

RESISTENCIA MICROBIANA A LOS ARSENICALES ORGÁNICOS*

Carlos Cervantes

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edificio B-3, Ciudad Universitaria. Morelia, Mich.
Correo E: cvega1999@yahoo.com

RESUMEN

Los derivados del arsénico se encuentran ampliamente distribuidos en los ambientes naturales y la elevada toxicidad de estos compuestos, tanto inorgánicos como orgánicos, ha hecho que su prevalencia represente un serio problema de salud pública a nivel global. Se ha demostrado que los microorganismos juegan un papel relevante en el geociclo en el que participan el arsénico y sus derivados. La exposición continua a estos compuestos ha influido para que los microorganismos desarrollen variados mecanismos de tolerancia al arsénico. Para los derivados inorgánicos del arsénico, las estrategias microbianas de resistencia se basan comúnmente en sistemas de transporte que expulsan a los compuestos tóxicos del citoplasma celular. Estos sistemas se encuentran codificados en los ampliamente difundidos operones *ars*. Recientemente se han descubierto novedosos mecanismos que se relacionan con la tolerancia microbiana hacia los derivados orgánicos del arsénico. Estos sistemas incluyen las enzimas ArsM, ArsH y ArsI y el transportador ArsP, todos ellos capaces de destoxificar a los organoarsenicales. En esta revisión se resume brevemente la información acerca del funcionamiento y la distribución de los sistemas de resistencia a arsenicales orgánicos en organismos procarióticos.

ABSTRACT

"Microbial Resistance to Organoarsenicals"

Arsenic derivatives are widely distributed in natural environments and the high toxicity of these compounds, both inorganic and organic, has converted their prevalence in a serious public health problem to a global level. It has been demonstrated that microorganisms play a relevant role in the geocycle in which participate arsenic and its derivatives. Continuous exposure to arsenic compounds has influenced for microorganisms to develop varied arsenic tolerance mechanisms. For inorganic arsenic derivatives, the microbial resistance strategies are commonly based on transport systems that extrude the toxic compounds from the cell cytoplasm. These systems are encoded in the widely distributed *ars* operons. More recently, novel mechanisms related to the microbial tolerance towards organic arsenic compounds have been discovered. These systems include the enzymes ArsM, ArsH and ArsI and the ArsP transporter, all of them able to destoxify the organoarsenicals. This review briefly summarizes the information on the function and distribution of the systems of resistance to organoarsenicals in prokaryotes.

PALABRAS

CLAVE:

Arsénico,
bacterias,
organo-
arsenicales.

KEY WORDS:

Arsenic,
bacteria,
organoarsenicals.

Introducción

Los metaloides [Boro (B), Silicio (Si), Germanio (Ge), Arsénico (As), Antimonio (Sb) y Telurio (Te)] se ubican en una parte intermedia de la Tabla Periódica que separa a los metales de los no metales. El arsénico (^{33}As) es un elemento presente de forma natural en ambientes acuáticos y terrestres. El arsénico es catalogado como un carcinógeno en humanos y se considera el agente tóxico ambiental más prevalente del planeta (19). Las formas químicas inorgánicas más abundantes del arsénico en el ambiente son las especies trivalente As(III) y pentavalente As(V) . Los sistemas microbianos de resistencia a las formas inorgánicas del arsénico generalmente se relacionan con los llamados operones *ars* (2). Las características químicas y de toxicidad de las especies inorgánicas del arsénico y la información sobre la estructura, el funcionamiento y la distribución de los operones *ars* se revisaron

recientemente (6, 10). En este escrito se resume la información relacionada con los sistemas microbianos de resistencia a los arsenicales orgánicos (6).

Transformaciones microbianas de organoarsenicales

Las transformaciones microbianas de arsenicales orgánicos, principalmente la metilación/desmetilación bacteriana de derivados del arsénico, se conocen desde hace décadas (revisado por [1]), pero los detalles bioquímicos y genéticos de estos procesos sólo se comenzaron a revelar recientemente, en gran parte por la secuenciación de genomas completos y por los análisis moleculares de los genes involucrados. La metilación es una parte importante del geociclo global del arsénico y los microorganismos tienen una participación relevante en este proceso (7) (Fig. 1).

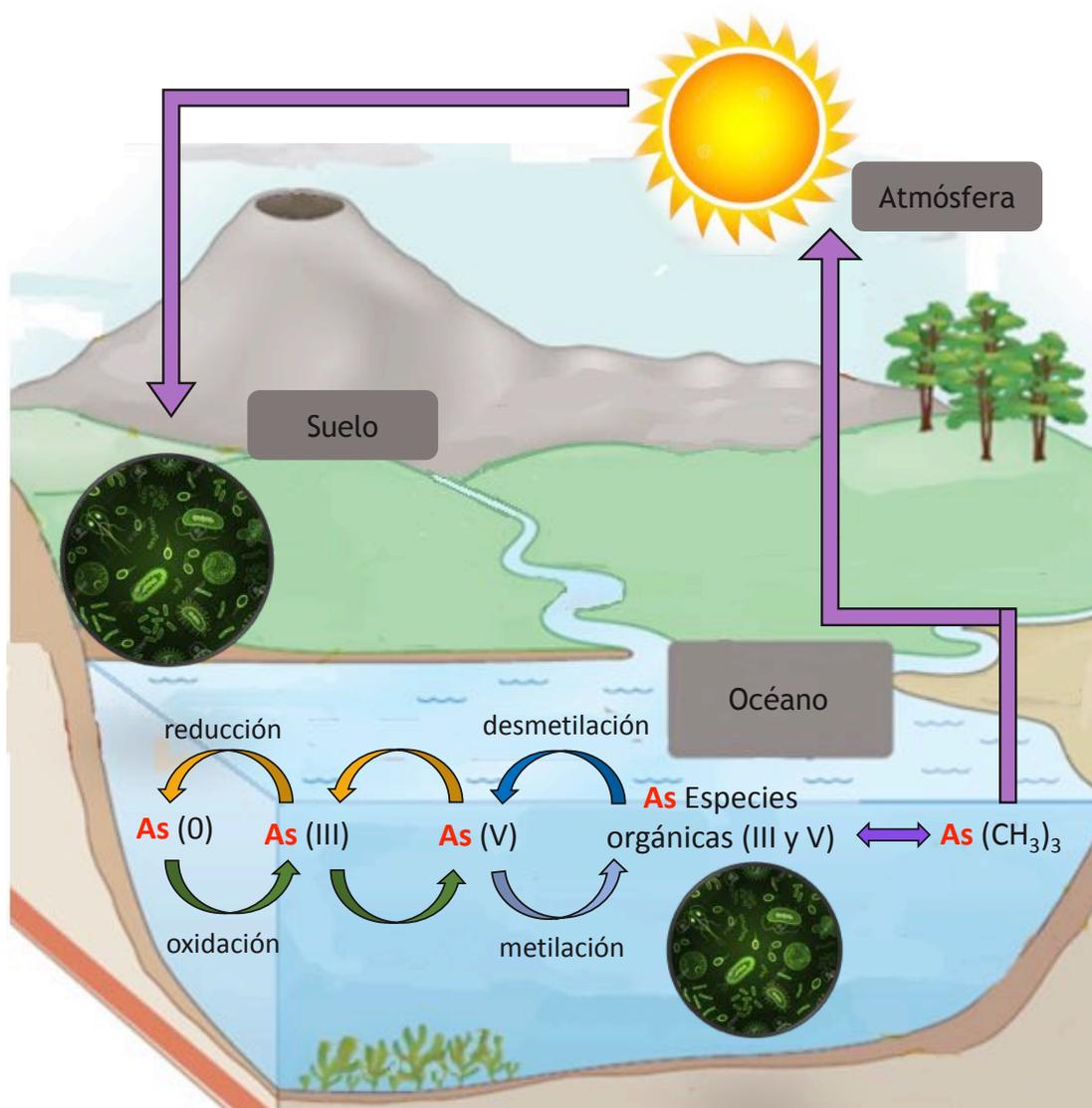


Figura 1. Transformaciones microbianas del arsénico.

Se esquematizan las distintas modificaciones químicas que sufren los derivados del arsénico en el ambiente. Los microorganismos tienen una participación relevante en dichos procesos, que incluyen las transformaciones de las especies inorgánicas a las formas orgánicas metiladas. Figura adaptada de Zhu et al. (19).

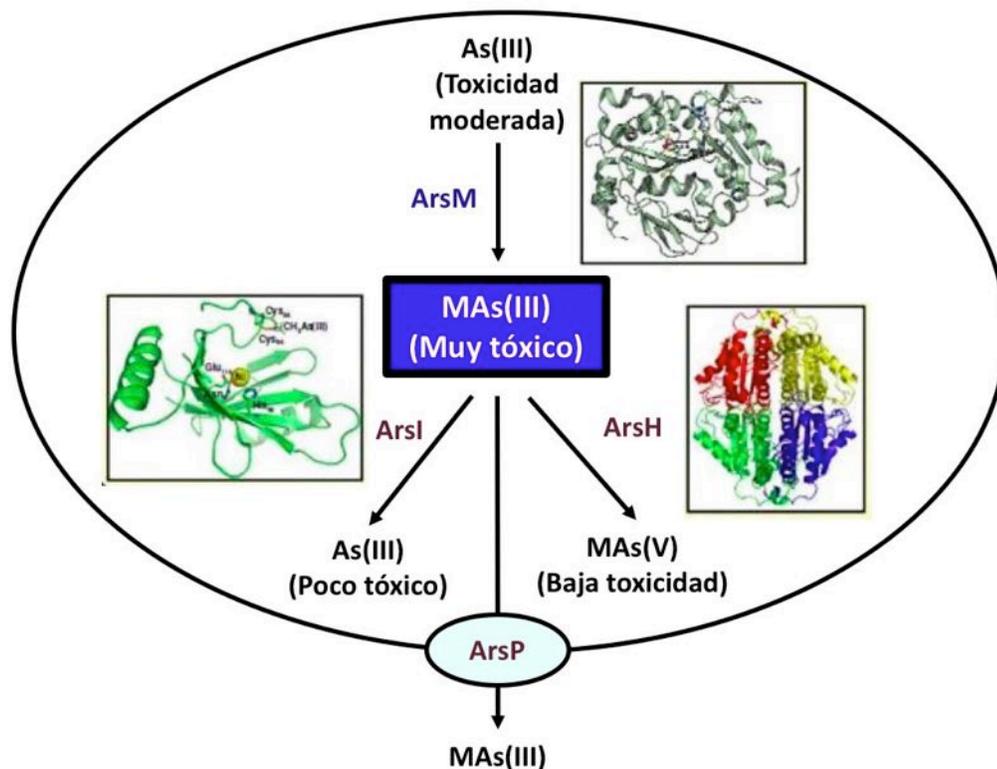


Figura 2. Sistemas microbianos de resistencia a arsenicales orgánicos. El esquema representa una bacteria que muestra las transformaciones llevadas a cabo por las enzimas *ArsM*, *ArsH* y *ArsI* sobre los distintos compuestos derivados del arsénico. También se indica la participación de la bomba de expulsión *ArsP* en la membrana celular. Todos estos sistemas conducen a la detoxificación de los arsenicales orgánicos, como se describe en el texto. Se presentan también las estructuras tridimensionales predichas para las enzimas. Figura modificada de Ben Fekih et al. (1).

Los ciclos de metilación/desmetilación del arsénico afectan la toxicidad y la disponibilidad del metaloide en el ambiente (Fig. 1). La metilación del arsénico se ha reportado como un mecanismo de detoxificación (15, 19), aunque no todos los productos metilados son menos tóxicos que las formas inorgánicas del arsénico. Por ejemplo, el arsenical aromático pentavalente roxarsona [Rox(V)] no es tóxico para las bacterias, pero la forma reducida Rox(III) es muy tóxica (5); también, los derivados trimetil As(III) son más tóxicos que el arsenito inorgánico (9). Recientemente se caracterizó un sistema genético de metilación relacionado con la resistencia a arsénico (15). Este sistema incluye genes que codifican mecanismos de detoxificación para arsenicales orgánicos, como las enzimas *ArsM*, *ArsH* y *ArsI* y el transportador *ArsP*. A continuación se describirán los genes, y sus correspondientes productos, involucrados en tales sistemas de resistencia

ArsM es una enzima capaz de metilar al arsenito

El gen *arsM* codifica la enzima *ArsM*, una As(III) S-adenosilmetionina metil transferasa identificada inicialmente en un plásmido de la arquea resistente a arsénico *Halobacterium* sp. NRC-1 (12); *arsM* se encuentra ubicado en un operón *ars* y la resistencia a arsenito se pierde cuando se elimina este gen. La actividad de la enzima *ArsM* consiste en trans-

formar al arsenito a su derivado altamente tóxico metil arsenito [MAs(III)] (Fig. 2). Este fenotipo se acompaña de la producción del gas trimetil arsina [TMAs(III)] lo que sugiere que la elevada volatilidad de los arsenicales metilados supera la alta toxicidad de los intermediarios (18). La estrategia microbiana consiste en generar un compuesto más tóxico, pero que puede eliminarse del medio por su volatilidad.

En una búsqueda en las bases de datos genómicas, Zhu et al. (19) encontraron que el gen *arsM* está ampliamente distribuido en las bacterias, lo que indica que los genes relacionados con las biotransformaciones del arsénico surgieron en etapas tempranas de la Tierra; estos autores también propusieron que la enzima *ArsM* pudiera tener un papel más amplio en la detoxificación del arsénico, probablemente participando en la transformación de otros organoarsenicales.

ArsH es una oxidasa de organoarsenicales

El gen *arsH* se reportó por primera vez en el operón *ars* del plásmido de virulencia pYV de aislados de bacterias enteropatógenas del género *Yersinia* (8). En este trabajo se encontró que el operón *arsHRBC* forma parte de los transposones Tn2502 (*Y. enterocolitica*) y Tn2503 (*Y. pestis*), lo que sugiere que los genes *ars* de estas bacterias pueden transferirse de manera horizontal.

La enzima ArsH se identificó como una oxidasa de organoarsenicales que confiere resistencia a derivados metilados de As(III), tanto en la proteobacteria del suelo *Pseudomonas putida* KT2440 como en la bacteria simbiótica de leguminosas *Sinorhizobium meliloti* (3). ArsH oxida los organoarsenicales trivalentes [MAs(III)] a sus derivados pentavalentes [MAs(V)] menos tóxicos y así, junto con la enzima ArsM, amplía el espectro de resistencia microbiana de los operones *ars*, de arsenicales inorgánicos a compuestos orgánicos (Fig. 2).

Los ejemplos de la presencia de genes *arsH* incluyen a los operones *ars* de los cromosomas de las bacterias *Thiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Synechocystis sp.*, *S. meliloti*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Herminiimonas arsenicoxydans*, *Ochrobactrum tritici*, *P. putida* y *Pseudomonas aeruginosa* (revisado en [10]). Es interesante que los genomas de las bacterias resistentes a arsénico *H. arsenicoxydans* y *P. putida* tienen cuatro y dos copias de genes *arsH*, respectivamente. Homólogos de ArsH se identificaron en plásmidos de la enterobacteria *Serratia marcescens* y de la bacteria fijadora de nitrógeno *Sinorhizobium sp.*, lo que indica el potencial de transferencia de los genes *arsH* a otras bacterias. El gen *arsH* también se ha localizado en los genomas de arqueas, hongos, plantas y animales (3), lo cual sugiere un origen ancestral de la enzima ArsH.

ArsI es una liasa que rompe enlaces Carbono-Arsénico

Los organoarsenicales se han utilizado ampliamente como herbicidas o pesticidas para el mantenimiento de canchas deportivas, así como para otros procedimientos agrícolas, veterinarios, e incluso con fines bélicos (15). La enzima ArsI se identificó por primera vez en la bacteria Gram-positiva *Bacillus sp.* MD1, aislada del suelo de un campo de golf (17); ArsI es capaz de romper enlaces carbono-arsénico en derivados metilados As(III), lo que causa la desmetilación de estos compuestos y la liberación del As(III) inorgánico (Fig. 2). Esta enzima es una desoxigenasa no-hémica dependiente de hierro con actividad liasa de enlaces C-As; la expresión del gen *arsI* de *Bacillus* en *Escherichia coli* le confiere a esta bacteria resistencia a derivados MAs(III) (17), lo que indica que la desmetilación constituye un proceso de detoxificación.

Los genes *arsI* están ampliamente distribuidos en bacterias aeróbicas, donde se encuentran siempre asociados con operones *ars* (17); por su ubicuidad, estos autores han propuesto que la actividad de

ArsI juega un importante papel en el geociclo global del arsénico. Otro homólogo de ArsI se caracterizó en la cianobacteria *Nostoc sp.* PCC 7120 (14); esta enzima también confiere resistencia a derivados MAs(III) y es capaz de desmetilar compuestos tanto de As(III) como de As(V).

ArsP es un transportador que expulsa derivados orgánicos de As(III)

Wang et al. (13) identificaron un gen que codifica un probable transportador de membrana, la permeasa ArsP, en el operón *ars* de la bacteria patógena *Campylobacter jejuni*. La expulsión de MAs(III) y de Rox(III) por ArsP se demostró experimentalmente mediante la expresión del gen *arsP* de *C. jejuni* en *E. coli* (4); este transportador no expulsa arsenito inorgánico ni arsenicales orgánicos pentavalentes. ArsP fue el primer sistema bacteriano de expulsión reportado para la detoxificación de organoarsenicales trivalentes (Fig. 2); recientemente se reportó en la bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens* el transportador ArsK, que expulsa tanto As(III) y Sb(III) como arsenicales orgánicos (11a).

Los genes para los transportadores Acr3 y ArsP coexisten en el operón *ars* de *C. jejuni*, donde participan en la expulsión de arsenicales inorgánicos y orgánicos, respectivamente (11). En una búsqueda en secuencias genómicas, los genes que codifican a ArsP se encontraron ampliamente distribuidos en los genomas bacterianos, sólo superados por los genes para los transportadores de arsenito Acr3 y ArsB (16); también se encontraron homólogos de ArsP en los genomas de arqueas y de algunos eucariotes, sugiriendo un origen ancestral del gen *arsP*.

Consideraciones finales

Los sistemas microbianos de resistencia a arsénico más estudiados son los relacionados con los derivados inorgánicos del metaloide, dentro de los cuales resaltan los codificados en los operones *ars*. Sin embargo, recientemente se han identificado varios sistemas microbianos de tolerancia dirigidos a los derivados orgánicos del arsénico. Estos sistemas incluyen tanto enzimas (ArsM, ArsH y ArsI) como el transportador ArsP, todos ellos capaces de detoxificar a los organoarsenicales. La acción concertada de estos sistemas constituye una estrategia microbiana eficiente para la tolerancia a los derivados orgánicos del arsénico. Las estructuras tridimensionales de ArsM, ArsH y ArsI mostradas en la Fig. 2 enfatizan el nivel de estudio a que han sido sometidas dichas enzimas.

La amplia distribución de los genes relacionados con la resistencia a los organoarsenicales sugiere que se trata de sistemas ancestrales, seleccionados en los genomas microbianos ante la exposición ambiental continua de los microorganismos a estos

compuestos. El estudio más detallado de los sistemas de tolerancia conducirá sin duda a entender con mayor profundidad las interacciones de los microorganismos con los organoarsenicales tóxicos presentes en el ambiente de forma ubicua.



REFERENCIAS

1. Ben Fekih I, Zhang C, Li YP, Zhao Y, Alwathnani HA, Saquib Q, Rensing C, Cervantes C (2018) Distribution of arsenic resistance genes in prokaryotes. *Front Microbiol* 9:2473.
2. Bentley R, Chasteen TG (2002) Microbial methylation of metalloids: Arsenic, antimony, and bismuth. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:250-271.
3. Cervantes C, Ji G, Ramírez JL, Silver S (1994) Resistance to arsenic compounds in microorganisms. *FEMS Microbiol Rev* 15:355-367.
4. Chen J, Bhattacharjee H, Rosen BP (2015) ArsH is an organoarsenical oxidase that confers resistance to trivalent forms of the herbicide monosodium methylarsenate and the poultry growth promoter roxarsone. *Mol Microbiol* 96:1042-1052.
5. Chen J, Madegowda M, Bhattacharjee H, Rosen BP (2015) ArsP: a methylarsenite efflux permease. *Mol Microbiol* 98: 625-635.
6. Chen J, Sun S, Li CZ, Zhu YG, Rosen BP (2014) Biosensor for organoarsenical herbicides and growth promoters. *Environ Sci Technol* 48:1141-1147.
7. Mukhopadhyay R, Rosen BP, Phung LT, Silver S (2002) Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiol Rev* 26:311-325.
8. Neyt C, Iriarte M, Thi VH, Cornelis GR (1997) Virulence and arsenic resistance in *Yersinia*. *J Bacteriol* 179:612-619.
9. Petrick JS, Ayala-Fierro F, Cullen WR, Carter DE, Aposhian HV (2000) Monomethylarsonous acid (MMA(III)) is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 163:203-207.
10. Serrato-Gamiño N, Cervantes C (2017) Diversidad de genes de resistencia a arsénico en procariotas. *Ciencia Nicolaita* 70:80-93.
11. Shen Z, Luangtongkum T, Qiang Z, Jeon B, Wang L, Zhang Q (2014) Identification of a novel membrane transporter mediating resistance to organic arsenic in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother* 58:2021-2029.
- 11a. Shi, K, Li C, Dai X, Fan X, Wang G (2018) A novel efflux transporter, ArsK, is responsible for bacterial resistance to arsenite, antimonite, trivalent roxarsone and methylarsenite. *Appl Environ Microbiol* doi: 10.1128/AEM.01842-18.
12. Wang G, Kennedy SP, Fasiludeen S, Rensing C, DasSarma S (2004) Arsenic resistance in *Halobacterium* sp. strain NRC-1 examined by using an improved gene knockout system. *J Bacteriol* 186:3187-3194.
13. Wang L, Jeon B, Sahin O, Zhang Q (2009) Identification of an arsenic resistance and arsenic-sensing system in *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol* 75:5064-5073.
14. Yan Y, Ye J, Xue XM, Zhu YG (2015) Arsenic demethylation by a C-As lyase in cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 7120. *Environ Sci Technol* 49:14350-14358.
15. Yang HC, Rosen BP (2016) New mechanisms of bacterial arsenic resistance. *Biomed J* 39:5-13.
16. Yang Y, Wu S, Lilley RM, Zhang R (2015) The diversity of membrane transporters encoded in bacterial arsenic-resistance operons. *Peer J* 3:e943.
17. Yoshinaga M, Rosen BP (2014) A C-As lyase for degradation of environmental organoarsenical herbicides and animal husbandry growth promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:7701-7706.
18. Yuan C, Lu X, Qin J, Rosen BP, Le XC (2008) Volatile arsenic species released from *Escherichia coli* expressing the AsIII S-adenosylmethionine methyltransferase gene. *Environ Sci Technol* 42:3201-3206.
19. Zhu YG, Yoshinaga M, Zhao FJ, Rosen BP (2014) Earth abides arsenic biotransformations. *Annu Rev Earth Planet Sci* 42:443-467.