaz-Vásquez W, Muñoz-Villagrán C, Rodríguez-Rojas F, Morales E, Vásquez C y Arenas F (2016) Flavoprotein-mediated tellurite reduction: structural basis and applications to the synthesis of tellurium-containing nanostructures. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1160.
- Argyrou A, y Blanchard J (2004) Flavoproteins disulfide reductases: advances in chemistry and function. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 78:90-142.
- Baesman S, Bullen T, Dewald J, Zhang D, Curran S, Islam F, Beveridge T, y Oremland R (2007) Formation of tellurium nanocrystals during anaerobic growth of bacteria that use Te oxyanions as respiratory electron acceptors. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 2135-2143.
- Baesman S, Stolz J, Kulp T, y Oremland R (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.
- Bakir F, Damluji F, Amin-Zaki L, Murtadha M, Khalidi A, al-Rawi N, Tikriti S, y Dhahir (1973) Methylmercury poisoning in Iraq. *Science*, 181: 230-241.
- Banjerdkij P, Vattanaviboon P, y Mongkolsuk S (2005) Exposure to cadmium elevates expression of genes in the OxyR and OhrR regulons and induces cross-resistance to peroxide killing treatment in *Xanthomonas campestris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 1843-1849.
- Barkay T (1987) Adaptation of aquatic microbial communities to Hg<sup>+2</sup> stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 2725-2732.
- Barkay T, Miller S, y Summers A (2003) Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS*

- Microbiology Reviews*, 27: 355-384.
- Bienert G, Schüssler M, y Jahn, T (2008) Metalloids: essential, beneficial or toxic? Major intrinsic proteins sort it out. *Trends in Biochemical Sciences*, 33: 20-26.
- Bolger A, Lohse M, y Usadel B (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics. Genome analysis*, 30: 2114-2120.
- 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. *Research in Microbiology*, 156: 807-813.
- Boyd E, y Barkay T (2012) The mercury resistance operon: from an origin in a geothermal environment to an efficient detoxification machine. *Frontiers in Microbiology*, 3: 1-13.
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dys binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Cakar Z, Alkim C, Turanli B, Tokman N, Akman S, Sarikaya M, Tamerler C, Benbadis L, y Francois J (2009) Isolation of cobalt hyper-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae* by *in vivo* evolutionary engineering approach. *Journal of Biotechnology*, 143: 130-138.
- Calderón I, Arenas F, Pérez J, Fuentes D, Araya M, Saavedra C, Tantaleán J, Pichuantes S, Youderian P, y Vásquez C (2006) Catalases are NAD(P)H-dependent tellurite reductases. *PLoS ONE*, 1: e70.
- Calderón I, Elías A, Fuentes E, Pradenas G, Castro M, Arenas F, Pérez J, y Vásquez C (2009) Tellurite-mediated disabling of [4Fe-4S] clusters of *Escherichia coli* dehydratases. *Microbiology*, 155: 1840-1846.
- Cantoni O, Hussain S, Guidarelli A, y Cattabeni F (1994) Cross-resistance to heavy metals in hydrogen peroxide-resistant CHO cell variants. *Mutation Research*, 324: 1-6.
- Castro M, Molina R, Díaz W, Pichuantes S, y Vásquez C (2008) The dihydrolipoamide dehydrogenase of *Aeromonas caviae* ST exhibits NADH-dependent tellurite reductase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 375: 91-94.
- Castro M, Molina R, Díaz W, Pradenas G, y Vásquez C (2009) Expression of *Aeromonas caviae* ST pyruvate dehydrogenase complex components mediate tellurite resistance in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 380: 148-152.
- Cervantes-Vega C, Chávez J, Cordova N, de la Mora P, y Velasco A (1986) Resistance to metals by *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Microbios*, 48: 159-163 .
- Champier L, Duarte V, Miachaud-Soret I, y Coves J (2004) Characterization of the MerD protein from *Ralstonia metallidurans* CH34: a possible role in bacterial mercury resistance by switching off the induction of the *mer* operon. *Molecular Microbiology*, 52: 1475-1485.
- Chasteen T, y Bentley R (2003) Biomethylation of selenium and tellurium: microorganisms and plants. *Chemical Reviews*, 103: 1-25.
- Chasteen T, Fuentes D, Tantaleán J, y Vásquez C (2009) Tellurite: history, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 33: 820-832.

- Chattopadhyay M, Raghu G, Sharma Y, Biju A, Rajasekharan M, y Shivaji S (2011) Increase in oxidative stress at low temperature in an antarctic bacterium. *Current Microbiology*, 62: 544-546.
- Chen J, y Yang Z (2012) Mercury toxicity, molecular response and tolerance in higher plants. *Biometals*, 25: 847-857.
- Chiong M, Barra R, González E, y Vásquez, C (1988) Resistance to potassium tellurite in *Thermus spp.* *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 610-612.
- Claudel-Renard C, Chevalet C, Faraut T, y Kahn D (2003) Enzyme-specific profiles for genome annotation: PRIAM. *Nucleic Acids Research*, 31: 6633-6639.
- Conesa A, Gotz S, García-Gómez J, Terol J, Talón M, y Robles M (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21: 3674-3676.
- Contreras N, y Vásquez C (2010) Tellurite-induced carbonylation of the *Escherichia coli* pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Archives of Microbiology*, 192: 969-973.
- Cortés S, y Fortt A (2007) Mercury content in Chilean fish and estimated intake levels. *Food Additives and Contaminants*, 24: 955-959.
- Csotonyi J, Stackebrandt E, y Yurkov V (2006) Anaerobic respiration on tellurate and other metalloids in bacteria from hydrothermal vent fields in the eastern Pacific Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 4950-4956.
- De Gregori I, Fuentes E, Rojas M, Pinochet H, y Potin-Gautier M (2003) Monitoring of copper, arsenic and antimony levels in agricultural soils impacted and non-impacted by mining activities, from three regions in Chile. *Journal of Environmental Monitoring*, 5: 287-295.
- Delcher A, Harmon D, Kasif S, White O, y Salzberg S (1999) Improved microbial gene identification with GLIMMER. *Nucleic Acids Research*, 27: 4636-4641.
- De Souza M, Nair S, Loka-Bharathi P, y Chandramohan D (2006) Metal and antibiotic-resistance in psychrotrophic bacteria from Antarctic Marine waters. *Ecotoxicology*, 15: 379-384.
- De Souza M, Loka Bharathi P, Nair S, y Chandramohan D (2007) "Trade-off" in Antarctic bacteria: limnetic psychrotrophs concede multiple enzyme expressions for multiple metal resistance. *Biometals*, 20: 821-828.
- Díaz-Vásquez W, Abarca-Lagunas M, Arenas F, Pinto C, Cornejo F, Wansapura P, Appuhamillage G, Chasteen T, y Vásquez 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, Abarca-Lagunas M, Cornejo F, Pinto A, Arenas F, y Vásquez C (2014) Tellurite-mediated damage to *Escherichia coli* NDH-dehydrogenases and terminal oxidases in aerobic conditions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 566: 67-75.
- Diels L, Faelen M, Mergeay M, y Nies D (1985) Mercury transposons from plasmids governing multiple resistance to heavy metals in *Alcaligenes eutrophus* CH34. *Archives Internationales de Physiologie, de Biochimie*, 93: B27-B28.
- Dutta A, y Chaudhuri K (2010) Analysis of tRNA composition and folding in psychrophilic, mesophilic and



- thermophilic genomes: indication for thermal adaptation. *FEMS Microbiology Letters*, 305: 100-108.
- Ebinghaus R, Kock H, Temme C, Einax J, Lowe A, Richter A, Burrows J, y Schroeder W (2002) Antarctic springtime depletion of atmospheric mercury. *Environmental Science and Technology*, 36: 1238-1244.
- Ellman G (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82: 70-77.
- Emnet P (2009) ANTA502: Literature Review Heavy metals: A heavy burden on the icy continent, 3-9 (<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/summary?doi=10.1.1.549.6918>)
- Felske D, Fehr W, Pauling B, von Canstein H, y Wagner-Döbler I (2003) Functional profiling of mercuric reductase (*merA*) genes in biofilm communities of a technical scale biocatalyzer. *BMC Microbiology*, 3: 1-11.
- Felux A, Franchini P, y Schleheck D (2015) Permanent draft genome sequence of sulfoquinovose-degrading *Pseudomonas putida* strain SQ1. *Standards in Genomic Sciences*, 10: 42.
- Freedman Z, Zhu C, y Barkay T (2012) Mercury resistance, mercuric reductase activities and expression among chemotrophic thermophilic *Aquificae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 6568-6575.
- Fuentes D, Fuentes E, Castro M, Pérez J, Araya M, Chasteen T, Pichuanes S, y Vásquez C (2007) Cysteine metabolism-related genes and bacterial resistance to potassium tellurite. *Journal of Bacteriology*, 189: 8953-8960.
- Gao Y, Peng X, Zhang J, Zhao J, Li Y, Li-Y, Li B, Hu Y, y Chai Z (2013) Cellular response of *E. coli* upon Hg<sup>+2</sup> exposure: a case study of advanced nuclear analytical approach to metalloproteomics. *Metallomics*, 5: 913-919.
- Grier N (1977) Mercurial-inorganic and organic in disinfection, sterilization, and preservation, 2nd Ed. Lea and Febiger, Philadelphia, pp 361.
- Harrison J, Ceri H, Stremick C, y Turner R (2004) Biofilm susceptibility to metal toxicity. *Environmental Microbiology*, 6: 1220-1227.
- Grabherr M, Haas B, Yassour M, Levin J, Thompson D, Amit I, y Regev A (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 29: 644-652.
- Henriques I, Tacao M, Leite L, Fidalgo C, Araújo S, Oliveira C, y Alves A (2016) Co-selection of antibiotic and metal(oid) resistance in Gram-negative epiphytic bacteria from contaminated salt marshes. *Marine Pollution Bulletin*, 109: 427-434.
- Hermanns Y, y Biester H (2013) Anthropogenic mercury signals in lake sediments from southernmost Patagonia, Chile. *Science of the Total Environment*, 445-446: 126-135.
- Heuchert A, Glockner F, Amann R, y Fischer U (2004) *Psychrobacter nivimaris* sp. nov., a heterotrophic bacterium attached to organic particles isolated from the South Atlantic (Antarctica). *Systematic and Applied Microbiology*, 27: 399-406.
- Hu P, Brodie E, Suzuki Y, McAdams H, y Andersen G (2005) Whole-genome transcriptional analysis of heavy metal stresses in *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*, 187: 8437-8449.
- Imlay J (2006) Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Molecular Microbiology*, 59: 1073-1082.

- Jensen K, y Pedersen S (1990) Metabolic growth rate control in *Escherichia coli* may be a consequence of subsaturation of the macromolecular biosynthetic apparatus with substrates and catalytic components. *Microbiological Reviews*, 54: 89-100.
- Kachur A, Koch C, y Biaglow J (1998) Mechanism of copper-catalyzed oxidation of glutathione. *Free Radical Research*, 28: 259-269.
- Kagami T, Fudemoto A, Fujimoto N, Notaguchi E, Kanzaki M, y Kuroda M (2012) Isolation and characterization of bacteria capable of reducing tellurium oxyanions to insoluble elemental tellurium for tellurium recovery from wastewater. *Waste Biomass Valorization*, 3: 409-418.
- Kholodii G, Yurieva O, Gorlenko Z, Mindlin S, Bass I, Lomovskaya O, Kopteva A, y Nikiforov V (1997) Tn5041: a chimeric mercury resistance transposon closely related to a toluene degradative transposon Tn4651. *Microbiology*, 143: 2549-2556.
- Kholodii G, Mindlin A, Gorlenko Z, Bass I, Kalyaeva E, y Nikiforov V (2000a) Host-dependent transposition of Tn5041. *Russian Journal of Genetics*, 36: 365-373.
- Kholodii G, Yurieva O, Mindlin S, Gorlenko Z, Rybochkin V, y Nikiforov V (2000b) Tn5044, a novel Tn3 family transposon coding for temperature-sensitive mercury resistance. *Research in Microbiology*, 151: 291-312.
- Kholodii G, y Bogdanova E (2002) Tn5044-conferred mercury resistance depends on temperature: the complexity of the character of thermosensitivity. *Genetica*, 115: 233-241.
- Kinoshita H, Sohma Y, Ohtake F, Ishida M, Kawai Y, Kitazawa H, Saito T, y Kimura K (2013) Biosorption of heavy metals by lactic acid bacteria and identification of mercury binding protein. *Research in Microbiology*, 164: 701-709.
- Knapp C, McClusky S, Singh B, Campbell C, Hudson G, y Graham D (2011) Antibiotic resistance gene abundances correlate with metal and geochemical conditions in archived Scottish soils. *PLoS ONE*, 6:e27300.
- Koc S, Kabatas B, y Icen B (2013) Multidrug and heavy metal-resistant *Raoultella planticola* isolated from surface water. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 91: 177-183.
- Kormutakova R, Klucar L, y Turna J (2000) DNA sequence analysis of the tellurite-resistance determinant from clinical strain of *Escherichia coli* and identification of essential genes. *Biometals*, 13: 135-139.
- Lacerda L, y Salomons W (1991) Mercury in the Amazon: A chemical time bomb? *Physical Planning and Environment*, pp 1.
- Leiva M, y Morales S (2013) Environmental assessment of mercury pollution in urban tailings from gold mining. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 90: 167-173.
- Lemire J, Harrison J, y Turner R (2013) Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews in Microbiology*, 11: 371-384.
- Leonhauser J, Wang W, Deckwer W, y Wagner-Dobler I (2007) Functioning of the mercury resistance operon at extremely high Hg(II) loads in a chemostat: A proteome analysis. *Journal of Biotechnology*, 132: 469-480.
- Li W, y Godzik A (2006) Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 22: 1658-1659.

- Li B, y Dewey C (2011) RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, 12: 323.
- Lindberg S, Brooks S, Lin C, Scott K, Landis M, Stevens R, Goodsite M, y Richter A (2002) Dynamic oxidation of gaseous mercury in the Arctic troposphere at polar sunrise. *Environmental Science and Technology*, 36: 1245-1256.
- Liochev S, Benov L, Touati D, y Fridovich I (1999) Induction of the *soxRS* regulon of *Escherichia coli* by superoxide. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 9479-9481.
- Livak K, y Schmittgen T (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 25: 402-408.
- Lo Giudice A, Casella P, Bruni V, y Michaud L (2013) Response of bacterial isolates from Antarctic shallow sediments towards heavy metals, antibiotics and polychlorinated biphenyls. *Ecotoxicology*, 22: 240-250.
- Love M, Huber W, y Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15: 550.
- Macdonald R, Harner T, y Fyfe J (2005) Recent climate change in the Arctic and its impact on contaminant pathways and interpretation of temporal trend data. *The Science of the Total Environment*, 342: 5-86.
- Mao de Ferro A, Mota A, y Canario J (2013) Sources and transport of As, Cu, Cd and Pb in the environmental compartments of Deception Island, Antarctica. *Marine Pollution Bulletin*, 77: 341-348.
- Mao de Ferro A, Mota A, y Canario J (2014) Pathways and speciation of mercury in the environmental compartments of Deception Island, Antarctica. *Chemosphere*, 95: 227-233.
- Marteyn B, Sakr S, Farci S, Bedhomme M, Chardonnet S, Decottignies P, Lemaire S, Cassier-Chauvat C, y Chauvat F (2013) The *Synechocystis* PCC6803 MerA-Like enzyme operates in the reduction of both mercury and uranium under the control of the glutaredoxin 1 enzyme. *Journal of Bacteriology*, 195: 4138-4145.
- Mathema V, Thakuri B, y Sillanpää M (2011) Bacterial *mer* operon-mediated detoxification of mercurial compounds: a short review. *Archives of Microbiology*, 193: 837-844.
- Mergeay M, Nies D, Schlegel H, Gerits J, Charles P, y van Gijsegem F (1985) *Alicagenes eutophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with a plasmid-bound resistance to heavy metals. *Journal of Bacteriology*, 162: 328-334.
- Mindlin S, Minakhin L, Petrova M, Kholodii G, Minakhina S, Gorlenko Z, y Nikiforov V (2005) Present day mercury resistance transposons are common in bacteria preserved in permafrost grounds since the Upper Pleistocene. *Research in Microbiology*, 156: 994-1004.
- Molina-Quiroz R, Loyola D, Díaz-Vásquez W, Arenas F, Urzúa U, Pérez-Donoso J, y Vásquez C (2014) Global transcriptomic analysis uncovers a switch to anaerobic metabolism in tellurite-exposed *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*, 165: 566-570.
- Montero-Palmero M, Martín-Barranco A, Escobar C, y Hernández L (2014) Early transcriptional responses to mercury: a role for ethylene in mercury-induced stress. *New Phytology*, 201: 116-130.
- Muñoz, P. (2014). La enzima mercurio reductasa (MerA) exhibe actividad reductora de telurito que afectaría la tolerancia de *Escherichia coli* al tóxico. Tesis de para optar al título de Bioquímico. Universidad de Santiago

de Chile.

- Murtaza I, Dutt A, Mushtaq D, y Ali A (2005) Molecular cloning and genetic analysis of functional *merB* gene from Indian isolates of *Escherichia coli*. *Current Microbiology*, 51: 297-302.
- Nies D, Mergeay M, Friedrich B, y Schlegel H (1987) Cloning of plasmid genes resistance to cadmium, zinc and cobalt in *Alicagenes eutrophus* CH34. *Journal of Bacteriology*, 169: 4865-4868.
- Nies A, Nies D, y Silver S (1990) Nucleotide sequence and expression of a plasmid-encoded chromate resistance determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *Journal Biological Chemistry*, 265: 5648-5653.
- Nies D (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51: 730-750.
- Nies D (2000) Heavy metal-resistant bacteria as extremophiles: molecular physiology and biotechnological use of *Ralstonia* sp. CH34. *Extremophiles*, 4: 77-82.
- O'Gara J, Gomelsky M, y Kaplan S (1997) Identification and molecular genetic analysis of multiple *loci* contributing to high-level tellurite resistance in *Rhodobacter sphaeroides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 4713-4720.
- Ohlander J, Huber S, Schomaker M, Heumann C, Schierl R, Michalke B, Jenni O, Caflish J, Moraga D, von Ehrenstein O, y Radon K (2013) Risk factors for mercury exposure of children in a rural mining town in northern Chile. *PLoS ONE*, 8: e79756.
- Oliveira A, Bocio A, Trevilato T, Takayanagui A, Domingo J, y Segura-Munoz S (2007) Heavy metals in untreated/treated urban effluent and sludge from a biological wastewater treatment plant. *Environmental Science and Pollution Research International*, 14: 483-489.
- Onnis-Hayden A, Weng H, He M, Hansen S, Ilyin V, Lewis K, y Guc A (2009) Prokaryotic real-time gene expression profiling for toxicity assessment. *Environmental Science and Technology*, 43: 4574-4581.
- Osborn A, Bruce K, Strike P, y Ritchie D (1997) Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (*mer*) operon. *FEMS Microbiology Reviews*, 19: 239-262.
- Park S, y Ely R (2008) Candidate stress genes of *Nitrosomonas europaea* for monitoring inhibition of nitrification by heavy metals. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 5475-5482.
- Pell A, Márquez A, López-Sánchez J, Rubio R, Barbero M, Stegen S, Queirolo F, y Díaz-Palma P (2013) Occurrence of arsenic species in algae and freshwater plants of an extreme arid region in northern Chile, the Loa River basin. *Chemosphere*, 90: 556-564.
- Pérez J, Calderón I, Arenas F, Fuentes D, Pradenas G, Fuentes, E, Sandoval J, Castro M, Elías A, y Vásquez C (2007) Bacterial toxicity of potassium tellurite: unveiling an ancient enigma. *PLoS ONE*, 2: e211.
- Poulain A, Chadhain S, Ariya P, Amyot M, Garcia E, Campbell P, Zylstra G, y Barkay T (2007) Potential for mercury reduction by microbes in the high Arctic. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 2230-2238.
- Pugin B, Cornejo F, Muñoz-Díaz P, Muñoz-Villagrán C, Vargas-Pérez J, Arenas F, y Vásquez C (2014) Glutathione reductase-mediated synthesis of tellurium-containing nanostructures exhibiting antibacterial properties. *Applied and Environmental Microbiology*, 80: 7061-7070.
- Rademacher C, Hoffmann M, Lackmann J, Moser R, Pfänder Y, Leimkühler S, Narberhaus F, y Masepohl B (2012)

- Tellurite resistance gene *trgB* confers copper tolerance to *Rhodobacter capsulatus*. *Biometals*, 25: 995-1008.
- Rafati-Rahimzadeh M, Rafati-Rahimzadeh M, Kazemi S, y Moghadamnia A (2014) Current approaches of the management of mercury poisoning: need of the hour. *Daru: journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Science*, 22: 46- 56.
- Rapisarda V, Montelongo L, Farias R, y Massa E (1999) Characterization of an NADH-linked cupric reductase activity from the *Escherichia coli* respiratory chain. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 370: 143-150.
- Rathgeber C, Yurkova N, Stackebrandt E, Thomas J, y Yurkov V (2002) Isolation of tellurite and selenite resistant bacteria from hydrothermal vents of the Juan de Fuca Ridge in the Pacific Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 4613-4622.
- Rigobello M, Folda A, Citta A, Scutari G, Gandin V, Potamitou F, Rundlöf A, Marzano C, Björnstedt M, y Bindoli A (2011) Interaction of selenite and tellurite with thiol-dependent redox enzymes: kinetics and mitochondrial implications. *Free Radical Biology and Medicine*, 50: 1620-1629.
- Rojas L, Yáñez C, González M, Lobos S, Smalla K, y Seeger M (2011) Characterization of the metabolically modified heavy metal-resistant *Cupriavidus metallidurans* strain MSR33 generated for mercury bioremediation. *PLoS ONE*, 6: e17555.
- Romanenko L, Lysenko A, Rhode M, Mikhailov V, y Stackebrandt E (2004) *Psychrobacter maritimus* sp. nov. and *Psychrobacter arenosus* sp. nov., isolated from coastal sea ice and sediments of the Sea of Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1741-1745.
- Saavedra C, Encinas M, Araya M, Pérez J, Tantaleán J, Fuentes D, Calderón I, Pichuantes S, y Vásquez C (2004) Biochemical characterization of a thermostable cysteine synthase from *Geobacillus stearothermophilus* V. *Biochimie*, 86: 481-485.
- Saitou N, y Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.
- Salzberg S, Deicher A, Kasif S, y White O (1998) Microbial gene identification using interpolated Markov models. *Nucleic Acids Research*, 26: 544-548.
- Sandoval J, Arenas F, y Vásquez C (2011) Glucose-6-phosphate dehydrogenase protects *Escherichia coli* from tellurite-mediated oxidative stress. *PLoS ONE*, 6: e25573.
- Sandstrom A, y Lindskog S (1987) Activation of mercuric reductase by the substrate NADPH. *European Journal of Biochemistry*, 164: 243-249.
- Schaefer J, Letowski J, y Barkay T (2002) Mer mediated resistance and volatilization of Hg(II) under anaerobic conditions. *Geomicrobiology Journal*, 19: 87-102.
- Schelert J, Dixit V, Hoang V, Simbahan J, Drozda M, y Blum P (2004) Occurrence and characterization of mercury resistance in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* by use of gene disruption. *Journal of Bacteriology*, 186: 427-437.
- Schelert J, Drozda M, Dixit V, Dillman A, y Blum P (2006) Regulation of mercury resistance in the crenarchaeote *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Bacteriology*, 188: 7141-7150.

- Seiler C, y Berendok T (2012) Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Frontiers in Microbiology*, 3: 399.
- Sen M, Yilmaz U, Baysal A, Akman S, y Cakar Z (2011) *In vivo* evolutionary engineering of a boron-resistant bacterium: *Bacillus boroniphilus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99: 825-835.
- Silver S, y Hobman J (2007) Mercury microbiology: resistance systems, environmental aspects, methylation, and human health. In: *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. D. Nies & S. Silver (eds). Springer Berlin Heidelberg, pp. 357-370.
- Silver S, y Phung T (2005) A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 32: 587-605.
- Silver S, y Phung T (1996) Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annual Review of Microbiology*, 50: 753-789.
- Smalla K, Haines AS, Jones K, Krögerrecklenfort E, Heuer H, Schloter M, y Thomas C (2006) Increased abundance of IncP-1beta plasmids and mercury resistance genes in mercury-polluted river sediments: first discovery of IncP-1beta plasmids with a complex *mer* transposon as the sole accessory element. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 7253-7259.
- Subramanian V, Liu T, Yeh W, Serdar C, Wackett L, y Gibson D (1985) Purification and properties of ferredoxin TOL: A component of toluene dioxygenase from *Pseudomonas putida* F1. *The Journal of Biological Chemistry*, 260: 2355-2363.
- Summers A, y Sugarman L (1974) Cell-free mercury(II)-reducing activity in a plasmid-bearing strain of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 119: 242-249.
- Taghavi S, Mergeay M, y van der Lie D (1997) Genetic and physical maps of the *Alicagenes eutrophus* CH34 megaplasmid pMOL28 obtained after temperature-induced mutagenesis and mortality. *Plasmid*, 37: 22-34.
- Taghavi S, Garafola C, Monchy S, Newman K, Hoffman A, Weyens N, Barac T, Vangronsveld J, y van der Lelie D (2009) Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 748-757.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, y Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
- Tanenbaum D, Goll J, Murphy S, Kumar P, Zafar N, Thiagarajan M, Madupu R, Davidsen T, Kagan L, Kravitz S, Rusch D, y Yooshep S (2010) The JCVI standard operating procedure for annotating prokaryotic metagenomic shotgun sequencing data. *Standards in Genomic Sciences*, 2: 229-237.
- Tantaleán J, Araya M, Saavedra C, Fuentes D, Pérez J, Calderón I, Youderian P, y Vásquez C (2003) The *Geobacillus stearothermophilus* V *iscS* gene, encoding cysteine desulfurase, confers resistance to potassium tellurite in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 185: 5831-5837.
- Tashirev A, Rokitko P, Levishko A, Romanovskaia V, y Tashireva A (2012) Resistance of chemoorganotrophic bacteria isolated from Antarctic cliffs to toxic metals. *Mikrobiologichnyi zhurnal*, 74: 3-7.
- Taylor D, Walter E, Sherburne R, y Bazett-Jones D (1988) Structure and location of tellurium deposited in *Escherichia coli* cells harbouring tellurite resistance plasmids. *Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research*, 99: 18-26.

- Taylor D, Hou Y, Turner R, y Weiner J (1994) Location of a potassium tellurite resistance operon (*tehA tehB*) within the terminus of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 176: 2740-2742.
- Taylor D (1999) Bacterial tellurite resistance. *Trends in Microbiology*, 7: 111-115.
- Toptchieva A, Sisson G, Bryden L, Taylor D, y Hoffman P (2003) An inducible tellurite-resistance operon in *Proteus mirabilis*. *Microbiology*, 149: 1285-1295.
- 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. *Archives of Microbiology*, 187: 127-135.
- Tritt A, Eisen J, Facciotti M, y Darling A (2012) An integrated pipeline for *de novo* assembly of microbial genomes. *PLoS ONE*, 7: e42304.
- Tucker F, Walper J, Appleman M, y Donohue J (1962) Complete reduction of tellurite to pure tellurium metal by microorganisms. *Journal of Bacteriology*, 83: 1313-1314.
- Tucker F, Thomas J, Appleman M, Goodman S, y Donohue J (1966) X-ray diffraction studies on metal deposition in group D streptococci. *Journal of Bacteriology*, 92: 1311-1314.
- Turner R, hou Y, Weiner J, y Taylor D (1992) The arsenical ATPase efflux pump mediates tellurite resistance. *Journal of Bacteriology*, 174: 3092-3094.
- Turner R, Weiner J, y Taylor D (1995) The tellurite-resistance determinants *tehAtehB* and *klaAklaBtelB* have different biochemical requirements. *Microbiology*, 141: 3133-3140.
- Turner R, Weiner J, y Taylor D (1999) Tellurite-mediated thiol oxidation in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 145: 2549-2557.
- Turner S, Pryer K, Miao V, y Palmer J (1999) Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46: 327-338.
- Turner R, Aharonowitz Y, Weiner J, y Taylor D (2001) Glutathione is a target in tellurite toxicity and is protected by tellurite resistance determinants in *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology*, 47: 33-40.
- Uno Y, Kiyono M, Tezuka T, y Pan-Hou H (1997) Phenylmercury transport mediated by *merT-merP* genes of *Pseudomonas* K-62 plasmid pMR26. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 20: 107-109.
- Valdivia-González M, Pérez-Donoso J, y Vásquez C (2012) Effect of tellurite-mediated oxidative stress on the *Escherichia coli* glycolytic pathway. *Biometals*, 25: 451-458.
- van der Lelie D (1998) Biological interactions: the role of soil bacteria in the bioremediation of the heavy metal-polluted soils. In: Vang-ronsveld J, Cunningham SD (eds) *Metal-contaminated soils: in situ inactivation and phytoremediation*. Landes, Austin TX.
- Vásquez C, Saavedra C, Loyola C, Araya M, y Pichuanes S (2001) The product of the *cysK* gene of *Bacillus stearothermophilus* V mediates potassium tellurite resistance in *Escherichia coli*. *Current Microbiology*, 43: 418-423.
- Verhille S, Baida N, Dabboussi F, Izard D, y Leclerc H (1999) Taxonomic study of bacteria isolated from natural

- mineral waters: proposal of *Pseudomonas jessenii* sp. nov. and *Pseudomonas mandelii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 22: 45-58.
- Vishnivetskaya T, Petrova M, Urbance J, Ponder M, Moyer C, Gilichinsky D, y Tiedje J (2006) Bacterial community in ancient Siberian permafrost as characterized by culture and culture-independent methods. *Astrobiology*, 6: 400-414.
- Von Rozycki T, y Nies D (2009) *Cupriavidus metallidurans*: evolution of a metal-resistant bacterium. *Antonie van Leeuwenhoek*, 96: 115-139.
- Von Waldow H, MacLeod M, Jones K, Scheringer M, y Hungerbühler K (2010) Remoteness from emission sources explains the fractionation pattern of polychlorinated biphenyls in the northern hemisphere. *Environmental Science & Technology*, 44: 6183-6188.
- Vrionis H, Wang S, Hasla, B, y Turner R (2015) Selenite protection of tellurite toxicity towards *Escherichia coli*. *Frontiers in Molecular Bioscience*, 2: 69.
- Wang Y, Freedman Z, Lu-Irving P, Laletsky R, y Barkay T (2008) An initial characterization of mercury resistance (*mer*) system of the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus*. *FEMS Microbiology Ecology*, 67: 118-129.
- Weast RC (1984) CRC Handbook of Chemistry and Physics, 64 Ed. CRC, Boca Raton, Flo, USA.
- Wu X, Monchy S, Taghavi S, Zhu W, Ramos J, y van der Lelie D (2010) Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiology Reviews*, 35: 299-323.
- Yáñez J, Guajardo M, Miranda C, Soto C, Mansilla H, y Flegal A (2013) New assessment of organic mercury formation in highly polluted sediments in the Lenga estuary, Chile. *Marine Pollution Bulletin*, 73: 16-23.
- Yoon J, Lee C, Yeo S, y Oh T (2005) *Psychrobacter aquimaris* sp. nov. and *Psychrobacter namhaensis* sp. nov., isolated from sea water of the South Sea in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55: 1007-1013.
- Yurieva O, Kholodii G, Minakhin L, Gorlenko Z, Kalyaeva E, Mindlin S, y Nikiforov V (1997) Intercontinental spread of promiscuous mercury-resistance transposons in environmental bacteria. *Molecular Microbiology*, 24: 321-329.
- Zeng Q, Stafilhandske C, Anderson M, Scott R, y Summers A (1998) The core metal recognition domain of MerR. *Biochemistry*, 37: 15885-15895.
- Zhang Z, Yu J, y Stanton R (2000) A method for determination of pyridine nucleotides using a single extract. *Analytical Biochemistry*, 285: 163-167.
- Zhang W, Chen L, y Liu D (2012) Characterization of a marine-isolated mercury-resistant *Pseudomonas putida* strain SP1 and its potential application in marine mercury reduction. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93: 1305-1314.
- Zheng M, Aslund F, y Storz G (1998) Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science*, 279: 1718-1721.
- Zhou Z, Yang S, Li H, Zhu C, Liu Z, y Yang Z (2013) Molecular dissection of mercury-responsive transcriptome and sense/antisense genes in *Medicago truncatula*. *Journal of Hazardous Materials*, 252-253: 123-131.



## 8. Anexo

**Tabla 11. Genes expresados diferencialmente en tratamiento con mercurio en ATH-43.**

Transcript ID	Log(2)FC	Predicted function	p value adjusted
<b>Traduction</b>			
transcripts_552	3,08	30s ribosomal protein s20	7,70E-40
transcripts_5049	2,49	30s ribosomal protein s8	2,70E-28
transcripts_3760	2,37	50s ribosomal protein l20	5,56E-40
transcripts_3393	2,32	50s ribosomal protein l28	1,46E-24
transcripts_118	2,27	30s ribosomal protein s16	6,90E-16
transcripts_117	2,26	16s rna-processing protein	9,80E-33
transcripts_742	2,26	30s ribosomal protein s9	2,79E-42
transcripts_5046	2,19	30s ribosomal protein s5	2,31E-34
transcripts_5073	2,13	50s ribosomal protein l7 l12	6,29E-22
transcripts_456	2,13	50s ribosomal protein l21	6,85E-31
transcripts_8	2,11	30s ribosomal protein s2	3,51E-37
transcripts_2941	2,09	50s ribosomal protein l32	7,67E-23
transcripts_3231	2,09	50s ribosomal protein l34	1,21E-16
transcripts_7	2,08	elongation factor ts	6,56E-34
transcripts_5047	2,07	50s ribosomal protein l18	4,05E-19
transcripts_3991	2,06	30s ribosomal protein s1	1,54E-25
transcripts_741	2,02	50s ribosomal protein l13	4,05E-19
transcripts_5048	2,00	50s ribosomal protein l6	1,50E-12
transcripts_455	1,99	50s ribosomal protein l27	2,64E-29
transcripts_5050	1,98	30s ribosomal protein s14	4,10E-18
transcripts_5051	1,98	50s ribosomal protein l5	1,33E-20
transcripts_5063	1,98	50s ribosomal protein l3	1,88E-21
transcripts_3394	1,94	50s ribosomal protein l33	1,56E-21
transcripts_5064	1,93	30s ribosomal protein s10	2,79E-19
transcripts_329	1,84	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit i amino acid abc transporter substrate-binding	2,64E-20
transcripts_3176	1,81	protein	1,41E-23
transcripts_243	1,37	glutamyl-trna amidotransferase	2,91E-13

### Transport

transcripts_3176	1,81	amino acid abc transporter substrate-binding protein	1,41E-23
transcripts_3341	1,80	biopolymer transporter	2,05E-15

transcripts_2283	1,78	family multidrug efflux rmd transporter	6,08E-23
transcripts_2484	1,72	periplasmic adaptor subunit	6,98E-07
transcripts_4035	1,71	abc transporter atp-binding protein	2,18E-18
transcripts_2806	1,61	abc transporter	3,68E-13
transcripts_5339	1,60	abc transporter atpase	6,19E-14
transcripts_843	1,53	amino acid abc transporter	4,65E-22
transcripts_2781	1,48	multidrug transporter	6,85E-14
transcripts_4380	1,43	abc transporter	1,36E-17
transcripts_1496	1,35	electron transporter	1,87E-08
transcripts_2454	1,31	abc transporter	6,31E-18
transcripts_3517	1,30	cobalt transporter	7,92E-10
transcripts_3978	1,29	abc transporter atp-binding protein	3,04E-17
transcripts_5338	1,27	channel protein	1,27E-13
transcripts_2760	1,25	abc transporter permease	8,66E-15
transcripts_3582	1,20	abc transporter atp-binding protein	8,66E-08
transcripts_4823	1,19	sulfate abc transporter atp-binding protein	6,51E-07
transcripts_5138	1,18	biopolymer transporter	3,31E-11
transcripts_1780	1,18	abc transporter permease	1,42E-13
transcripts_4433	1,15	metal abc transporter substrate-binding protein	8,66E-08
transcripts_3580	1,15	efflux system membrane protein	2,12E-07
transcripts_3580	1,12	metal abc transporter permease	9,02E-08
transcripts_2347	1,11	heavy metal translocating p-type atpase	1,61E-12
transcripts_4499	1,10	malonate transporter	1,28E-07
transcripts_5140	1,09	iron abc transporter atp-binding protein	2,27E-06
transcripts_1972	1,09	iron abc transporter	1,12E-11
transcripts_1495	1,03	molybdate abc transporter substrate-binding protein	4,55E-11
transcripts_4736	1,02	abc transporter permease	1,28E-09
transcripts_3588	0,98	multidrug abc transporter atp-binding protein	1,15E-06
transcripts_2780	0,95	l-cystine transporter tcyp	2,32E-07
		multidrug abc transporter substrate-binding protein	

### Transcription

transcripts_2986	1,79	rna helicase	1,54E-25
transcripts_2852	1,76	rna polymerase sigma factor	2,10E-21
transcripts_1622	1,72	transcriptional regulator	6,52E-19
transcripts_4817	1,72	transcriptional regulator	6,48E-31
transcripts_2284	1,64	transcriptional regulator	1,54E-25
transcripts_5388	1,56	recombinase	1,58E-13

transcripts_1621	1,55	family transcriptional regulator	3,31E-11
transcripts_983	1,52	dead deah box helicase	2,17E-14
transcripts_1486	1,49	topoisomerase ii	9,47E-12
transcripts_3904	1,48	rna polymerase sigma factor	8,01E-07
transcripts_4113	1,47	transcriptional regulator	8,16E-14
transcripts_1597	1,41	family transcriptional regulator	6,27E-15
transcripts_4960	1,35	rna helicase	6,19E-09
transcripts_4129	1,34	transcriptional regulator	3,76E-11
transcripts_3612	1,33	rna polymerase sigma 70	3,84E-13
transcripts_997	1,31	family transcriptional regulator	2,02E-08
transcripts_1716	1,21	family transcriptional regulator	1,91E-08
transcripts_439	1,17	rna polymerase sigma factor	1,33E-09
transcripts_2080	1,15	transcriptional regulator	0,000134724
transcripts_4684	1,11	merR	1,47E-09
transcripts_1999	1,11	transcriptional regulator	1,84E-07
transcripts_1151	1,07	dead deah box helicase	2,44E-05
transcripts_2269	1,06	endoribonuclease	4,10E-11
transcripts_4849	1,03	rna helicase	1,87E-08
transcripts_1340	0,98	dna polymerase iii subunit gamma tau	2,90E-09
transcripts_2756	0,96	family transcriptional regulator	2,81E-09
transcripts_2755	0,96	family transcriptional regulator	7,63E-06

### Oxidative stress response

transcripts_2566	1,58	peroxidase	3,03E-14
transcripts_4495	1,56	glutaredoxin	4,53E-12
transcripts_363	1,53	thioredoxin reductase	1,51E-18
transcripts_5382	1,50	ferredoxin	1,50E-16
transcripts_4841	1,48	peroxiredoxin	2,42E-10
transcripts_293	1,47	2fe-2s ferredoxin	8,33E-07
transcripts_369	1,46	glutathione peroxidase	1,59E-07
transcripts_4492	1,42	alkyl hydroperoxide reductase	1,70E-21
transcripts_910	1,41	glutaredoxin	2,24E-16
transcripts_1058	1,34	thioredoxin	1,94E-09
transcripts_1982	1,31	alkyl hydroperoxide reductase	2,12E-12
transcripts_331	1,20	disulfide bond formation protein b	4,55E-05
transcripts_1874	1,17	s- glutathione dehydrogenase	1,41E-08
transcripts_795	1,17	thiol oxidoreductase	2,64E-09
transcripts_5025	1,12	rubredoxin	1,43E-08
transcripts_280	1,12	flavodoxin	0,000241968

transcripts_798	1,07	superoxide dismutase	6,52E-06
transcripts_1981	1,06	glutathione reductase	4,47E-11
transcripts_1064	1,03	riboflavin synthase subunit alpha	2,38E-05
transcripts_2230	1,02	glutathione peroxidase	1,87E-05
transcripts_3332	1,00	rubredoxin	2,56E-07
transcripts_2980	0,98	glutathione peroxidase	7,83E-07
transcripts_5158	0,96	thioredoxin	3,00E-06

### Electron transport chain

transcripts_329	1,84	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit i	2,64E-20
transcripts_3857	1,79	nadh:ubiquinone oxidoreductase subunit a	1,66E-20
transcripts_1267	1,78	succinate dehydrogenase	1,44E-15
transcripts_1269	1,76	succinate dehydrogenase	4,33E-18
transcripts_326	1,73	cytochrome c oxidase	1,06E-19
transcripts_3865	1,69	nadh:ubiquinone oxidoreductase subunit j	1,61E-17
transcripts_3858	1,66	nadh dehydrogenase subunit b	2,05E-14
transcripts_3869	1,48	nadh:ubiquinone oxidoreductase subunit n	2,23E-10
transcripts_3863	1,47	nadh:ubiquinone oxidoreductase	2,02E-11
transcripts_3868	1,45	nadh:ubiquinone oxidoreductase subunit m	1,33E-12
transcripts_3861	1,39	nadh dehydrogenase subunit f	5,09E-11
transcripts_3859	1,31	nadh-quinone oxidoreductase subunit c d	7,94E-09
transcripts_1394	1,26	cytochrome c biogenesis protein	1,28E-08
transcripts_3864	1,26	nadh dehydrogenase subunit i	1,88E-11
transcripts_3860	1,10	nadh dehydrogenase subunit e	1,65E-08
transcripts_3867	1,06	nadh:ubiquinone oxidoreductase subunit l	1,30E-06
transcripts_1328	1,01	cytochrome oxidase	4,31E-10
transcripts_3268	1,00	nadh-flavin reductase	7,82E-06
transcripts_5227	0,99	cytochrome c	9,04E-10
transcripts_2735	0,97	nadph:quinone reductase	0,010668465
transcripts_3209	0,96	nadph-dependent fnn reductase	1,87E-08

### Metal metabolism

transcripts_2942	2,69	metal-binding protein	2,65E-31
transcripts_4682	1,93	merP	1,68E-12
transcripts_4680	1,79	mercuric reductase	2,16E-20
transcripts_4681	1,77	merC	2,30E-11
transcripts_4683	1,75	merT	4,93E-24
transcripts_4705	1,62	copper oxidase	1,08E-17
transcripts_2583	1,48	metallothionein	4,46E-12

transcripts_1538	1,38	fe2+ zn2+ uptake regulation protein	1,38E-16
transcripts_153	1,31	copper oxidase	5,06E-07
transcripts_2109	1,21	nickel abc transporter atp-binding protein	2,84E-08
transcripts_4597	1,20	cobalt-precorrin-6x reductase	5,25E-12
transcripts_2114	0,99	nickel abc transporter substrate-binding protein	6,32E-06
transcripts_1779	0,97	zinc abc transporter permease	1,10E-06

### Metabolic Oxidoreductases

transcripts_1264	1,70	dihydrolipoamide dehydrogenase	3,84E-15
transcripts_394	1,58	malate:quinone oxidoreductase	2,53E-16
transcripts_1623	1,38	fad-dependent oxidoreductase	1,30E-20
transcripts_5252	1,25	oxidoreductase	0,00024474
transcripts_2726	1,21	pdr family oxidoreductase	1,25E-16
transcripts_1518	1,12	nitroreductase	9,34E-08
transcripts_2898	1,12	oxidoreductase	1,50E-05
transcripts_1378	1,11	nitrate reductase	6,82E-07
transcripts_3619	1,04	family oxidoreductase	0,000181625
transcripts_340	1,03	fe-s oxidoreductase	2,35E-08
transcripts_3402	1,01	fad-dependent oxidoreductase	1,52E-08
transcripts_3333	1,00	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	4,39E-11

### Chaperones

transcripts_4476	1,90	cold-shock protein	9,76E-24
transcripts_292	1,77	assembly protein	1,03E-21
transcripts_294	1,66	chaperone protein	1,19E-14
transcripts_295	1,58	co-chaperone	8,48E-14
transcripts_192	1,50	cold-shock protein	5,04E-14
transcripts_4270	1,45	molecular chaperone	2,30E-11
transcripts_5133	1,40	molecular chaperone	2,29E-20
transcripts_4069	1,39	molecular chaperone	2,02E-11
transcripts_4300	1,39	iron--sulfur cluster insertion protein	6,39E-10
transcripts_111	1,33	protein-disulfide isomerase	8,61E-10
transcripts_3765	1,05	cold shock protein	4,13E-10

### Horizontal gene transfer

transcripts_1202	1,98	conjugal transfer protein	2,37E-23
transcripts_2458	1,30	transposase	3,26E-15
transcripts_4306	1,30	transposase	1,45E-13
transcripts_1865	1,20	transposase	2,60E-06

transcripts_4688	1,20	transposase	8,08E-05
transcripts_1902	1,09	integrating conjugative element protein	1,22E-08
transcripts_543	1,08	pilus assembly protein	5,81E-08
transcripts_4372	1,08	pilus assembly protein	4,94E-07
transcripts_4025	1,02	pilus assembly protein	2,35E-12

---

### **Sulphur metabolism**

transcripts_298	1,88	cysteine desulfurase	2,78E-16
transcripts_909	1,50	sulfurtransferase	6,24E-27
transcripts_3593	1,32	sam-dependent methyltransferase	7,87E-12
transcripts_4111	1,27	cysteine synthase	1,12E-09
transcripts_62	1,26	sam-dependent methyltransferase	1,93E-11
transcripts_3848	1,11	sulfite reductase	2,11E-09
transcripts_4634	1,10	sam-dependent methyltransferase	3,13E-10
transcripts_789	1,04	sam-dependent methyltransferase	1,94E-09

---

### **SOS response**

transcripts_3029	1,75	dna mismatch repair protein	3,03E-14
transcripts_1845	1,13	excinuclease abc subunit c	3,52E-08
transcripts_1897	1,10	dna repair protein	1,36E-08
transcripts_101	1,09	dna repair protein -gpd	1,67E-08
transcripts_4994	1,07	dna mismatch repair protein	1,95E-13

---

### **Antibiotic resistance**

transcripts_1784	1,48	antibiotic synthesis protein	2,06E-09
transcripts_5143	1,08	penicillin-binding protein 1b	1,80E-07
transcripts_4454	0,96	beta-lactamase	3,05E-06

---

### **Heme metabolism**

transcripts_325	1,76	protoheme ix farnesyltransferase	3,16E-20
transcripts_1393	1,06	heme exporter protein	5,04E-14

---

### **Others**

transcripts_4857	2,60	membrane protein	1,39E-33
transcripts_419	2,45	ribose-phosphate pyrophosphokinase	1,87E-18
transcripts_3527	1,75	membrane protein	3,50E-17
transcripts_150	1,59	phosphoribosylformylglycinamide synthase	9,27E-15
transcripts_3620	1,38	nucleoside-triphosphate diphosphatase	3,62E-07

transcripts_2901	1,34	colicin v production	9,35E-19
transcripts_550	1,26	fmn adenylyltransferase	1,50E-16
transcripts_359	1,18	membrane protein	1,24E-08
transcripts_4573	1,15	membrane protein	1,29E-08
transcripts_1545	1,10	membrane protein	4,36E-11
transcripts_3614	1,08	membrane protein	2,86E-09
transcripts_3965	1,00	outer membrane lipoprotein	0,000103305

### Hypothetical protein

transcripts_3221	2,05	hypothetical protein	5,78E-26
transcripts_2962	1,72	hypothetical protein	7,11E-10
transcripts_4690	1,72	MULTISPECIES: hypothetical protein	3,00E-20
transcripts_2465	1,70	hypothetical protein	5,84E-17
transcripts_3526	1,68	hypothetical protein	5,29E-19
transcripts_2241	1,25	hypothetical protein	1,16E-11
transcripts_994	1,23	hypothetical protein	3,01E-08
transcripts_4781	1,22	hypothetical protein	1,20E-12

**Tabla 12. Genes reprimidos diferencialmente en tratamiento con mercurio en ATH-43.**

Transcript ID	Log(2)FC	Predicted function	p value adjusted
<b>Transcription</b>			
transcripts_668	-2,96	ribosomal subunit interface protein	3,93E-10
transcripts_4075	-2,18	family transcriptional regulator	0,006457595
transcripts_3647	-2,00	family transcriptional regulator	0,005471522
transcripts_4216	-1,97	rna polymerase sigma factor	0,005028319
transcripts_3255	-1,91	16s rna methyltransferase	0,007204411
transcripts_2691	-1,72	family transcriptional regulator	0,009072434
transcripts_177	-1,60	rna polymerase subunit sigma-24	0,009070745
transcripts_4238	-1,45	family transcriptional regulator	0,007876187
transcripts_1765	-0,93	transcriptional regulator	0,007861944
<b>Transport</b>			
transcripts_3265	-2,22	glycine betaine abc transporter substrate-binding protein	0,012994289
transcripts_489	-2,19	major facilitator transporter	0,012301977
transcripts_1027	-2,18	lipid transporter atp-binding permease	0,009486038

transcripts_3211	-2,10	mfs transporter permease	0,009103594
transcripts_2832	-2,08	ammonium transporter	0,010668818
transcripts_2741	-2,02	mfs transporter	0,015802515
transcripts_1718	-1,99	porin	0,018390261
transcripts_1853	-1,94	abc transporter substrate-binding protein	0,009103594
transcripts_169	-1,78	sugar abc transporter permease	0,007473962
transcripts_3969	-1,77	abc transporter	0,009887117
transcripts_423	-1,71	transporter	0,014511471
transcripts_673	-1,62	sugar abc transporter substrate-binding protein	8,64E-15
transcripts_3544	-1,62	rnd transporter	0,005471522
transcripts_182	-1,34	amino acid apc transporter	0,016848696
transcripts_2324	-1,03	abc transporter substrate-binding protein	1,24E-06
transcripts_4980	-1,03	abc transporter	0,020114062

### Electron transport chain

transcripts_863	-2,36	cytochrome c biogenesis protein	0,008417682
transcripts_4496	-1,91	dehydrogenase	0,009461564
transcripts_1325	-1,91	cytochrome cbb3	0,005141677
transcripts_328	-1,58	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit i	0,012263316
transcripts_1323	-1,55	cbb3-type cytochrome c oxidase subunit ii	0,010771147
transcripts_1324	-1,29	cytochrome c oxidase	0,012301977
transcripts_4379	-1,25	electron transporter	0,011143367
transcripts_1390	-1,11	cytochrome c biogenesis protein	0,009890899
transcripts_2884	-0,99	cytochrome b561	0,011745092
transcripts_1978	-0,95	cytochrome c	0,011648418

### Metal metabolism

transcripts_491	-2,22	chromate transporter	0,001891093
transcripts_4494	-1,14	bacterioferritin	0,002911937

### Aminoacid metabolism

transcripts_184	-3,10	ornithine carbamoyltransferase	0,000868413
transcripts_185	-2,48	carbamate kinase	6,21E-07
transcripts_2325	-2,26	glutamine synthetase	1,16E-06
transcripts_183	-2,25	arginine deiminase	3,80E-06
transcripts_1257	-2,19	thioesterase	0,000416004
transcripts_10	-2,18	pii uridylyl-transferase	2,39E-13
transcripts_4708	-2,09	cystathionine gamma-lyase	0,024936524
transcripts_3127	-1,97	nad transhydrogenase	0,001246638



transcripts_2725	-1,93	amidohydrolase	0,045613196
transcripts_3570	-1,80	threonine dehydratase	5,10E-10
transcripts_3190	-1,78	cobalamin biosynthesis protein	0,000223626
transcripts_1096	-1,75	udp-n-acetylmuramate:l-alanyl-gamma-d-glutamyl-meso-diaminopimelate ligase	0,004725253
transcripts_1135	-1,72	thiamine-phosphate pyrophosphorylase	6,66E-06
transcripts_3227	-1,67	trna uridine 5-carboxymethylaminomethyl modification protein	0,000613956
transcripts_1295	-1,52	peptide synthase	0,025694474
transcripts_4154	-1,41	asparaginase	0,001249177
transcripts_962	-1,29	atp-dependent protease subunit	0,00303375
transcripts_2143	-1,25	thiamine pyrophosphate-binding protein	9,47E-07
transcripts_3779	-1,02	gamma-glutamylputrescine oxidoreductase	0,001108701
transcripts_2505	-0,95	ecotin	4,76E-06
transcripts_1595	-0,93	amidase	6,12E-08

### Carbohydrates metabolism

transcripts_2696	-2,10	glucose dehydrogenase	0,002034286
transcripts_4878	-2,05	5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate isomerase	9,68E-14
transcripts_1821	-1,98	maltose mannitol abc transporter substrate-binding protein	5,65E-07
transcripts_3135	-1,95	aldehyde-activating protein	0,008410322
transcripts_2742	-1,95	2-dehydro-3-deoxygluconokinase	0,017305807
transcripts_3976	-1,83	glycosyl transferase family 1	0,029820658
transcripts_47	-1,79	sugar dehydrogenase	5,98E-07
transcripts_2307	-1,74	polysaccharide biosynthesis protein	0,016628729
transcripts_163	-1,70	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	0,033320423
transcripts_3911	-1,70	maltooligosyl trehalose synthase	0,025329503
transcripts_4325	-1,48	adp-ribosylglycohydrolase	0,041246849
transcripts_1799	-1,46	ethanol-active dehydrogenase acetaldehyde-active reductase	0,000359137
transcripts_1691	-1,06	glyoxalase	0,023589832
transcripts_3397	-1,03	aldehyde dehydrogenase	6,87E-06

### Lipid metabolism

transcripts_186	-2,43	acetyl- carboxylase	0,00462785
transcripts_2302	-2,17	lipopolysaccharide biosynthesis protein	0,004694854
transcripts_1128	-1,97	apolipoprotein n-acyltransferase	0,00430906
transcripts_2075	-1,75	lipoprotein	5,11E-12
transcripts_4235	-1,61	acyl- dehydrogenase	0,005202217
transcripts_2801	-1,27	3-ketoacyl- thiolase	0,003944096

transcripts_2818	-1,20	lipoprotein	0,004057821
transcripts_1648	-1,16	acetyl- acetyltransferase	0,004762838

### **Nucleotide metabolism**

transcripts_2011	-2,24	amp-dependent synthetase	0,003751271
transcripts_2785	-2,06	soluble pyridine nucleotide transhydrogenase	0,003975063
transcripts_5348	-1,86	adenine glycosylase	0,004371234
transcripts_3251	-1,78	3-methyladenine dna glycosylase	0,003405534
transcripts_2799	-1,73	dna topoisomerase i	0,004423003
transcripts_3502	-1,12	dna-binding protein	0,004504203

### **Chaperones**

transcripts_846	-1,76	dsba oxidoreductase	0,002371026
transcripts_2983	-1,61	heat shock protein	3,86E-06
transcripts_535	-1,28	protein disaggregation chaperone	0,009072434
transcripts_2918	-1,00	heat-shock protein	7,16E-05

### **Flagellar**

transcripts_1411	-1,65	flagellar biosynthesis protein	0,00254078
transcripts_1437	-1,03	flagellin	0,003492252

### **Horizontal gene transfer**

transcripts_4595	-1,71	plasmid maintenance protein	0,001175342
transcripts_5233	-1,70	transposase for transposon tn21	0,001822014
transcripts_846	-1,76	dsba oxidoreductase	0,002371026
transcripts_2983	-1,61	heat shock protein	3,86E-06
transcripts_535	-1,28	protein disaggregation chaperone	0,009072434
transcripts_2918	-1,00	heat-shock protein	7,16E-05

### **Antibiotic resistance**

transcripts_2721	-1,40	bicyclomycin resistance protein	0,00189468
transcripts_1443	-1,03	cephalosporin hydroxylase	0,001739182

### **Others**

transcripts_1758	-2,15	chemotaxis protein	9,02E-28
transcripts_2471	-2,11	heme utilization protein	1,82E-24
transcripts_3938	-2,10	cbs domain-containing protein	9,55E-18
transcripts_716	-2,10	atpase	5,69E-16

transcripts_3702	-1,94	protein singed	0,000270038
transcripts_2240	-1,93	hypothetical protein	0,000112194
transcripts_366	-1,91	chemotaxis protein	5,40E-14
transcripts_928	-1,90	histidine utilization protein	0,000737717
transcripts_1131	-1,85	atp-binding protein	0,000775117
transcripts_623	-1,68	membrane protein	0,000839723
transcripts_5157	-1,64	exopolyphosphatase	0,001001571
transcripts_1626	-1,57	hypothetical protein	0,00102222
transcripts_3972	-1,52	type iv secretion protein rhs	0,000853076
transcripts_2775	-1,46	chromosome partitioning protein	0,000908103
transcripts_5321	-1,28	universal stress protein	0,000447228
transcripts_5344	-1,08	polyphosphate kinase	0,00108551
transcripts_1331	-0,94	membrane protein	0,001267203
transcripts_1793	-0,93	hypothetical protein PMI38_05079	0,001621957
transcripts_2686	-0,93	stress protein	0,001746449
transcripts_3276	-0,92	luciferase family protein	0,001639464
transcripts_3705	-0,92	hypothetical protein	0,000745854
transcripts_1749	-0,92	family protein	4,28E-19

**Tabla 13. Genes expresados diferencialmente en tratamiento con telurito en ATH-43.**

Transcript ID	Log(2)FC	Predicted function	p value adjusted
<b>Translation</b>			
transcripts_5049	1,59	30s ribosomal protein s8	2,76398E-05
transcripts_117	1,49	16s rna-processing protein	3,41565E-05
transcripts_742	1,45	30s ribosomal protein s9	4,20329E-05
transcripts_5050	1,44	30s ribosomal protein s14	9,10039E-05
transcripts_5046	1,35	30s ribosomal protein s5	0,000456324
transcripts_4487	1,35	argininosuccinate synthase	0,000353302
transcripts_115	1,33	50s ribosomal protein l19	0,000529764
transcripts_5053	1,32	50s ribosomal protein l14	0,000371774
transcripts_456	1,30	50s ribosomal protein l21	0,000390454
transcripts_5056	1,30	50s ribosomal protein l16	0,000678538
transcripts_741	1,25	50s ribosomal protein l13	0,000914053
transcripts_5102	1,22	23s rna methyltransferase	0,001202806
transcripts_5054	1,21	30s ribosomal protein s17	0,001088084
transcripts_5047	1,20	50s ribosomal protein l18	0,001672846
transcripts_5044	1,18	50s ribosomal protein l15	0,007485114
<b>Transport</b>			
transcripts_2781	1,33	abc transporter	0,000422355
transcripts_1971	1,22	molybdenum abc transporter permease	0,000676265
transcripts_216	1,22	abc transporter atp-binding protein	0,001144336
transcripts_2760	1,19	abc transporter atp-binding protein	6,99132E-09
transcripts_5100	1,16	mfs transporter	0,000291174
<b>Transcription</b>			
transcripts_1999	1,77	transcriptional regulator	5,53841E-07
transcripts_3612	1,58	rna polymerase sigma 70	3,38562E-05
transcripts_2852	1,38	rna polymerase sigma factor	0,000317849
transcripts_3756	1,29	family transcriptional regulator	0,000907528
transcripts_2653	1,28	family transcriptional regulator	0,0006173
transcripts_3374	1,25	family transcriptional regulator	0,00177821
transcripts_2054	1,20	family transcriptional regulator	0,002863833
transcripts_1622	1,19	transcriptional regulator	0,005918453
transcripts_3573	1,16	rna pyrophosphohydrolase	0,006271668
transcripts_3960	1,15	family transcriptional regulator	0,007309596

### **Oxidative stress response**

transcripts_3156	1,70	thiol:disulfide interchange protein	7,04652E-08
transcripts_1638	1,31	glutathione s-transferase	0,000573026
transcripts_4493	1,22	(2fe-2s)-binding protein	0,001376325
transcripts_369	1,21	glutathione peroxidase	0,001256479
transcripts_1874	1,19	s- glutathione dehydrogenase	1,84482E-05
transcripts_5382	1,18	ferredoxin	0,000823157
transcripts_4492	1,18	alkyl hydroperoxide reductase	0,005058164
transcripts_3961	1,17	universal stress protein	1,02972E-06
transcripts_3504	1,16	glutathione s-transferase	0,006329015

### **Electron transport chain**

transcripts_326	1,41	cytochrome c oxidase	2,95615E-10
transcripts_1878	1,30	nadh dehydrogenase	0,000760851
transcripts_744	1,29	cytochrome b	1,36932E-11
transcripts_1394	1,25	cytochrome c biogenesis protein	0,00115017
transcripts_3222	1,25	atp synthase f0f1 subunit a	0,000824981
transcripts_3157	1,23	cytochrome c ubiquinone menaquinone biosynthesis	0,001750432
transcripts_952	1,22	methyltransferase	0,000986949
transcripts_329	1,22	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit i	0,002689902
transcripts_3215	1,20	atp synthase f0f1 subunit epsilon	0,00216873
transcripts_1388	1,20	cytochrome c	9,94889E-15
transcripts_3863	1,20	nadh:ubiquinone oxidoreductase	0,002604261
transcripts_5227	1,16	cytochrome c	0,004112485

### **Metal metabolism**

transcripts_4705	1,30	copper oxidase	0,000216231
transcripts_2942	1,27	metal-binding protein	0,00132008
transcripts_4682	1,16	merP	0,000926175
transcripts_2583	1,15	metallothionein	0,000852757

### **Metabolic Oxidoreductases**

transcripts_1264	1,28	dihydrolipoamide dehydrogenase	0,000491464
transcripts_1051	1,21	nad-dependent dehydratase	0,001292437
transcripts_1267	1,17	succinate dehydrogenase	0,006064469

### **Cold shock proteins and chaperones**

transcripts_4476	1,31	cold-shock protein	0,000411272
transcripts_3765	1,24	cold shock protein	5,5638E-05
transcripts_192	1,23	cold-shock protein	5,82872E-06
transcripts_2918	1,15	heat-shock protein	0,001635712

### Horizontal gene transfer

transcripts_2458	2,24	transposase	4,86635E-11
transcripts_1467	1,62	pilus assembly protein	2,25443E-09
transcripts_5388	1,60	recombinase	2,2068E-05
transcripts_820	1,23	pilus assembly protein	0,001485553
transcripts_4688	1,22	transposase	0,002669657

### Sulphur metabolism

transcripts_729	1,71	sulfate adenylyltransferase subunit 2	2,11994E-06
transcripts_4911	1,23	cysteine synthase	0,001138776
transcripts_4111	1,18	cysteine synthase	0,005149821
transcripts_2912	1,18	sam-dependent methyltransferase	0,00570047
transcripts_3848	1,16	sulfite reductase	8,99686E-05

### SOS response

transcripts_3029	1,20	dna mismatch repair protein	8,36509E-05
------------------	------	-----------------------------	-------------

### Heme metabolism

transcripts_1335	1,17	coproporphyrinogen iii oxidase	0,005508946
transcripts_1393	1,16	heme exporter protein	0,006263712

### Others

transcripts_4766	1,67	trigger factor	5,972E-06
transcripts_1478	1,65	dna-binding protein	4,43865E-06
transcripts_5361	1,61	3-hydroxyacyl- <i>acp</i> dehydratase	2,6732E-05
transcripts_1197	1,42	cation:proton antiporter	0,000114121
transcripts_1441	1,41	beta-ketoacyl- <i>acp</i> synthase	0,000182525
transcripts_1432	1,39	atpase <i>aaa</i>	0,000192762
transcripts_3366	1,32	secreted protein	0,000697162
transcripts_2601	1,28	cytoplasmic protein	0,000796975
transcripts_2901	1,23	colicin v production	0,001786564
transcripts_4767	1,22	atp-dependent <i>clp</i> protease proteolytic subunit	0,001210837
transcripts_3355	1,22	orotate phosphoribosyltransferase	6,19104E-14

transcripts_4435	1,20	atp-dependent helicase	7,23973E-08
transcripts_2157	1,19	ornithine cyclodeaminase	0,002366433
transcripts_1252	1,18	3-oxoacyl- <i>acp</i> synthase	0,005212145

---

### **Hypothetical protein**

transcripts_5235	1,94	pf01934 family protein	1,22954E-07
transcripts_3057	1,49	hypothetical protein	2,82137E-05
transcripts_3902	1,41	conserved hypothetical protein	0,000144713
transcripts_431	1,36	hypothetical protein	0,000186709
transcripts_2596	1,35	hypothetical protein	0,00039973
transcripts_3945	1,32	hypothetical protein	0,000279618
transcripts_3692	1,30	hypothetical protein	0,000598895
transcripts_4307	1,25	hypothetical protein	0,000658251
transcripts_5343	1,20	hypothetical protein	0,003221684
transcripts_2060	1,19	hypothetical protein	0,000993813
transcripts_347	1,19	hypothetical protein	0,00488191
transcripts_465	1,18	hypothetical protein	0,001753069
transcripts_377	1,16	hypothetical protein	0,000363398

---

**Tabla 14. Genes reprimidos diferencialmente en tratamiento con telurito en ATH-43.**

Transcript ID	Log(2)FC	Predicted function	p value adjusted
<b>Transcription</b>			
transcripts_4238	-0,69	family transcriptional regulator	0,006907632
transcripts_4439	-0,61	rna polymerase-associated protein	0,022609569
transcripts_3677	-0,59	family transcriptional regulator	0,013722516
transcripts_4075	-0,52	family transcriptional regulator	0,034682068
<b>Transport</b>			
transcripts_2010	-0,63	porin	0,006512205
transcripts_3544	-0,61	rnd transporter	0,011781617
transcripts_69	-0,52	rnd transporter	0,006584458
transcripts_1552	-0,52	mfs transporter	0,014983556
<b>Aminoacid metabolism</b>			
transcripts_2143	-0,72	thiamine pyrophosphate-binding protein	0,036610331
transcripts_799	-0,68	amino acid transporter	0,04443916
transcripts_2325	-0,64	glutamine synthetase	0,048369213
transcripts_928	-0,57	histidine utilization protein	0,048645316
transcripts_1745	-0,55	leucyl-trna synthetase	0,048776785
transcripts_1295	-0,49	peptide synthase	0,047267517
<b>Carbohydrates metabolism</b>			
transcripts_47	-0,60	sugar dehydrogenase	0,011781617
transcripts_4325	-0,60	adp-ribosylglycohydrolase	0,006512205
transcripts_3911	-0,59	maltooligosyl trehalose synthase binding-protein-dependent maltose	0,006584458
transcripts_1823	-0,53	mannitol transporter	0,008896402
transcripts_3773	-0,50	sugar abc transporter atpase	0,006584458
<b>Nucleotide metabolism</b>			
transcripts_1937	-0,52	cytosine deaminase	0,006584458
<b>Chaperones</b>			
transcripts_2983	-0,94	heat shock protein	0,034682068



## Flagellar

transcripts_3443	-0,74	flagellar motor protein	0,048645316
------------------	-------	-------------------------	-------------

---

## Horizontal gene transfer

transcripts_4595	-0,50	plasmid maintenance protein	0,048645316
------------------	-------	-----------------------------	-------------

---

## Antibiotic resistance

transcripts_1011	-0,50	subfamily drug resistance transporter	0,048645316
------------------	-------	---------------------------------------	-------------

---

## Others

transcripts_2081	-0,96	kinase	0,013722516
transcripts_3705	-0,77	hypothetical protein	0,019888519
transcripts_2077	-0,71	hypothetical protein	0,047267517
transcripts_3684	-0,67	hypothetical protein	0,019986924
transcripts_2838	-0,67	histidine kinase	0,02148505
transcripts_1893	-0,59	membrane protein	0,036610331
transcripts_2442	-0,57	histidine kinase	0,019410657
transcripts_4379	-0,57	electron transporter	0,023196578
transcripts_2345	-0,57	phosphoribosyl-dephospho- transferase	0,036610331
transcripts_130	-0,57	tps family activation secretion protein	0,034682068
transcripts_1626	-0,56	hypothetical protein	0,03380077
transcripts_137	-0,56	general secretion pathway protein	0,037478603
transcripts_4975	-0,55	agmatinase	0,03380077
transcripts_2476	-0,55	methyl-accepting chemotaxis protein	0,034682068
transcripts_1687	-0,52	hypothetical protein	0,040308833
transcripts_5157	-0,51	exopolyphosphatase	0,048645316
transcripts_2849	-0,50	uroporphyrin-iii c-methyltransferase	0,036610331
transcripts_366	-0,49	chemotaxis protein	0,036610331
transcripts_1691	-0,70	glyoxalase	6,57265E-05
transcripts_919	-0,65	fe-s-oxidoreductase	8,23875E-05
transcripts_4450	-0,65	fad dependent oxidoreductase	0,006584458
transcripts_1715	-0,48	oxidoreductase	0,006907632

---

**Tabla 15. Genes expresados diferencialmente en tratamiento con mercurio/telurito en ATH-43.**

Transcript ID	Log(2)FC	Predicted function	p value adjusted
<b>Translation</b>			
transcripts_552	2,88	30s ribosomal protein s20	7,3E-75
transcripts_5049	2,11	30s ribosomal protein s8	2,7E-13
transcripts_118	2,10	30s ribosomal protein s16	1,2E-28
transcripts_5046	2,06	30s ribosomal protein s5	4,8E-28
transcripts_5047	2,05	50s ribosomal protein l18	5,4E-23
transcripts_456	1,97	50s ribosomal protein l21	9,5E-11
transcripts_5056	1,95	50s ribosomal protein l16	3,8E-29
transcripts_3760	1,93	50s ribosomal protein l20	8,1E-22
transcripts_3393	1,90	50s ribosomal protein l28	5,5E-14
transcripts_8	1,89	30s ribosomal protein s2	9,1E-13
transcripts_7	1,89	elongation factor ts	8,1E-08
transcripts_742	1,89	30s ribosomal protein s9	1,6E-09
transcripts_5054	1,85	30s ribosomal protein s17	1,6E-10
transcripts_5064	1,85	30s ribosomal protein s10	8,3E-24
transcripts_5050	1,84	30s ribosomal protein s14	1,9E-14
transcripts_5053	1,84	50s ribosomal protein l14	2,0E-24
transcripts_5044	1,84	50s ribosomal protein l15	2,6E-08
transcripts_5039	1,83	30s ribosomal protein s4	7,3E-13
transcripts_5040	1,80	30s ribosomal protein s11	2,2E-09
transcripts_741	1,80	50s ribosomal protein l13	4,6E-07
transcripts_5058	1,80	50s ribosomal protein l22	6,9E-08
transcripts_5041	1,79	30s ribosomal protein s13	2,0E-12
transcripts_5068	1,79	30s ribosomal protein s7	3,9E-07
transcripts_115	1,78	50s ribosomal protein l19	8,0E-07
transcripts_4487	1,65	argininosuccinate synthase	1,9E-05
transcripts_5066	1,64	elongation factor tu	2,4E-12
transcripts_5111	1,62	ribosome-binding factor a	3,7E-18
transcripts_109	1,57	threonine synthase	1,9E-16
transcripts_3759	1,55	phenylalanyl-trna synthetase	7,4E-11
transcripts_244	1,44	glutamyl-trna amidotransferase	9,3E-04
transcripts_3631	1,44	arginyl-trna synthetase	1,3E-08
transcripts_771	1,37	n-acetylglutamate synthase	1,3E-04
transcripts_316	1,30	selenophosphate synthetase	1,1E-05
transcripts_3843	1,26	methionine synthase	1,1E-11

## Transport

transcripts_4691	1,84	porin	2,8E-16
transcripts_1018	1,70	proline:sodium symporter	3,0E-09
transcripts_1496	1,36	abc transporter	5,5E-08
transcripts_941	1,32	peptide abc transporter atp-binding protein	8,9E-09
transcripts_2760	1,32	abc transporter atp-binding protein	4,3E-03
transcripts_2723	1,31	nitrate abc transporter atpase	9,7E-04
transcripts_5137	1,29	abc transporter substrate-binding protein	6,5E-11
transcripts_5200	1,27	abc transporter substrate-binding protein	5,7E-07
transcripts_1702	1,16	abc transporter	1,3E-08

## Transcription

transcripts_3207	2,04	family transcriptional regulator	6,7E-11
transcripts_2987	1,78	rna helicase	2,3E-07
transcripts_1622	1,64	transcriptional regulator	7,0E-09
transcripts_983	1,60	dead deah box helicase	7,4E-07
transcripts_2852	1,59	rna polymerase sigma factor	2,8E-06
transcripts_1999	1,53	transcriptional regulator	5,4E-24
transcripts_4684	1,40	merR	3,0E-06
transcripts_1873	1,39	regulator	8,4E-08
transcripts_4960	1,33	rna helicase	1,2E-08
transcripts_3328	1,32	transcriptional regulator	5,8E-13
transcripts_1010	1,31	rna helicase	2,6E-09
transcripts_3386	1,30	transcriptional regulator	4,7E-19
transcripts_275	1,29	rna polymerase subunit sigma-24	4,6E-10
transcripts_1151	1,29	dead deah box helicase	7,2E-15
transcripts_222	1,28	rna polymerase factor sigma-54	3,1E-13
transcripts_439	1,27	rna polymerase sigma factor	3,8E-10
transcripts_1159	1,26	family transcriptional regulator	1,2E-12
transcripts_2929	1,26	family transcriptional regulator	6,8E-06
transcripts_4403	1,24	family transcriptional regulator	1,9E-03
transcripts_3960	1,24	family transcriptional regulator	8,9E-07

## Oxidative stress response

transcripts_1982	1,83	alkyl hydroperoxide reductase	7,2E-11
transcripts_363	1,65	thioredoxin reductase	1,7E-06
transcripts_5382	1,58	ferredoxin	1,8E-09
transcripts_4841	1,58	peroxiredoxin	1,3E-08

transcripts_5158	1,55	thioredoxin	3,1E-05
transcripts_2566	1,54	peroxidase	2,0E-16
transcripts_910	1,51	glutaredoxin	1,7E-05
transcripts_220	1,50	organic solvent tolerance protein	1,4E-13
transcripts_4492	1,49	alkyl hydroperoxide reductase	6,7E-12
transcripts_1026	1,40	toluene tolerance protein	2,2E-04
transcripts_1058	1,39	thioredoxin	5,9E-12
transcripts_4495	1,35	glutaredoxin	1,2E-08
transcripts_293	1,34	2fe-2s ferredoxin	3,2E-12
transcripts_2995	1,33	organic hydroperoxide resistance protein	1,8E-08
transcripts_3156	1,33	thiol:disulfide interchange protein	1,5E-06
transcripts_4617	1,30	thiol:disulfide interchange protein	1,3E-14
transcripts_369	1,27	glutathione peroxidase	3,3E-03
transcripts_798	1,26	superoxide dismutase	1,8E-06
transcripts_1064	1,23	riboflavin synthase subunit alpha	5,7E-06
transcripts_5374	1,23	s- glutathione dehydrogenase	2,7E-03
transcripts_1981	1,20	glutathione reductase	1,6E-07
transcripts_3332	1,17	rubredoxin	4,2E-15
transcripts_2230	1,17	glutathione peroxidase	1,1E-15
transcripts_795	1,14	thiol oxidoreductase	2,1E-02
transcripts_584	1,13	ferredoxin-nadp reductase	9,5E-08
transcripts_969	1,11	glutathione synthetase	6,1E-10
transcripts_4007	1,11	dsba oxidoreductase	2,9E-08
transcripts_2980	1,09	glutathione peroxidase	1,1E-05

### Electron transport chain

transcripts_3220	1,77	atp synthase subunit b	1,5E-17
transcripts_326	1,77	cytochrome c oxidase	6,5E-07
transcripts_329	1,77	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit i	2,7E-07
transcripts_3858	1,64	nadh dehydrogenase subunit b	3,8E-06
transcripts_3857	1,62	nadh:ubiquinone oxidoreductase subunit a	1,3E-14
transcripts_3863	1,61	nadh:ubiquinone oxidoreductase	2,4E-17
transcripts_3862	1,59	nadh dehydrogenase subunit g	3,6E-24
transcripts_3860	1,56	nadh dehydrogenase subunit e	1,8E-10
transcripts_3859	1,53	nadh-quinone oxidoreductase subunit c d	8,0E-07
transcripts_3866	1,46	nadh-quinone oxidoreductase subunit k	1,4E-13
transcripts_1394	1,36	cytochrome c biogenesis protein	3,0E-07
transcripts_3867	1,35	nadh:ubiquinone oxidoreductase subunit l	1,6E-07
transcripts_1878	1,27	nadh dehydrogenase	3,0E-08

transcripts_803	1,15	nadh:flavin oxidoreductase	1,3E-07
-----------------	------	----------------------------	---------

### Metal metabolism

transcripts_2942	2,44	metal-binding protein	2,4E-52
transcripts_4682	2,15	merP	6,3E-20
transcripts_4683	2,00	merT	3,7E-20
transcripts_4680	1,81	mercuric reductase	3,4E-07
transcripts_4681	1,65	merC	6,5E-15
transcripts_3580	1,62	heavy metal translocating p-type atpase	7,3E-13
transcripts_4705	1,49	copper oxidase	4,9E-08
transcripts_5347	1,39	iron transporter	3,0E-07
transcripts_2454	1,38	cobalt transporter	1,2E-09
transcripts_484	1,37	nickel resistance protein	5,1E-04
transcripts_2108	1,31	nickel abc transporter atp-binding protein	6,1E-09
transcripts_2817	1,31	molybdopterin biosynthesis protein b	5,4E-09
transcripts_5140	1,30	iron abc transporter	2,7E-07
transcripts_3169	1,30	metal abc transporter permease	3,9E-14
transcripts_2583	1,26	metallothionein	1,9E-07
transcripts_153	1,26	copper oxidase	1,0E-10
transcripts_3061	1,24	tellurite resistance protein	4,0E-07
transcripts_4499	1,23	iron abc transporter atp-binding protein metal abc transporter substrate-binding protein	3,4E-11
transcripts_1780	1,21	nickel abc transporter atp-binding protein	8,2E-06
transcripts_2109	1,18	nickel abc transporter atp-binding protein	8,2E-03
transcripts_4597	1,17	cobalt-precorrin-6x reductase	4,9E-07
transcripts_4709	1,14	metal-binding protein	1,6E-05
transcripts_1971	1,11	molybdenum abc transporter permease	7,8E-07
transcripts_2111	1,11	nickel transporter permease	5,0E-04

### Metabolic Oxidoreductases

transcripts_1269	1,68	succinate dehydrogenase	2,5E-20
transcripts_1264	1,65	dihydrolipoamide dehydrogenase	2,0E-24
transcripts_5252	1,32	oxidoreductase	3,0E-09
transcripts_2360	1,30	fe-s oxidoreductase	9,6E-11
transcripts_340	1,30	fe-s oxidoreductase	1,2E-17
transcripts_1031	1,26	fad-dependent oxidoreductase pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	1,1E-03
transcripts_3333	1,22	oxidoreductase	1,5E-06
transcripts_2898	1,21	oxidoreductase	2,6E-06
transcripts_280	1,17	flavodoxin	2,9E-06

transcripts_3402	1,15	fad-dependent oxidoreductase	2,9E-10
transcripts_1518	1,14	nitroreductase	1,2E-02
transcripts_4202	1,14	pyruvate dehydrogenase	3,0E-02
transcripts_1623	1,11	fad-dependent oxidoreductase	5,3E-06
transcripts_1282	1,08	electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase	2,3E-04

### **Cold shock proteins and chaperones**

transcripts_296	1,77	iron-sulfur cluster assembly protein	4,5E-09
transcripts_4476	1,68	cold-shock protein	7,2E-09
transcripts_294	1,59	chaperone protein	1,8E-04
transcripts_5133	1,52	molecular chaperone	3,7E-22
transcripts_192	1,46	cold-shock protein	1,6E-09
transcripts_4300	1,40	iron--sulfur cluster insertion protein	5,9E-04
transcripts_3765	1,29	cold shock protein	1,9E-09
transcripts_64	1,24	cold-shock protein	3,5E-06
transcripts_4069	1,22	molecular chaperone	1,1E-06
transcripts_331	1,20	disulfide bond formation protein b	5,5E-08

### **Horizontal gene transfer**

transcripts_1202	1,71	conjugal transfer protein	4,3E-06
transcripts_289	1,37	pilus assembly protein	8,8E-12
transcripts_1467	1,36	pilus assembly protein	2,7E-14
transcripts_4688	1,33	transposase	1,8E-08
transcripts_2458	1,29	transposase	6,1E-07
transcripts_4025	1,21	pilus assembly protein	9,8E-05
transcripts_5225	1,10	transposase	2,7E-07

### **Sulphur metabolism**

transcripts_298	1,67	cysteine desulfurase	4,3E-05
transcripts_3848	1,54	sulfite reductase	1,7E-21
transcripts_62	1,51	sam-dependent methyltransferase	5,3E-05
transcripts_1783	1,50	thioesterase	1,5E-06
transcripts_4111	1,29	cysteine synthase	2,1E-08
transcripts_1743	1,21	sam-dependent methyltransferase	3,3E-09
transcripts_4911	1,17	cysteine synthase	1,2E-05

### **SOS response**

transcripts_3029	1,60	dna mismatch repair protein	1,5E-05
------------------	------	-----------------------------	---------

transcripts_5308	1,35	dna repair protein	1,2E-08
transcripts_4994	1,14	dna mismatch repair protein	5,8E-05

### Antibiotic resistance

transcripts_843	1,60	multidrug transporter	1,1E-08
transcripts_844	1,43	antibiotic transporter	2,1E-04
transcripts_1167	1,20	multidrug transporter	1,8E-06
transcripts_4454	1,20	beta-lactamase	1,0E-11
transcripts_2780	1,10	multidrug abc transporter substrate-binding protein	1,6E-06
transcripts_5143	1,09	penicillin-binding protein 1b	1,9E-04

### Heme metabolism

transcripts_325	1,72	protoheme ix farnesyltransferase	2,5E-07
transcripts_2038	1,53	pyrroline-5-carboxylate reductase	2,2E-04
transcripts_1393	1,28	heme exporter protein	2,1E-09
transcripts_3298	1,26	cytochrome oxidase biogenesis protein	8,0E-08
transcripts_3262	1,22	heme insertion	6,4E-05
		coproporphyrinogen iii oxidase	

### Others

transcripts_4857	2,26	membrane protein	7,0E-17
transcripts_419	2,13	ribose-phosphate pyrophosphokinase	1,9E-43
		acetyl- carboxylase biotin carboxyl carrier protein	
transcripts_4615	1,90		1,7E-13
transcripts_918	1,82	gtp-binding protein	1,2E-09
transcripts_241	1,79	rod shape-determining protein	1,2E-07
		glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	
transcripts_2787	1,78		2,9E-28
transcripts_1740	1,77	carboxynorspermidine decarboxylase	5,3E-07
transcripts_3030	1,72	gtp cyclohydrolase	2,5E-08
transcripts_3340	1,69	biopolymer transporter	4,5E-07
transcripts_3341	1,67	biopolymer transporter	2,0E-05
transcripts_3052	1,64	gdp-6-deoxy-d-lyxo-4-hexulose reductase	1,9E-06
		phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	
transcripts_3312	1,64		1,2E-11
transcripts_5032	1,61	single-stranded dna-binding protein	7,3E-05
transcripts_4493	1,60	(2fe-2s)-binding protein	2,7E-14
transcripts_747	1,54	peptidase	2,1E-07
transcripts_239	1,52	rod shape-determining protein	8,7E-12

transcripts_370	1,50	peptidylprolyl isomerase	3,8E-04
transcripts_1136	1,48	hydrogenase	8,8E-06
transcripts_3996	1,48	prephenate dehydratase	6,8E-09
transcripts_240	1,48	rod shape-determining protein sell domain-containing protein repeat-	3,8E-05
transcripts_4079	1,45	containing protein manganese abc transporter atp-binding	9,7E-20
transcripts_1778	1,44	protein	1,0E-06
transcripts_5311	1,44	gnat family acetyltransferase	2,9E-07
transcripts_908	1,44	phosphoglycerate mutase	3,0E-07
transcripts_4389	1,44	rnd transporter mfp subunit	8,9E-08
transcripts_1078	1,41	exodeoxyribonuclease vii small subunit	1,9E-11
transcripts_847	1,36	oxaloacetate decarboxylase	1,1E-11
transcripts_2386	1,33	membrane partial	3,0E-05
transcripts_3964	1,28	acetyltransferase	2,3E-08
transcripts_1774	1,27	thiamine pyrophosphate-binding protein	1,3E-10
transcripts_2782	1,20	cell division protein	9,1E-12
transcripts_1547	1,13	exonuclease iii	3,7E-06
transcripts_3560	1,10	2og-fe oxygenase	1,2E-08
transcripts_2954	1,09	biopolymer transporter	6,3E-06

### **Hypothetical protein**

transcripts_4690	2,99	MULTISPECIES: hypothetical protein	6,8E-52
transcripts_5072	2,40	hypothetical protein PVLB_22970	2,7E-24
transcripts_3221	1,79	hypothetical protein	5,1E-11
transcripts_3525	1,63	hypothetical protein	3,4E-05
transcripts_2286	1,57	hypothetical protein	1,3E-09
transcripts_5399	1,34	hypothetical protein	5,2E-06
transcripts_4336	1,33	domain-containing protein	4,2E-13
transcripts_1776	1,31	hypothetical protein	1,6E-10
transcripts_2241	1,28	hypothetical protein	5,4E-09
transcripts_2356	1,18	conserved hypothetical protein	3,0E-05
transcripts_3692	1,14	hypothetical protein	4,0E-13
transcripts_449	1,11	hypothetical protein	3,1E-05



**Tabla 16. Genes reprimidos diferencialmente en tratamiento con mercurio/telurito en ATH-43.**

Transcript ID	Log(2)FC	Predicted function	p value adjusted
<b>Transcription</b>			
transcripts_3255	-1,08	16s rrna methyltransferase	0,002409819
transcripts_2799	-1,04	dna topoisomerase i	0,004811169
<b>Transport</b>			
transcripts_423	-1,26	transporter	0,001123284
transcripts_1718	-1,17	porin	0,003368329
transcripts_2832	-1,14	ammonium transporter	0,004030176
transcripts_2741	-1,10	mfs transporter	0,00544173
transcripts_898	-1,09	potassium transporter	0,006783521
transcripts_1853	-1,03	abc transporter substrate-binding protein	0,005790811
<b>Electron transport chain</b>			
transcripts_328	-1,10	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit i	0,003010498
transcripts_863	-1,03	cytochrome c biogenesis protein	0,007058924
<b>Metal metabolism</b>			
transcripts_491	-1,06	chromate transporter	8,30E-10
<b>Aminoacid metabolism</b>			
transcripts_2325	-1,69	glutamine synthetase	2,87E-06
transcripts_184	-1,58	ornithine carbamoyltransferase	1,11E-05
transcripts_928	-1,55	histidine utilization protein	3,81E-05
transcripts_668	-1,49	ribosomal subunit interface protein	1,75E-06
transcripts_3190	-1,36	cobalamin biosynthesis protein	0,000478545
transcripts_2725	-1,11	amidohydrolase	0,003834324
transcripts_3570	-1,06	threonine dehydratase	0,006203448
transcripts_183	-1,05	arginine deiminase	0,007832326
transcripts_4708	-1,02	cystathionine gamma-lyase	0,010611794
transcripts_1295	-1,02	peptide synthase	0,007876038
<b>Carbohydrates metabolism</b>			
transcripts_3911	-1,37	maltooligosyl trehalose synthase	0,000382473
transcripts_163	-1,37	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	0,000320849

transcripts_3135	-1,35	aldehyde-activating protein	0,000400486
transcripts_1821	-1,25	maltose mannitol abc transporter	
transcripts_5348	-1,12	substrate-binding protein	0,001351197
transcripts_673	-1,02	adenine glycosylase	0,003678983
transcripts_169	-1,01	sugar abc transporter substrate-binding protein	0,009500793
transcripts_3976	-1,00	sugar abc transporter permease	0,007247471
transcripts_2742	-1,00	glycosyl transferase family 1	0,013188362
transcripts_826	-0,98	2-dehydro-3-deoxygluconokinase	0,01338434
		glycoside hydrolyase	0,009830207

### Lipid metabolism

transcripts_186	-1,47	acetyl- carboxylase	7,53E-05
transcripts_2075	-1,08	lipoprotein	0,003958852
transcripts_2801	-1,01	3-ketoacyl- thiolase	0,000739191
transcripts_1027	-0,99	lipid transporter atp-binding permease	0,009469057
transcripts_1128	-0,98	apolipoprotein n-acyltransferase	9,64E-05
transcripts_1648	-0,98	acetyl- acetyltransferase	0,011562875

### Nucleotide metabolism

transcripts_4325	-1,35	adp-ribosylglycohydrolase	0,00044725
transcripts_2785	-1,12	soluble pyridine nucleotide transhydrogenase	0,005111894
transcripts_3251	-1,09	3-methyladenine dna glycosylase	0,004131098
transcripts_3227	-1,01	trna uridine 5-carboxymethylaminomethyl modification protein	0,013340287

### Horizontal gene transfer

transcripts_4595	-1,21	plasmid maintenance protein	0,001704328
------------------	-------	-----------------------------	-------------

### Others

transcripts_919	-1,47	fe-s-oxidoreductase	9,82E-05
transcripts_2757	-1,37	oxidoreductase	0,000394415
transcripts_727	-1,10	2-alkenal reductase	0,00630955
transcripts_185	-1,77	carbamate kinase	2,62E-09
transcripts_716	-1,42	atpase	8,43E-08
transcripts_366	-1,36	chemotaxis protein	0,000475574
transcripts_623	-1,34	membrane protein	0,000572539
transcripts_4496	-1,25	dehydrogenase	0,001374041

transcripts_1131	-1,22	atp-binding protein	1,31E-08
transcripts_2240	-1,22	hypothetical protein	0,002112745
transcripts_2983	-1,17	heat shock protein	0,002193578
transcripts_3972	-1,15	type iv secretion protein rhs	0,002147351
transcripts_5157	-1,14	exopolyphosphatase	0,00451635
transcripts_3702	-1,11	protein singed	0,004226682
transcripts_1758	-1,08	chemotaxis protein	0,005647622
transcripts_646	-1,02	hypothetical protein	0,006059056
transcripts_3127	-0,98	nad transhydrogenase	0,010917497
transcripts_2011	-0,97	amp-dependent synthetase	0,009865943

## 9. Publicaciones

**Rodríguez-Rojas F**, Díaz-Vásquez W, Undabarrena A, Muñoz-Díaz P, Arenas F, and Vásquez C (2016) Mercury confers cross-resistance to tellurite in *Pseudomonas* spp. isolated from the Chilean Antarctic territory. *Metallomics*, 8(1):108-117.

**Rodríguez-Rojas F**, Tapia P, Castro-Nallar E, Muñoz-Díaz P, Undabarrena A, Díaz-Vásquez W, Arenas-Salinas M, Valdés J, and Vásquez C (2016) Draft genome sequence of multi-metal resistant bacterium *Pseudomonas putida* ATH-43 isolated from Greenwich Island, Antarctica. *Frontiers in Microbiology*, 7:1777.

Arenas-Salinas M, Vargas J, Morales W, Pinto C, Muñoz-Díaz P, Cornejo F, Pugin B, Sandoval J, Díaz-Vásquez W, Muñoz-Villagrán C, **Rodríguez-Rojas F**, Morales E, Vásquez C, and Arenas F (2016) Flavoprotein-mediated tellurite reduction: structural basis and applications to the synthesis of tellurium-containing nanostructures. *Frontiers in Microbiology*, 7:1160.

