



OXIDACIÓN DEL ARSÉNICO REGULADA POR UN SISTEMA BACTERIANO DE DOS COMPONENTES

OXIDATION OF ARSENIC REGULATED BY A TWO COMPONENT BACTERIAL SYSTEM

Pacheco González G^{1*}, Mondragón Jaimes V², Velázquez Fernández J³.

¹Universidad Autónoma de Nayarit, Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias, Unidad Académica de Agricultura. Carretera Tepic-Compostela Km 9, C.P. 63780, Xalisco, Nayarit, México.
²Universidad Autónoma de Nayarit, ³Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas y Farmacéuticas; ³Secretaría de Investigación y Posgrado. Cd. de la Cultura, Amado Nervio s/n, C.P. 63190, Tepic Nayarit, México.

RESUMEN

El arsénico es un metaloide tóxico, ampliamente distribuido en ambientes terrestres y acuáticos. La biotransformación bacteriana juega un rol importante en el ciclo biogeoquímico de este metaloide, interviniendo en su movilidad, distribución y biodisponibilidad. Los mecanismos de resistencia bacteriana a arsénico, se encuentran asociados a determinantes genéticos, que les otorgan la capacidad de realizar principalmente transformaciones de oxidación y/o reducción. En esta revisión, se describe el mecanismo de resistencia bacteriana al arsénico por la Arsenito oxidasa (AOX) y el control transcripcional mediado por un sistema de dos componentes (aoxSR), que regulan la expresión de genes clave implicados en la oxidación de arsenito (AsIII).

PALABRAS CLAVE

Arsenito-oxidantes, arsenito oxidasa, genes *aoxSR*.

Introducción

El arsénico (As), es un metaloide tóxico distribuido en ambientes terrestres y acuáticos. Las fuentes naturales de arsénico ambiental incluyen el volcanismo, la actividad hidrotérmica y la erosión de rocas sedimentarias. La acción antropogénica, por su parte,

ABSTRACT

Arsenic is a toxic metalloid, widely distributed in terrestrial and aquatic environments. Bacterial biotransformation plays an important role in the biogeochemical cycle of this metalloid, in its mobility, distribution and bioavailability. Mechanisms of bacterial resistance to arsenic are associated with genetic determinants, which give them the ability to perform transformations of oxidation and/or reduction mainly. This review describes the bacterial resistance to arsenic by the arsenite oxidase (AOX) and transcriptional control mediated by two component systems (*aoxSR*), which regulate the expression of key genes involved in the oxidation of AsIII.

KEY WORDS

Arsenite oxidizing, arsenite oxidase, *aoxSR* genes.

Información del artículo

Recibido: 21 de noviembre de 2012.

Aceptado: 11 de abril de 2013.

constituye una segunda fuente de arsénico en el medio, dada por el uso de químicos agrícolas: como plaguicidas y herbicidas, conservadores de maderas, residuos de la fundición de metales y explotación minera (Welch *et al.*, 2000; Oremland y Stolz, 2003).

*Autor corresponsal:

Pacheco González G. Estudiante de Maestría en Ciencias Biológico Agropecuarias. Unidad Académica de Agricultura. Universidad Autónoma de Nayarit. Carretera Tepic-Compostela Km 9, C.P. 63780. Xalisco, Nayarit, México. Tel. +52(311) 211 0128, Correo electrónico: dalu_18@hotmail.com

Los efectos toxicológicos del arsénico están relacionados con su forma química y su estado de oxidación; el arsénico en su forma inorgánica, puede presentarse en dos estados redox: la forma reducida, arsenito (AsIII) es de 25 a 60 veces más tóxico que la forma oxidada, arsenato (As V), debido a su capacidad de unión a grupos sulfhidrilo de las proteínas, que ocasionan la degradación de membranas y la muerte celular (Smedley y Kinniburgh, 2002; Muller *et al.*, 2003).

El estado de oxidación del arsénico y por tanto su movilidad y toxicidad, están controlados fundamentalmente por las condiciones redox (potencial redox, Eh) y el pH. Como aproximación y sin tener en cuenta otros factores como el contenido de materia orgánica en condiciones oxidantes, el estado AsV predomina sobre el AsIII, encontrándose fundamentalmente como H_2AsO_4^- a valores de pH bajos (inferiores a 6.9); mientras que a pH más alto, la especie dominante es HAsO_4^{2-} . En condiciones reductoras a pH inferior a 9.2, predomina la especie neutra H_3AsO_3^0 (Lillo, 2003; Smedley y Kinniburgh, 2002).

La contaminación del agua, aire y suelo por arsénico es uno de los problemas ambientales más severos ya que este elemento no se degrada y permanece en el ambiente (Acosta *et al.*, 2007). Su presencia ejerce una fuerte presión de selección sobre los organismos que allí habitan (Cervantes y Vaca, 1990; Silver y Misra, 1988) y si la descarga del contaminante es de carácter permanente, como sucede habitualmente con los metales pesados; se produce una selección de aquellos genotipos que pueden sobrellevar dicho estrés (Moraga *et al.*, 2003; Silver y Walderharg, 1992).

La relación contaminante-microorganismo origina una serie de procesos adaptativos que finalmente se expresan como mecanismos de resistencia hacia el metaloide (Anisimova *et al.*, 1993; Montuelle *et al.*, 1994). Entre ellos, se encuentran principalmente los que involucran: a) componentes celulares que capturan a los iones, neutralizando su toxicidad, b) enzimas que modifican el estado redox de los metales o metaloides, convirtiéndolos en formas menos tóxicas, y c) la presencia de transportadores de membrana que expulsan las formas nocivas de As del citoplasma celular (Cervantes *et al.*, 2006). El objetivo de esta revisión es describir el mecanismo de resistencia bacteriana al arsénico por la Arsenito oxidasa (AOX) y el control transcripcional mediado por un sistema bacteriano

de dos componentes (*aoxSR*), que regulan la expresión de genes clave implicados en la oxidación de arsenito (AsIII).

Resistencia al arsénico: arsenito oxidasa (AOX)

Se han aislado microorganismos que presentan diversos mecanismos de resistencia que les permiten tolerar concentraciones de arsénico; algunos de ellos se encuentran asociados a determinantes genéticos, que les otorgan la capacidad de realizar transformaciones de oxidación y/o reducción (Silver y Phung, 2005a).

La oxidación bacteriana de AsIII a AsV fue descrita en 1918, pero no fue hasta 1992 que se aisló la primera arsenito oxidasa (AOX) de *Alcaligenes faecalis* (Anderson *et al.*, 1992). Esta enzima participa tanto en la desintoxicación de arsénico en bacterias heterótrofas (Muller *et al.*, 2003) como en la generación de energía en bacterias quimioheterótrofas y quimiolitotróficas (Santini *et al.*, 2004; Santini y Vanden, 2004). Las bacterias arsenito oxidantes son filogenéticamente diversas (Battaglia-Brunet *et al.*, 2006) pero todas llevan a cabo la oxidación del AsIII por arsenito oxidasa.

La AOX es una enzima redox periplasmática que presenta una estructura heterodimérica que consta de dos subunidades: la subunidad mayor que es la catalítica, presenta un centro de molibdeno y un centro [3Fe-4S] y la subunidad menor formada por un centro Rieske [2Fe-2S] (Figura 1) (Ellis *et al.*, 2001; Silver y Phung, 2005b). Los genes que codifican estas dos subunidades fueron identificados y secuenciados por primera vez en la bacteria heterotrófica *Herminiimonas arsenicoxydans*, y se demostró que ambos genes están en el mismo operón denominado *aox* (Muller *et al.*, 2003).

El primer gen del operón *aox* codifica la subunidad Rieske y se le nombró *aoxA*; la designación *aoxB* se utiliza para el gen que codifica la subunidad mayor (Hille, 1996; Muller *et al.*, 2003) *AoxA* que posee un péptido señal TAT (*Twin-Arginine Transporter*) en el extremo amino terminal que guía la proteína heterodimérica plegada durante su transporte del citoplasma al espacio periplásmico (Muller *et al.*, 2003).

Se ha propuesto un mecanismo de oxidación del arsenito por esta enzima, que consiste en que el AsIII ingresa a través de un orificio cónico presente en la superficie de la enzima, entrando en contacto directo con el Molibdeno (VI) embebido en la misma; inmediatamente después se produce

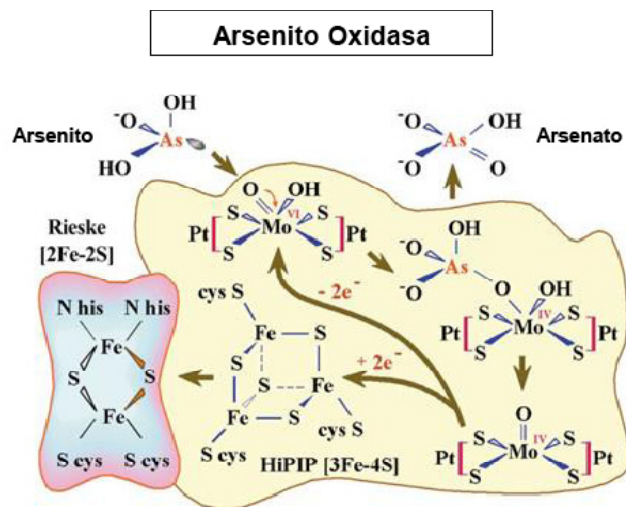


Figura 1. Modelo de la enzima arsenito oxidasa (AOX) (Tomado y modificado de Silver y Phung, 2005b).

una transferencia de dos electrones y ahora el arsenato es liberado a través del mismo orificio de entrada y el molibdeno es reducido a Molibdeno (IV). Posteriormente, se transfieren los electrones primero al grupo [3Fe-4S], dentro de la subunidad grande Mo-pterina de la proteína, y después a un clúster [2Fe-2S] situado en la subunidad pequeña. A partir de ese sitio, los electrones se transfieren a la cadena respiratoria de la membrana interna, posiblemente primero a una azurina o un citocromo y eventualmente al oxígeno el aceptor final de electrones (Anderson *et al.*, 1992, Ellis *et al.*, 2001, Hoke *et al.*, 2004; Silver y Phung, 2005a; Mukhopadhyay *et al.*, 2002).

En *Agrobacterium tumefaciens* 5A se identificó un mecanismo complejo para la expresión de los genes estructurales de la arsenito oxidasa (*aoxAB*), que implica la percepción de señales a través de un "quorum sensing", así como de la participación de un sistema de dos componentes en la transducción de señales (Kashyap *et al.*, 2006); estos sistemas de transducción de señales existen en una amplia variedad de especies y regulan eficientemente una multitud de operones microbianos (Stock *et al.*, 2000).

Regulación del operón *aox*: sistema de dos componentes

La adaptación al medio es un proceso esencial para la supervivencia de los organismos. Los sistemas que permiten a las células sentir y responder a una nueva situación se denominan sistemas de transducción de se-

ñales. Estos sistemas funcionan percibiendo la llegada de un estímulo externo y transmitiendo la información recibida al interior de la célula; generando así respuestas adaptativas específicas como la modulación de la expresión génica o la actividad catalítica (Casino, 2008).

Los sistemas de dos componentes (*Two Component System*) median la transducción de la señal a través de dos proteínas conservadas: una proteína histidina quinasa sensora (HK) y una proteína reguladora de la respuesta (RR) que se fosforilan en un residuo de histidina y de ácido aspártico, respectivamente. La transferencia del grupo fosforilo desde la HK al RR en respuesta a múltiples estímulos, resulta generalmente, en la activación del RR para controlar una amplia variedad de procesos esenciales para la célula como la adquisición de nutrientes (carbono, nitrógeno, fósforo), la actividad metabólica (sistema de transporte de electrones, absorción y catabolismo), la virulencia, la adaptación física y química al medio (pH, osmolaridad, quimiotaxis), las rutas del desarrollo (esporulación, ciclo celular) y resistencia a antibióticos o metales pesados, entre otros (Grebe y Stock, 1999; Hoch y Varughese, 2001; Parkinson y Kofoid, 1992). Se ha mencionado que la regulación de la expresión del operón *aoxAB* responde a señales "quorum sensing" y a un sistema de dos componentes (Kashyap *et al.*, 2006); sin embargo los mecanismos reguladores de la oxidación del arsenito, aún no están totalmente esclarecidos (Cai *et*

al., 2009; Muller et al., 2007; Quéméneur et al., 2008; Chang et al., 2010; Sultana et al., 2012).

El sistema de dos componentes de la AOX esta integrado por los genes *aoxS* y *aoxR*, localizados arriba del operón *aoxAB*. *aoxS* que codifica para una histidina quinasa HK y *aoxR* funciona como un regulador transcripcional. Además de *aoxA* y *aoxB*, río abajo se localizan los genes *aoxC* y *aoxD* que codifican de forma respectiva, tanto para el citocromo C como para una enzima involucrada en la biosíntesis de la molibdopterina (Kashyap et al., 2006). Por último, dentro del operón *aox* se encuentra el gen denominado *aoxX*, el cual codifica para una proteína de unión a oxianiones (Cai et al., 2009).

En *Ochrobactrum tritici* se identificó la presencia de todos los genes anteriores dentro del operón *aox* (Branco et al., 2009), al igual que en cepas de *Herminiomonas arsenicoxydans*, en las cuales por mutagénesis con el transposon Tn5 se demostró que existen otras proteínas que participan en el control de la oxidación del arsenito, como son RpoN y DnaJ, las cuales presentan un factor sigma N (σ_{54}) alternativo de la ARN polimerasa y la co-chaperona Hsp-70 (Koechler et al., 2010). Sardiwal et al., (2010), reportaron la identificación y caracterización de dos genes inmediatamente río arriba de la arsenito oxidasa en *Rhizobium* spp. str. NT-26. También demostraron que los dos productos génicos designados AoxS y AoxR son esenciales para la oxidación arsenito y comprenden un clásico sistema de dos componentes.

Koechler et al., (2010), describieron una visión completa de la función de diversas proteínas en el control de

la oxidación de arsenito en *Herminiomonas arsenicoxydans*, mediante un mecanismo de sistema de dos componentes.

De lo anterior, se puede concluir que los controles transcripcionales regulan la expresión de genes clave (*aoxAB*) implicados en la oxidación de AsIII (Kang et al., 2012). La oxidación de arsenito por bacterias arsenito oxidantes, resulta de importancia en procesos de biorremediación; ya que la contaminación con arsénico es un grave problema a nivel mundial; en Asia (Bangladesh, varios estados de la India, Nepal, Pakistán, Vietnam, Camboya, China), se estima que más de 100 millones de personas están en riesgo, y alrededor de 70,0000 personas se han visto afectadas por enfermedades relacionadas con arsénico (Rahman et al., 2009; Sardiwal et al., 2010). Un buen entendimiento de los procesos de unión a arsenito y su oxidación son de gran interés para los biólogos sintéticos involucrados en la ingeniería de nuevas entidades moleculares que podrían ser utilizadas en la detección y remoción de arsenito en sitios contaminados (Hughes, 2002; Kitchin y Wallace, 2004; Sardiwal et al., 2010).

Conclusiones

El conocimiento de lo sistemas de transducción de señales de dos componentes ha permitido una mayor comprensión de los procesos fisiológicos que permiten la regulación de la expresión genética, por lo que podrían ser considerados como una herramienta útil biotecnológica para el diseño de propuestas que permitan el saneamiento de zonas contaminadas tanto por arsénico como por otros elementos tóxicos.

Literatura citada

- Acosta I, Moctezuma-Zárate MG, Cárdenas JF y Gutiérrez C. Bioadsorción de cadmio (II) en solución acuosa por biomásas fúngicas. Información Tecnológica 2007; 18:9-14.
- Anderson G, Williams J, Hille R. The purification and characterization of arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis*, a molybdenum-containing hydroxylase. The Journal of Biological Chemistry 1992; 267:23674-82.
- Anisimova L, Siunova T, Boronin A. Resistance to metals gram negative bacteria isolated from sewage and soils of industrial regions. Microbiology 1993; 62(5): 505-508.
- Battaglia-Brunet F, Joulain C, Garrido F, Dictor MC, Morin D, Coupland K, et al. Oxidation of arsenite by *Thiomonas* strains and characterization of *Thiomonas arsenivorans* sp. nov. Antonie Van Leeuwenhoek 2006; 89: 1-10.
- Branco R, Francisco R, Chung AP, Vasconcelos P. Identification of an *aox* system That Requires Cytochrome c in the highly arsenic-resistant bacterium *Ochrobactrum tritici* SC11 24. Applied and Environmental Microbiology 2009; 75(15): 5141-47.
- Cai L, Rensing C, Li X, Wang G. Novel gene clusters involved in arsenite oxidation and resistance in two arsenite oxidizers: *Achromobacter* sp. SY8 and *Pseudomonas* sp. TS44. Applied Microbiology and Biotechnology 2009; 83(4):715-25.

- Casino FP. Estudio de las bases estructurales y enzimáticas del mecanismo de transducción de señal mediado por sistemas de dos componentes (Tesis de doctorado) Valencia: Universidad de Valencia, 2008.
- Cervantes C, Vaca S. Resistencia bacteriana a los metales pesados tóxicos. *Ciencia y Desarrollo* 1990; 17(102): 86-96.
- Cervantes C, Espino-Saldaña AE, Acevedo-Aguilar F, León-Rodríguez IL, Rivera-Cano ME, Avila-Rodríguez M, et al. Interacciones microbianas con metales pesados. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 2006; 48(2):203-10.
- Chang JS, Yoon IH, Lee JH, Kim KR, An J, Kim KW. 2010. Arsenic detoxification potential of aox genes in arsenite-oxidizing bacteria isolated from natural and constructed wetlands in the Republic of Korea. *Environmental Geochemistry and Health* 32(2):95-105
- Ellis PJ, Conrads T, Hille R, Kuhn P. Crystal structure of the 100 kDa arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis* in two crystal forms at 1.64 Å and 2.03 Å. *Structure* 2001; 9:125–132.
- Grebe TW, Stock JB. The histidine protein kinase superfamily. *Advances in microbial physiology* 1999; 41:139-227.
- Hille R. The mononuclear molybdenum enzymes. *Chemical Reviews* 1996; 96:2757-2816.
- Hoke KR, Cobb N, Armstrong FA, Hille R. Electrochemical studies of arsenite oxidase: an unusual example of a highly cooperative two-electron molybdenum center. *Biochemistry* 2004; 43:1667–1674.
- Hoch JA, Varughese KI. Keeping signals straight in phosphorelay signal transduction. *Journal of bacteriology* 2001; 183:4941-49.
- Hughes MF. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology Letters* 2002; 133:1–16.
- Kang YS, Bothner B, Rensing C, McDermotta TR. Involvement of RpoN in Regulating Bacterial Arsenite Oxidation. *Applied and Environmental Microbiology* 2012; 78(16):5638–45.
- Kashyap DR, Botero LM, Franck WL, Hassett DJ, McDermott TR. Complex regulation of arsenite oxidation in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of bacteriology* 2006; 188:1081–88.
- Kitchin KT, Wallace K. Arsenite binding to synthetic peptides based on the Zn finger region and the estrogen binding region of the human estrogen receptor- α . *Toxicology and Applied Pharmacology* 2004; 206:66–72.
- Koechler S, Cleiss-Arnold J, Proux C, Sismeiro O, Dillies MA, Goulhen-Chollet F, et al. Multiple controls affect arsenite oxidase gene expression in *Herminiimonas arsenicyoxidans*. *BMC Microbiology* 2010; 10(53):1471-84.
- Lillo J. Peligros geoquímicos: arsénico de origen natural en las aguas [Monografía en Internet]. Spain:Universidad Rey Juan Carlos, 2003. [consultado 2010 Noviembre 12] Disponible en: http://pendientedemigracion.ucm.es/info/crismine/Ambiente_Serena/Peligros_As_2.pdf
- Montuelle B, Latour X, Volat B, Gounot AM. Toxicity of heavy metals to bacteria in sediments. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 1994; 53(5):753-758.
- Mukhopadhyay R, Rosen BP, Phung L, Silver S. Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiology Reviews* 2002; 26:311–325.
- Muller D, Lièvremon D, Simeonova DD, Hubert JC, Lett MC. Arsenite oxidase aox genes from a metal-resistant betaproteobacterium. *Journal of bacteriology* 2003; 185:135–141.
- Muller D, Médigue C, Koechler S, Barbe V, Barakat M, Talla E, Bonnefoy V, et al. A tale of two oxidation states: bacterial colonization of arsenic-rich environments. *PLOS Genetics* 2007; 3(4):53.
- Oremland y Stolz. The Ecology of Arsenic. *Science* 2003; 300:939-944.
- Parkinson JS, Kofoid EC. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annual review of genetics* 1992; 26: 71-112.
- Quéméneur M, Heinrich-Salmeron A, Muller D, Lièvremon D, Jauzein P, et al. Diversity surveys and Evolutionary Relationships of aoxB genes in Aerobic Arsenite-oxidizing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 2008; 74:4567-73.
- Rahman MM, Naidu R, Bhattacharya P. Arsenic contamination in groundwater in the Southeast Asia region. *Environmental Geochemistry and Health* 2009; 31:9–21.
- Santini JM, Vanden Hoven RN. Molybdenum-containing arsenite oxidase of the chemolithoautotrophic arsenite oxidizer NT-26. *Journal of Bacteriology* 2004; 186:1614 –19.
- Sardiwal S, Santini JM, Osborne TH, Djordjevic S. Characterization of a two-component signal transduction system that controls arsenite oxidation in the chemolithoautotroph NT-26. *FEMS Microbiology Letters* 2010; 313:20-28.
- Silver S, Walderhaug M. Gene regulation of plasmid and chromosome determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiological Reviews* 1992; 56:195-22.
- Silver S, Phung LT. Genes and enzymes involved in bacterial Oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Applied and Environmental Microbiology* 2005a; 71:599-608.

- Silver S, Phung LT. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2005b; 32:587–605
- Smedley PL, Kinniburgh DG. A Review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry* 2002; 17:517-568.
- Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. Two-component signal transduction. *Annual Review of Biochemistry* 2000; 69:183–215.
- Sultana M, Vogler S, Zargar K, Schmidt AC, Saltikov C, Seifert J, *et al.* New clusters of arsenite oxidase and unusual bacterial groups in enrichments from arsenic-contaminated soil. *Annual Review of Biochemistry* 2012; 194:623–635.
- Welch AH, Westjohn DB, Helsel DR, Wanty RB. Arsenic in ground water of the United States: Occurrence and geochemistry. *Ground Water* 2000; 38(4):589.
- Yan XP, Kerrich R, Hendry MJ. Distribution of arsenic (III), arsenic (V) and total inorganic arsenic in pore-waters from a thick till and clay-rich aquitard sequence, Saskatchewan, Canada. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 2000; 64:2637-48.

Como citar este artículo: Pacheco González G, Mondragón Jaimes V, Velázquez Fernández J. Oxidación del arsénico regulada por un sistema bacteriano de dos componentes. *Revista Bio Ciencias*. 2013; 2(3): 92-97.

