

# Bakterije rezistentne na arsen

---

Miloš, Tina

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:026304>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

**BAKTERIJE REZISTENTNE NA ARSEN**  
**ARSENIC - RESISTANT BACTERIA**  
**SEMINARSKI RAD**

Tina Miloš

Preddiplomski studij biologije

(Undergraduate study of Biology)

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Hrenović

Zagreb, 2018

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>4</b>
<b>2. ARSEN</b> .....	<b>5</b>
2.1 Toksični učinak arsena .....	6
2.2 Kruženje arsena u prirodi .....	6
2.3 Bakterije rezistentne na arsen .....	8
<b>3. BAKTERIJSKI METABOLIZAM ARSENA</b> .....	<b>10</b>
3.1 Geni uključeni u transformaciju arsena .....	11
3.2 Unos i izbacivanje arsena .....	13
3.2.1 Bakterijska oksidacija arsenita .....	13
3.2.2 Bakterijska redukcija arsenata.....	15
3.2.3 Metilacija arsena .....	16
<b>4. ULOGA BAKTERIJA U BIOREMEDIJACIJI ARSENA</b> .....	<b>18</b>
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>20</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>21</b>
<b>7. SAŽETAK</b> .....	<b>24</b>
<b>8. SUMMARY</b> .....	<b>25</b>

## KRATICE

As(0)	Elementarni arsen
As(-III)	Arsenid
As(III)	Arsenit
As(V)	Arsenat
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Arsen-trioksid
AsH <sub>3</sub>	Arsin
ATP	Adenozin trifosfat
CCA	Krom-bakar arsenat
CH <sub>3</sub> AsH <sub>2</sub>	Metilarsin
DMA	Dimetilarsin
DDMAA	Dimetilarsenska kiselina
FeAsS	Arsenopirit
Grx	Glutaredoksin
GSH	Glutation
MMA	Monometilarsin
MMA	Monometilarsenska kiselina
TMA	Trimetilarsin
TMAO	Trimetil-arsin oksid
Trx	Tioredoksin

## 1. UVOD

Teški metali se često nalaze u sastavu prirodnih voda, tla i sedimenta. Iako nisu biorazgradivi, njihova je mobilnost i raspoloživost u okolišu ovisna o različitim procesima, kao što su metilacija, sorpcija, kompleksacija i promjena valencije oksidacijskih stanja [1]. U niskim koncentracijama, metalni ioni čine bitne komponente različitih životnih procesa i često imaju važnu ulogu u enzimskoj sintezi. Međutim, visoke koncentracije mogu biti toksične za mnoge organizme uključujući i ljude.

Arsen spada u skupinu teških metala te se u niskim koncentracijama nalazi u sastavu netopljivih sulfida i sulfatnih soli u gornjim slojevima Zemljine kore. Visoke koncentracije arsena u okolišu su rezultat antropogenih i biogenih aktivnosti. Kontaminacija okoliša arsenom posljedica je primjene različitih herbicida, pesticida i drvnih konzervansa. Osim kontaminacije tla, arsen može dospjeti u podzemne vode, koje se često koriste za piće. U mnogim zemljama poput Japana, Bangladeša, Kine, Čilea i Indije, kontaminacija okoliša arsenom predstavlja veliki problem i rizik za zdravlje ljudi [2]. Unosom arsena u organizam, dolazi do inaktivacije enzima koji su uključeni u DNA replikaciju i popravak, sintezu nukleinskih kiselina i fosfolipida [3]. Anorganski oblici arsena izazivaju lezije kože, tumore pluća, bubrega i jetre, te oštećuju živčani sustav [4]. Iako je toksičan za većinu organizama, neki prokarioti koriste oksidaciju ili redukciju arsena za dobivanje energije. Stoga su mikroorganizmi neophodni u geokemijskom i biokemijskom ciklusu arsena budući da mogu mijenjati njegovu mobilnost, toksičnost i raspoloživost u okolišu putem različitih mehanizama kao što su oksidacija, redukcija i metilacija. Zahvaljujući ovim saznanjima, bakterije rezistentne na visoke koncentracije arsena se mogu potencijalno koristiti u bioremedijaciji arsena iz kontaminiranih podzemnih voda i tako doprinijeti smanjivanju njegove koncentracije i toksičnosti [5].

## 2. ARSEN

Arsen se u prirodi javlja u nekoliko alotropskih modifikacija (sivi, žuti te crni arsen) pri čemu je sivi arsen najčešća modifikacija (Slika 1). Glavni prirodni izvori arsena na Zemljinoj površini su vulkanske aktivnosti i hidrotermalni izvori [6]. Ostali izvori, poput herbicida, insekticida, pesticida, drvnih konzervansa i različitih boja, su rezultat antropogenog utjecaja na okoliš. Arsen može imati nekoliko oksidacijskih stanja; arsenat As(V), arsenit As(III), elementarni arsen As(0) i arsenid As(-III). Arsenit i arsenat su najzastupljeniji oblici u prirodi, te su izrazito toksični, osobito arsenit [5]. Oba oblika arsena mogu inducirati različita oštećenja stanica u biološkim sustavima. Arsenat je strukturni analog fosfata te se može unijeti u stanicu preko sustava za transport fosfata na staničnoj membrani. Arsenat može narušiti metaboličke reakcije koje zahtijevaju fosforilaciju, te inhibirati sintezu adenozin trifosfata (ATP) [7]. Arsenit se unosi u stanicu preko proteinskih kompleksa akvagliceroporina prisutnih u bakterija, kvasaca i sisavaca te se veže za tiolne skupine proteina i tako narušava njihovu strukturu i funkciju [8]. U anoksičnim uvjetima, arsenit se reducira do najtoksičnijih oblika arsena, arsina ( $\text{AsH}_3$ ) i metilarsina ( $\text{CH}_3\text{AsH}_2$ ) [9]. Toksičnost, mobilnost i biološka raspoloživost arsena u okolišu ovisi o oksidacijskom stanju u kojem se nalazi, što otežava njegovo uklanjanje iz kontaminiranih voda [4].



**Slika 1.** Kristal sivog arsena. Preuzeto s

<http://www.assignmentpoint.com/science/chemistry/arsenic.html>

## 2.1 Toksični učinak arsena

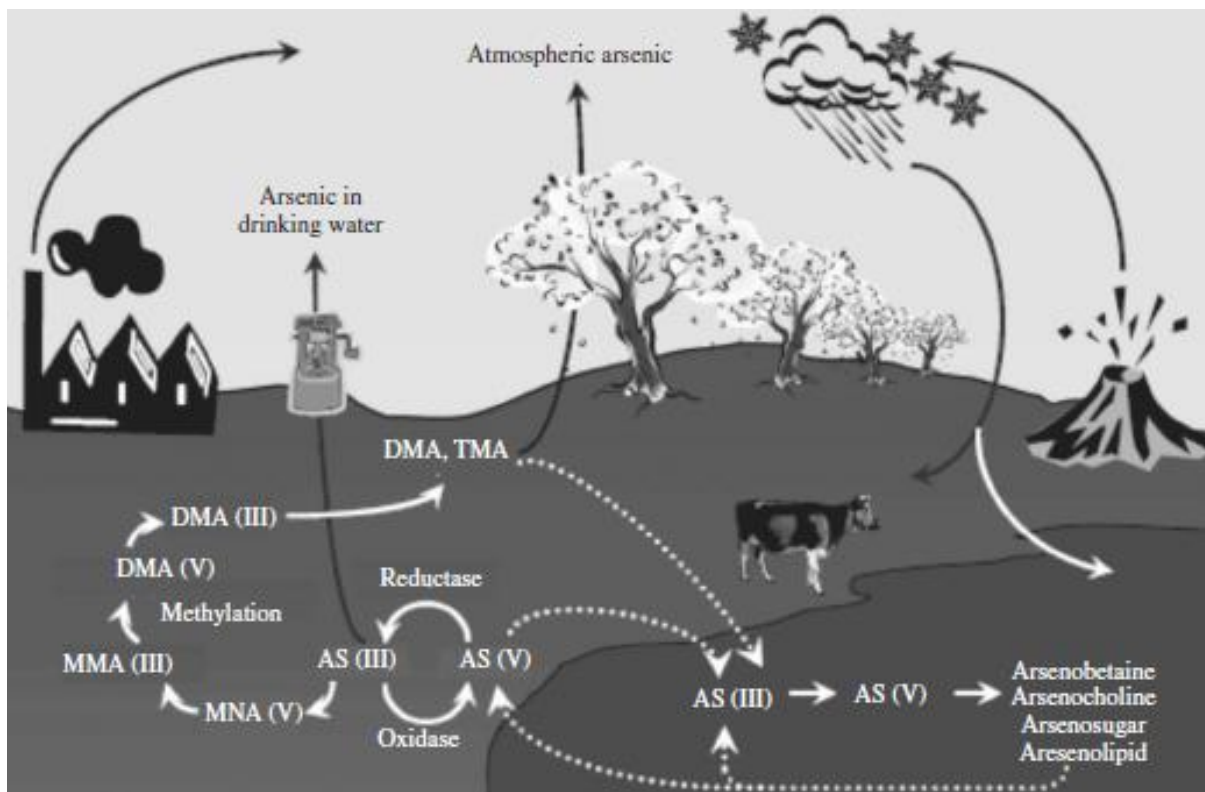
Budući da mikroorganizmi sudjeluju u kruženju arsena, njihova aktivnost u tlu bogatom arsenom može dovesti do kontaminacije prirodnih voda [6]. Također, biljke vrlo lako apsorbiraju arsen, pa visoke koncentracije mogu biti prisutne i u hrani. Arsenat je anorganski oblik arsena, te može biti opasan za ljudsko zdravlje. Morski organizmi ga unose u obliku arsenobetaina pri čemu inhibira kemiosmotsku sintezu ATP-a budući da koristi isti put unosa fosfata u stanicu [3]. Arsenit se veže na tiolne i sulfhidrilne skupine proteina koji se nalaze u tkivima jetre, pluća, bubrega, slezene, te tkivima bogatim keratinom, kao što su koža, kosa i nokti. Osim toga, arsenit inhibira enzime s dehidrogenaznom aktivnosti, kao što su piruvat dehidrogenaza,  $\alpha$ -ketoglutarat dehidrogenaza i dihidrolipoat dehidrogenaza. Izlaganje koncentracijama višim od 0.05 ppm, može izazvati različite štetne učinke na čovjekovo zdravlje [1]. Najčešći simptomi su svrbež, rak kože, gubitak težine i apetita, slabost, kronični poremećaji u disanju, anoreksija, mučnina, bol, te povećanje jetre i slezene [3]. Arsen je poznat i kao karcinogen, stoga može izazvati tumore bubrega, jetre i pluća. Izlaganje arsenu je najčešće putem udisanja, apsorpcijom preko kože i unosom kontaminirane vode. Toksični učinak arsena inaktivira gotovo 200 enzima, osobito one uključene u stanične energetske puteve, te DNA replikaciju i popravak [3].

## 2.2 Kruženje arsena u prirodi

Arsen je široko rasprostranjen u Zemljinoj kori, u prosječnoj koncentraciji od 2 mg/kg ili 1 ppm [10]. Često se nalazi u asocijaciji s ostalim mineralima, kao što su sulfidi i sulfatne soli te ulazi u sastav stijena, tla, vode i sedimenta. Jedan je od glavnih sastojaka u gotovo 200 pronađenih minerala, a najpoznatiji među njima je arsenopirit ( $\text{FeAsS}$ ) [10]. Arsenopirit je najčešći mineralni oblik arsena te je često u kompleksu s drugim elementima, kao što su zlato i bakar. Prirodni izvori arsena su vulkanske erupcije i hidrotermalni izvori npr. gejziri. Rudarstvo, taljenje bakra i paljenje ugljena mogu uzrokovati onečišćenje okoliša arsenom. Također, primjena herbicida, drvnih konzervansa, hrane za životinje i insekticida često uzrokuje povećanje koncentracije arsena u prirodi. Primjerice, stabla se tretiraju krom-bakar arsenatom (CCA) koji sadrži anorganski oblik arsena kako bi se zaštitila od gljivica i insekata, dok se kalcijeve i natrijeve soli monometilarsenata (MMA) i dimetilarsenata (DMA) koriste kao herbicidi i insekticidi [6].

Elementarni arsen je u prirodi rijetko prisutan, a nastaje redukcijom arsen-trioksida ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) koji je nusprodukt taljenja bakra [10]. Češće zastupljeni oblici arsena su arsenit As(III), arsenat As(V) i arsenid As(-III). Arsenit je izrazito toksičan, a njegovom oksidacijom nastaje manje

toksičan oblik arsena, arsenat. Osim oksidacije, arsen podliježe i reakcijama redukcije i metilacije, a te procese obavljaju mikroorganizmi. Upravo zbog sposobnosti obavljanja ovih procesa, mikroorganizmi imaju važnu ulogu u kruženju arsena u prirodi. Njihovom aktivnošću može nastati i nestabilni plin arsin ( $\text{AsH}_3$ ), a metilacijom anorganskih oblika arsena nastaju spojevi kao što su monometilarsenska kiselina (MMA), dimetilarsenska kiselina (DMA) i trimetil-arsin oksid (TMAO). Daljnjom oksidacijom ovih metiliranih oblika, nastaje monometilarsin (MMA), dimetilarsin (DMA) i trimetilarsin (TMA). Ovi oblici arsena su izrazito nestabilni i brzo se otpuštaju u atmosferu, dok su manje koncentracije prisutne i u tlu [10]. Osim toga, postoje i demetilirajući mikroorganizmi, koji svojom aktivnošću metilirane oblike pretvaraju u anorganske oblike. Morski mikroorganizmi mogu pretvoriti anorganske oblike arsena u, vodi ili lipidima topljive, organske vrste arsena. Ovo uključuje nastanak dimetilnih i trimetilnih arseničkih derivata, arsenokolina, arsenobetaina, arseničkih lipida i šećera. Arsenobetain se može razgraditi na anorganske oblike arsena pomoću mikrobnog metabolizma, zatvarajući tako ciklus arsena u moru (Slika 2).



**Slika 2. Ciklus kruženja arsena u prirodi.** Arsen se otpušta u okoliš kao rezultat vulkanskih aktivnosti, hidrotermalnih izvora i antropogenog djelovanja. Ulazi u sastav vode, tla, zraka i sedimenta. Najčešći oblici su arsenat i arsenit, te nestabilni plin arsin, koji se otpušta u atmosferu.



Arsenit oksidacijom prelazi u arsenat, a arsenat se reducira ponovno u arsenit. Arsenat ulazi u sastav minerala (arsenobetain, arsenokolin, te arseno-šećeri i arseno-lipidi). Arsenit se može metilirati u različite oblike kao što su MMA, DMA i TMA koji se otpuštaju u atmosferu. Glavnu ulogu u ovom kruženju arsena imaju mikroorganizmi koji obavljaju ove procese oksidacije, redukcije i metilacije. Preuzeto iz [10].

### 2.3 Bakterije rezistentne na arsen

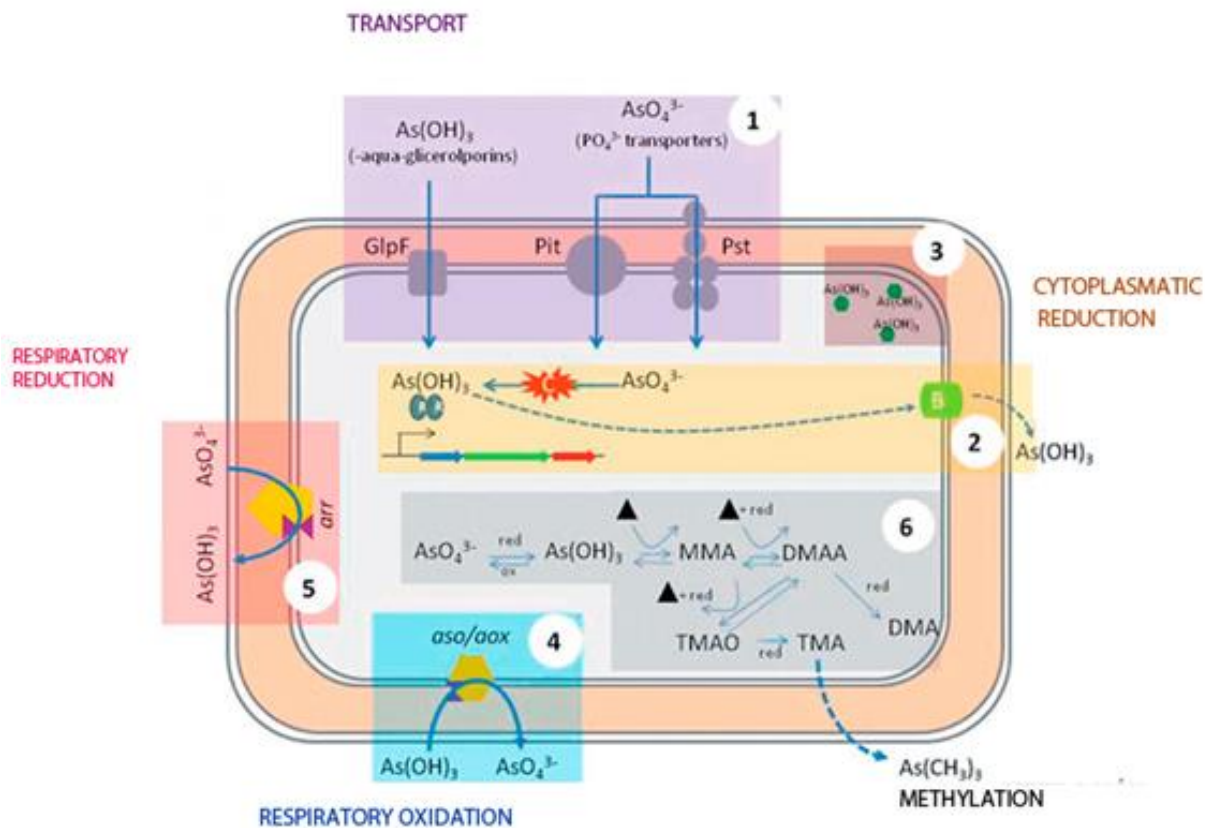
Mikroorganizmi prisutni u geokemijskom okolišu arsena utječu na njegov biokemijski ciklus pretvorbom arsenskih oblika različite topljivosti, mobilnosti, toksičnosti i biološke raspoloživosti u okolišu. Nekoliko bakterija iz različitih filogenetskih grupa je uključeno u transformacijske procese arsena putem reakcija oksidacije, redukcije i metilacije. U posljednjih nekoliko godina opisan je veliki broj arsenit-oksidirajućih i arsenat-reducirajućih bakterija. Bakterije koje su izolirane iz okoliša bogatog arsenom, pripadaju redovima *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Thiobacillus*, *Agrobacterium*, *Acinetobacter*, *Comamonas*, *Stenotrophomonas*, *Delftia* i *Bacillus* [1,9]. Većina As(III)-oksidirajućih bakterija su heterotrofi, što znači da energiju ne dobivaju oksidacijom As(III) [1]. Postoji 6 mehanizama koji mikroorganizmima omogućuju rezistenciju na toksičnost arsena: nepropusnost membrane za arsen, unutar- i izvanstanično odvajanje, aktivno izbacivanje, enzimatska redukcija te smanjivanje osjetljivosti različitih staničnih meta na arsen [10]. Opisan je veliki broj bakterija koje su rezistentne na toksični učinak arsena (Tablica 1). Bakterije, kao što su *Pseudomonas arsenitoxidans*, *Thermus aquaticus* i *T. thermophilus* oksidiraju tj. detoksificiraju As(III) u As(V) [2]. Suprotno tomu, *Sulfurospirillum barnesii*, *Desulfotomaculum auripigmentum*, *Bacillus arsenicoselenatis*, *Crysiogenes arsenatis*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas* i *Wolinella* reduciraju As(V) u As(III), dok su u soja *Thermus*, prisutna oba mehanizma, As(III) oksidacija i As(V) redukcija [10]. U procesu metilacije arsenskih oblika sudjeluju mikroorganizmi kao što su *Penicillium* sp., *Chlorella vulgaris*, *Polyophysa peniculus*, *Fusarium oxysporum meloni*, *Closterium aciculare* *Methanobacterium formicicum*.

**Tablica 1. Bakterije rezistentne na arsen.** U tablici je prikazana podjela mikroorganizama prema mehanizmu rezistencije na arsen. Preuzeto s [10,11]

Oksidacija	Redukcija	Metilacija
<i>Pseudomonas arsenitoxidans</i>	<i>Sulfurospirillum barnesii</i>	<i>Penicillium sp.</i>
<i>Thermus aquaticus</i>	<i>Desulfotomaculum auripigmentum</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>
<i>Thermus thermophilus</i>	<i>Bacillus arsenicoselenatis</i>	<i>Polyophysa peniculus</i>
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	<i>Crysiogenes arsenatis</i>	<i>Fusarium oxysporum meloni</i>
<i>Thiomonas arsenivorans</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Closterium aciculare</i>
	<i>Wolinella</i>	<i>Methanobacterium formicicum</i>
	<i>Sphingomonas</i>	

### 3. BAKTERIJSKI METABOLIZAM ARSENA

Mnogi tipovi transformacije arsena zabilježeni u različitim mikroorganizmima omogućuju raspodjelu arsena u prirodi putem reakcija oksidacije i redukcije. Mikroorganizmi imaju nekoliko mehanizama koji im omogućuju rezistenciju: oksidacija arsenita, redukcija arsenata, metilacija anorganskog arsena te izbacivanje arsenita iz stanice (Slika 3). Rezistencija na arsenit i arsenat je široko prisutna kod gram-negativnih i gram-pozitivnih bakterija. Organizmi uzimaju As(V) putem fosfatnih transportera, a As(III) preko membranskih proteina, gliceroporina (Slika 3). As(V) se dalje reducira do As(III) koji se izbacuje iz stanice ili se prenosi u unutarstanične odjeljke, u obliku slobodnog arsena ili konjugiranog s glutationom. Međutim, arsen može biti i metilirana što onda može povećati njegovu toksičnost i tako smanjiti detoksifikaciju. Najbolje opisana detoksifikacija, putem redukcije As(V), je u bakterije *E. coli*, ali je zabilježena i kod drugih bakterija kao što su *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Acidithiobacillus* i *Pseudomonas* [12].



**Slika 3. Glavni mehanizmi prokariotske rezistencije na arsen.** 1) Arsenat ulazi u stanicu kroz fosfatne kanale dok arsenit ulazi kroz akvagliceroporine (2) Arsenat se reducira do arsenita

pomoću ArsC te izbacuje kroz ArsB. **3)** Anorganski arsen se može kompleksirati s peptidnim cisteinima **4)** Arsenit može biti elektron-donor te se oksidirati u arsenat. **5)** Arsenat se može koristiti kao završni elektron-akceptor tijekom staničnog disanja. **6)** Anorganski arsen se može transformirati i u organske oblike pomoću metilnih kaskada u procesu metilacije. Preuzeto iz [13].

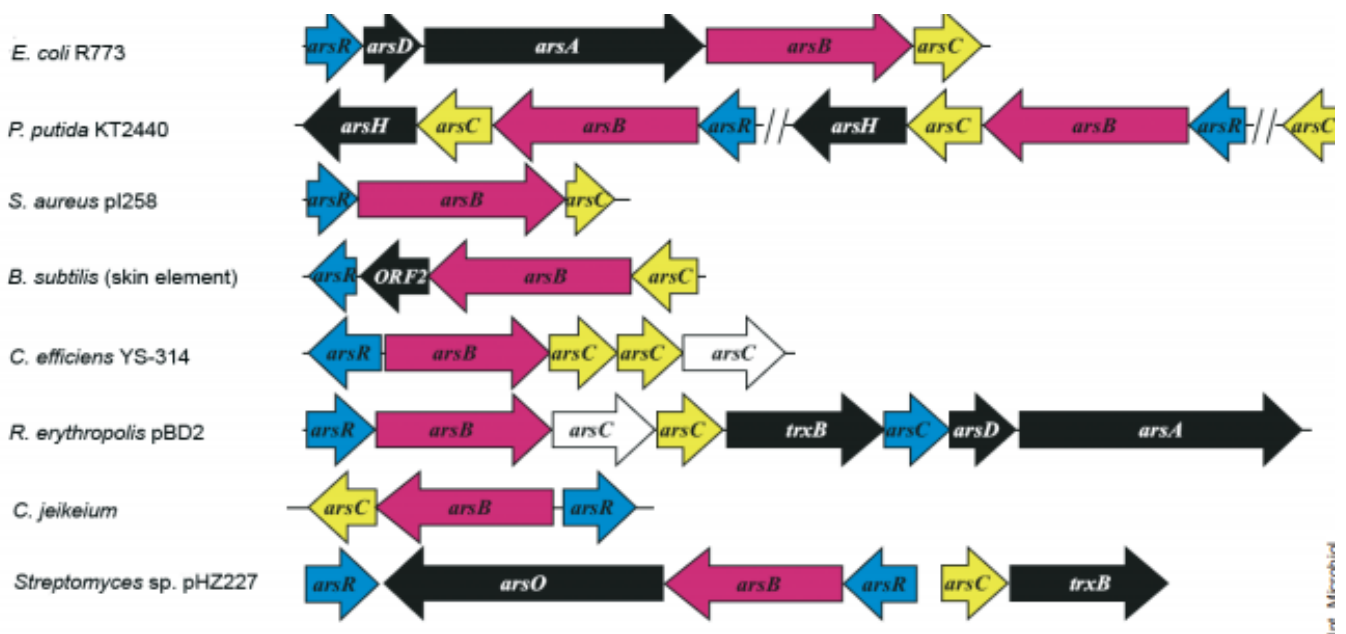
### 3.1 Geni uključeni u transformaciju arsena

Geni koji su odgovorni za rezistenciju na arsen su organizirani u jednu transkripcijsku jedinicu, operone, a nalaze se na plazmidu ili kromosomu bakterija i arheja (Slika 4). Bakterija *E. coli* na plazmidu R773 sadrži pet gena; arsR, arsD, arsA, arsB i arsC, koji čine operon arsRDABC, dok plazmid pI258 iz *Staphylococcus aureus* sadrži tri gena, arsR, arsB i arsC, čineći tako operon arsRBC. Postoje dvije različite obitelji arsenitnog transportera u bakterija, a to su arsB i Acr3p [10]. ArsB obitelj uključuje integralne membranske proteine *E. coli* plazmida R773 i plazmida pI258 bakterije *S. aureus*. ArsB permeaza djeluje kao uniporter koji koristi membranski potencijal za izbacivanje arsenita. ArsA je unutarstanični ATP-azni protein, koji se veže kao dimer za membranu. Kada se poveže s ArsA, ArsB permeaza postaje učinkovitija i povećava se arsenitna rezistencija jer je izbacivanje arsenita iz stanice vođeno ATP pumpom [8]. Međutim, puno manje se zna o drugoj obitelji arsenitnih transportera poput Acr3p. Članovi ove obitelji su pronađeni u bakterija, arheja i gljiva. Opisani su u samo nekoliko vrsta kao što su *Bacillus subtilis*, *Synechocystis* sp., *Corynebacterium glutamicum* i *Saccharomyces cerevisiae*. Acr3p proteini u *B. subtilis* i *S. cerevisiae* su specifični za transport arsenita, dok je kod *Synechocystis* sp. Acr3p homolog uključen u izbacivanje i arsenita i antimonita [8].

ArsR i arsD su regulatorni geni koji djeluju kao transkripcijski represori i regulatori gornje razine genske ekspresije ars operona. U ovom slučaju, ArsR djeluje kao transkripcijski represor uključen u regulaciju cijelog ars operona, a ArsD je sekundarni represor koji kontrolira gornje razine genske ekspresije ars operona [14]. Osim toga, ArsD djeluje i kao šaperon koji prenosi arsenit iz kompleksa s glutationom na podjedinicu ArsA kompleksa ArsAB, koji se pritom aktivira [15]. Za unutarstaničnu redukciju arsenata, koja se odvija u citosolu, odgovoran je enzim arsenat-reduktaza kodirana genom arsC (Slika 5C). Arsenat-reduktaza reducira arsenat u arsenit, koji se potom izbacuje iz stanice pomoću membranskih transportera kodiranih genom arsB ili kompleksom ArsAB. Međutim, redukcija se može odvijati i kao dio anaerobne arsenske respiracije kod nekih bakterija, kao što je *Shewanella*, soj ANA-3 [16]. U ovom slučaju arsenat

služi kao terminalni elektron-akceptor. Respiratorna arsenat-reduktaza kodirana je genima *arrA* i *arrB*, koji su dio *arr* operona (Slika 5B). *Arr* geni čine operon koji je kromosomski povezan s *ars* operonom, ali su različito eksprimirani [12].

Arsenit-oksidirajuće bakterije oksidiraju arsenit pomoću enzima arsenit-oksidaze (*aox*), koja se nalazi u periplazmi (Slika 5A). Ovaj enzim zabilježen je i kod heterotrofnih i kod kemolitotrofnih bakterija [10]. Većina arsenit-oksidaza, kao što je *aoxAB* bakterije *Hydrogenophaga* sp., soj NT-14, djeluju kao heterodimeri i u katalitičkom mjestu sadrže željezo i molbiden [16]. Osim reakcija redukcije i oksidacije neke bakterije imaju gen *arsM* čiji produkt sudjeluju u metilaciji arsenita [10].



**Slika 4. Geni uključeni u rezistenciju na arsen prisutnih u različitim organizama.** Geni uključeni u transformaciju arsena su organizirani u operone te se mogu nalaziti na kromosomu ili plazmidu bakterija. Preuzeto iz [12].

### 3.2 Unos i izbacivanje arsena

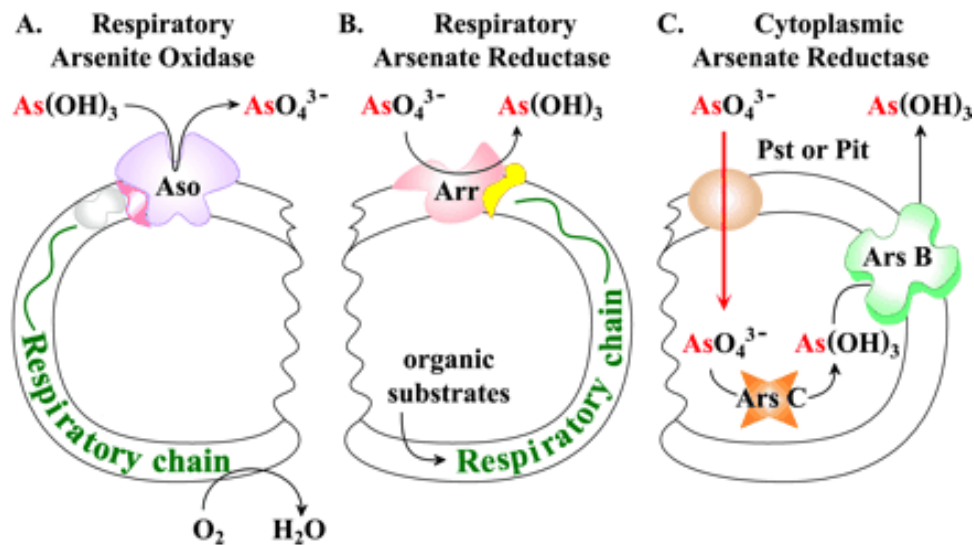
Molekularna sličnost arsena s drugim supstratima različitih membranskih transportera, omogućuje bakterijama unos arsena iz okoliša. U vodenom okruženju, As(III) je prisutan kao As(OH)<sub>3</sub> koji je strukturno sličan glicerolu. S druge strane, As(V) je strukturni analog fosfatu te se unosi u stanicu preko membranskih fosfatnih transportera. U *E. coli* su prisutna dva fosfatna transportera, Pit i Pst, koji omogućuju unos arsena u stanicu. Pst je specifični fosfatni transportni sustav, dok Pit koristi općeniti transportni mehanizam te predstavlja glavni put ulaska arsena u stanicu. Strukturna sličnost arsenata i fosfata, omogućuje lakši unos arsenata preko Pit transportnog sustava [15]. Arsenit, As(III), se unosi preko GlpF koji spada u akvagliceroporine (Slika 3).

Izbacivanje arsena iz bakterija se odvija putem dva mehanizma. Prvi mehanizam se odvija putem proteinskog nosača za arsenit, gdje energiju osigurava membranski potencijal stanice. Drugi mehanizam osigurava energiju za prijenos preko razgradnje ATP-a [15]. U ove procese je uključeno nekoliko različitih gena. Bakterije mogu imati operon od 3 gena, arsRBC, te operon koji nosi 5 gena, arsRDABC. Kod bakterija koje sadrže operon arsRBC, ArsB sudjeluje u izbacivanju arsenita iz stanice, dok bakterije koje imaju operon arsRDABC, arsenit izbacuju pomoću ArsAB kompleksa. ArsA kodira unutarstaničnu ATP-azu, koja se veže za membranski protein ArsB te kada se ova dva proteina nađu u koekspresiji nastaje arsenit-translocirajući kompleks ArsAB. Budući da ArsAB-ATPaza učinkovitije izbacuje arsenit iz stanice, bakterije koje imaju operon arsRDABC su rezistentnije na arsen od bakterija koje imaju operon arsRBC [10].

#### 3.2.1 Bakterijska oksidacija arsenita

Oksidacija As(III) može biti vrlo važna za uklanjanje arsena, s obzirom da je As(V) manje topljiv i lakše se uklanja pomoću fizikalno-kemijskih metoda [16]. Arsenit-oksidirajuće bakterije imaju sposobnost oksidacije As(III) pomoću enzima arsenit-oksidaze, a taj proces se odvija u periplazmi bakterije (Slika 5A). U arsenit-oksidirajuće bakterije spadaju i kemolitotrofne i heterotrofne bakterije. Arsenit-oksidaza je pronađena kod  $\beta$ -proteobakterija, heterotrofnog soja NT-14 vrste *Hydrogenophaga* te kemolitotrofnog soja NT-26 vrste *Rhizobium* sp. [6]. Ove bakterije koriste redukcijski potencijal dobiven oksidacijom As(III) za vlastiti rast. Geni koji kodiraju arsenit-oksidazu kod bakterije *Agrobacterium tumefaciens* su regulirani senzorno-kinaznim sustavom, koji se sastoji od dvije komponente; senzorna kinaza (AoxS) i regulator

odgovora (AoxR) [6]. AoxS je senzorna kinaza koja osjeća prisutnost arsenita i aktivira regulatorni protein, AoxR. AoxR zajedno s RpoN (alternativni oblik  $\sigma_{54}$  RNA polimeraze), kontrolira ekspresiju aox operona. RpoN je neophodan za inicijaciju transkripcije arsenitne oksidaze u *Agrobacterium tumefaciens* [15]. Kod bakterije *Herminiimonas arsenicoxydans*, heat-shock protein DnaJ je odgovoran za pravilno smatanje proteinskog regulatora AoxR. Osim toga, DnaJ je esencijalan i za ekspresiju flhDC, flagelarnog operona u *E. coli*, koji je uključen u pokretanje bakterije [15]. Najbolje opisana arsenit-oksidaze je nađena u bakterije *Alcaligenes faecalis*. Ovaj enzim sadrži dvije podjedinice, koje kodiraju geni aoxA/aroB/asoB (mala Fe-S Rieske podjedinica), te aoxB/aroA/asoA (velika molbiden-pterin podjedinica) [17]. AoxAB kompleks tj. arsenit-oksidaza, se sintetizira nakon ekspresije aox operona i prenosi se u periplazmu pomoću Tat (*Twin-Arginine* translokacija) prijenosnog puta, a potom se u periplazmi odvija oksidacija As(III) u As(V) [15]. As(V) je manje toksičan oblik arsena od As(III), pa se oksidacijska sposobnost arsenit-oksidirajućih bakterija može primjenjivati u bioremedijaciji arsena, jer se As(V) može imobilizirati i vezati na adsorbens, koji se inače koristi u tehnologiji uklanjanja teških metala iz okoliša [18].



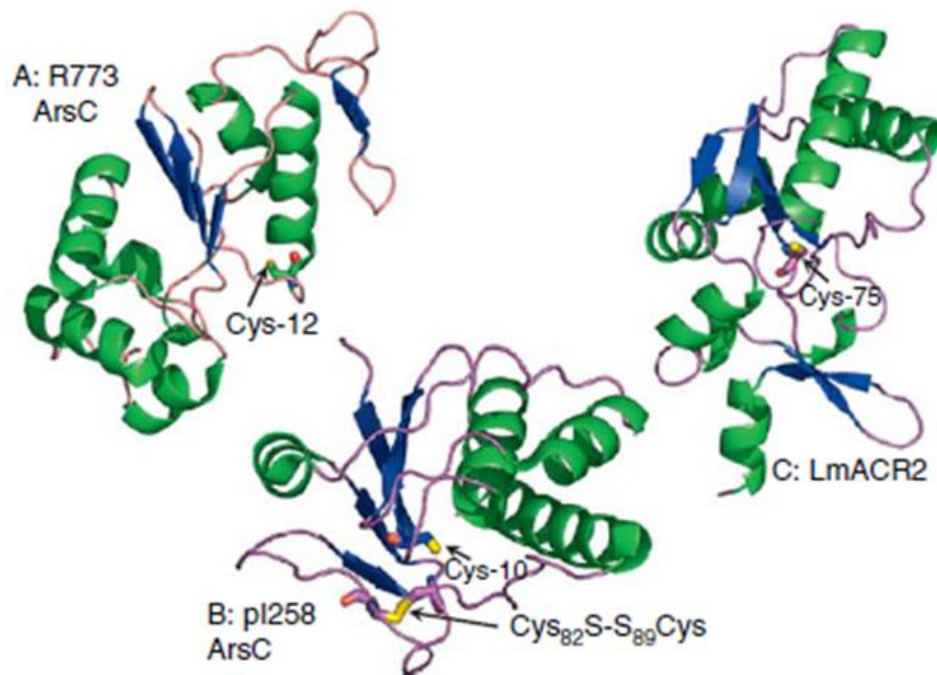
**Slika 5. Stanična lokacija i funkcija bakterijske arsenit-oksidaze, respiratorne arsenat-reduktaze i citoplazmatske arsenat-reduktaze. A) Arsenit-oksidaza sudjeluje u oksidaciji arsenita u manje toksičan oblik, arsenat. B) Respiratorna arsenat-reduktaza reducira arsenat u arsenit. C) Citoplazmatska arsenat-reduktaza u citosolu reducira arsenat u arsenit pomoću ArsC, a nastali arsenit se izbacuje iz stanice pomoću ArsB. Preuzeto iz [17].**

### 3.2.2 Bakterijska redukcija arsenata

Postoje dva tipa redukcije arsenata kod prokariota: periplazmatska (respiratorna) te citoplazmatska redukcija. Kod periplazmatske redukcije, arsenat-reduktaza reducira arsenat tijekom procesa anaerobne respiracije arsena kod nekih bakterija i arheja (Slika 5B). Ove arsenat-reduktaze su heterodimerni proteini smješteni u periplazmi ili povezani s membranom [12]. Prisutne su u bakterija kao što su *Chrysiogenes arsenatis*, *Bacillus selenitireducens* i *Shewanella* [17]. Tijekom anaerobnog rasta odvija se redukcija arsenata koji služi kao elektron-akceptor preko anaerobnih respiratornih enzima, pri čemu se osigurava energija za rast i proizvodi arsenit. Geni koji kodiraju za arsenat-reduktazu kod bakterije *Shewanella* su organizirani u arr operon koji je kromosomno povezan s ars operonom [12]. Bakterija *Chrysiogenes arsenatis* koristi acetat kao elektron-donor u anaerobnoj arsenskoj respiraciji pomoću arsenat-reduktaznog enzima, ArrAB. ArrAB je dimer smješten u periplazmi i sastoji se od dvije podjedinice; ArrA i ArrB (Slika 6). ArrAB geni su eksprimirani u anaerobnim uvjetima pri nanomolarnim koncentracijama arsenita i arsenata. Međutim, kada razina arsena u okolišu naraste do toksičnih granica, ars operon se eksprimira bez obzira na prisutnost kisika [6].

Kad se As(V) unese u stanicu preko Pst i Pit membranskih transportera, ArsC i arsenat-reduktaza reduciraju As(V) do As(III), pri čemu se As(III) izbacuje iz stanice preko ArsAB pumpe (Slika 6C). U citoplazmatskoj redukciji, ArsC koristi glutaredoksine, koji služe kao izvor redukcijskog potencijala. U ovoj kaskadnoj reakciji, arsenat se prvo veže na anionsko mjesto u ArsC i onda formira intermedijer, arsenatni tioester. Intermedijer se reducira u dva koraka preko glutaredoksina i glutaciona, stvarajući Cistein2-S-As(III) intermedijer, koji se hidrolizira i oslobađa arsenit. Reducirani As(III) se izbacuje iz stanice ili se skladišti u unutarstanične odjeljke u obliku slobodnog arsenita ili konjugiranog s glutationom [15]. Citoplazmatska arsenat-reduktaza je uglavnom kodirana ars operonom. Postoje tri neovisne i nepovezane obitelji arsenat reduktaze. U prvu obitelj arsenat-reduktaze spadaju kromosomna i plazmidna ArsC, bakterije *E. coli*, koja koristi glutaredoksine (Grx) i glutatione (GSH) kao reducense. Druga obitelj uključuje ArsC na plazmidu pI258 kod *S. aureus* i kromosomnu ArsC kod *Bacillus subtilis*, koje koriste tioredoksine (Trx) kao reducense (Slika 5B). Treća obitelj arsenat-reduktaza uključuje uglavnom eukariotske mikroorganizme, kao što je Acr2p *Saccharomyces cerevisiae* i LmACR2 *Leishmania major*. Ove tri obitelji arsenat-reduktaza nisu slične u strukturi te su nastale kao posljedica konvergentne evolucije.



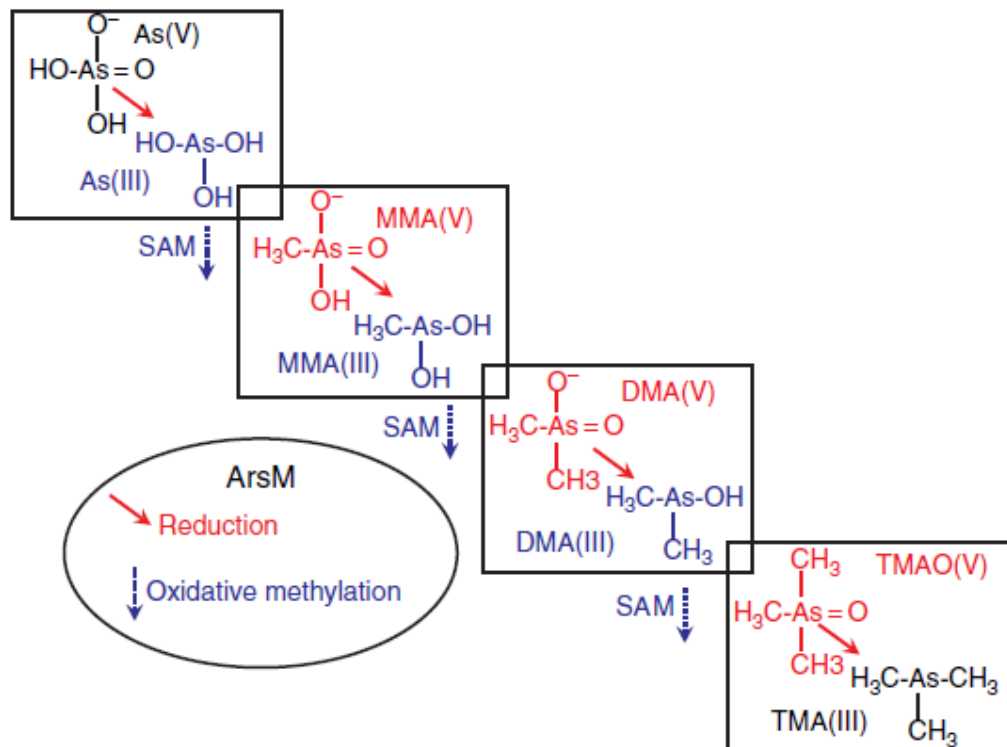


**Slika 6. Struktura arsenat-reduktaze.** A) i B) Sekundarna struktura ArsC na plazmidu R773 i pl258 sadrži katalitičke cisteine u aktivnim mjestima. C) Sekundarna struktura ArsC kod bakterije *Leishmania* LmACR2, koja ima slično aktivno mjesto kao i ljudski protein Cdc25a. Preuzeto iz [6].

### 3.2.3 Metilacija arsena

Mehanizam biometilacije arsena se naziva *Challenger* put [6]. Pritom se pentavalentni oblici arsena reduciraju u trivalentne, nakon čega dolazi do oksidativne metilacije (Slika 7). Pentavalentni oblici arsena su monometilarsenat (MMA(V)), dimetilarsenat (DMA(V)) i trimetilarsin-oksidi, a trivalentni su MMA(III), DMA(III) i TMA(III). Ljudi i neki sisavci mogu metilirati anorganski arsen, koji se u metiliranom obliku, kao što je DDMA(V) i MMA(V), izlučuju putem urina što upućuje na to da je metilacija zapravo oblik detoksifikacije [6]. Međutim, trivalentni intermedijeri, koji nastaju u ovom procesu su toksičniji od anorganskih oblika arsena, što sugerira da metilacija pretvara aktivne anorganske oblike arsena u toksičnije metabolite. Stoga, nije u potpunosti poznato je li metilacija detoksifikacijski proces kod sisavaca. Kod bakterija i arheja postoji veliki broj gena koji su homologni ljudskim metilazama arsena. Geni kontrolirani arsR genom nazivaju se arsM, a njihov proteinski produkt je ArsM ili arsenit S-adenozilmetiltransferaza. Ekspresija arsM omogućuje rezistenciju na As(III) kod *E. coli* u odsutnosti svih ostalih ars gena, što ukazuje da je metilacija dovoljna za detoksifikaciju arsena

[6]. ArsM pretvara As(III) u DMA(V), TMAO(V) i TMA(III). Iako je TMA(III) više toksičan od arsenita, ne zadržava se u stanici jer je nestabilan u plinovitom stanju [6]. S obzirom da su homoloji arsM gena prisutni u svakom carstvu, transformacija posredovana mikroorganizmima može imati značajnu ulogu u globalnom kruženju arsena [6].



**Slika 7. Challenger put metilacije arsena.** Shema prikazuje 4 redukcijska koraka i 3 metilacije uz nastanak konačnog produkta, plina TMA(III). U svakom se koraku pentavalentni oblik arsena reducira do trivalentnog oblika (crveno), koji se onda oksidativno metilira pomoću S-adenozilmetioninom, uz nastanak pentavalentnih oblika (plavo). Preuzeto iz [6].

#### 4. ULOGA BAKTERIJA U BIOREMEDIJACIJI ARSENA

Bioremedijacija je proces koji koristi mikroorganizme ili biljke u svrhu vraćanja zagađenog okoliša u prirodni oblik [19]. Većina bioremedijacijskih procesa uključuje redoks reakcije, gdje elektron-donor daje elektrone elektron-akceptoru, pri čemu se elektron-donor oksidira, a elektron-akceptor reducira. Reakcije oksidacije i redukcije se mogu odvijati u anaerobnim ili aerobnim uvjetima. U bioremedijaciji se koriste bakterije, gljive ili biljke kako bi se smanjio stupanj onečišćenja i uklonilo iz okoliša štetne i za zdravlje opasne tvari. Mikroorganizmi koji se koriste, mogu biti već prisutni na kontaminiranom području ili se mogu izolirati i donijeti na kontaminirano područje. Oni, putem različitih reakcija koje su dio njihovih metaboličkih procesa, transformiraju štetne tvari. Postoji nekoliko konvencionalnih metoda za uklanjanje arsena kao što su koagulacija, obrnuta osmoza, adsorpcija, filtracija itd. [20]. Tijekom ovih procesa, pod normalnim atmosferskim uvjetima, odvija se reakcija s kisikom, pri čemu dolazi do oksidacije As(III) u As(V). Problem je što su ovi procesi vrlo spori. Drugi način je reakcija s jakim oksidansima, kao što su vodikov peroksid, klorin ili ozon. Ove reakcije se odvijaju puno brže, ali dolazi do oslobađanja štetnih nusprodukata [21].

U posljednjih nekoliko godina opisan je veliki broj arsenit-oksidirajućih i arsenat-reducirajućih bakterija. U njih spadaju rodovi *Acinetobacter*, *Comamonas*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Delftia*, *Agrobacterium* i *Bacillus* [15]. Bakterije koriste arsen u anaerobnim uvjetima kao elektron-akceptor, ali mogu koristiti kisik i arsen kao elektron-donore. Soj bakterija *Aeromonas*, CA1, koristi drugačiji put redukcije arsenata, s obzirom da ne posjeduje gene *arsB* i *arsC* [15]. S druge strane, soj WK6 (*Exiguobacterium*) ima *arsB*, ali ne i *arsC*, što ukazuje na *arsC*-neovisni put. *Chrysiogenes arsenatis* može živjeti u aerobnim uvjetima koristeći arsenat kao terminalni elektron-akceptor i acetat kao elektron-donor [22]. Novi soj MM-7 je prva zabilježena As(III) oksidirajuća bakterija iz roda *Stenotrophomonas*, koja može u potpunosti oksidirati 500  $\mu\text{M}$  arsenita u 12h u inkubaciji, pri pH 5-7 [20]. Također, *Rehman i sur.* su otkrili da je bakterija *Pseudomonas lubricans* otporna na visoke koncentracije arsena (do 3 mg/ml) [15]. Ova saznanja mogu koristiti u tehnologiji bioremedijacije za uklanjanje arsena iz okoliša osobito u zemljama koje su izložene visokim koncentracijama arsena i kod kojih postoji opasnost izlaganja njegovom toksičnom učinku. U bioremedijaciji arsena se koristi nekoliko metoda, kao što su primjena biosorbensa, bioakumulacija te genetički modificirane bakterije koje mogu akumulirati arsen. Korištenje mikroorganizama kao selektivnih biosorbensa je jedna od novijih metoda koje se koriste za efikasno uklanjanje arsena iz okoliša [16]. Mikrobna biosorpcija može biti aktivna,

pasivna ili oboje, ovisno o načinu unosa arsena. Pasivni unos je uglavnom nespecifičan za metalne vrste, dok je aktivni unos spor proces i ovisi o metabolizmu stanice. Kod aktivnih procesa, specifični proteini, kao što je metalotionini formiraju komplekse s teškim metalima. Komponente stanične stjenke poput hitina, hitozana te glukana predstavljaju efikasne biosorbense, ali i stjenke gljiva, kvasaca i algi, također mogu djelovati kao biosorbensi za metale [15].

Bioakumulacija je transportni sustav teških metala ovisan o energiji. Potencijal bioakumulacijskih procesa izlaska teških metala preko stanične membrane uključuje ionske kanale, prijenos putem nosača, endocitoza i lipidna permeacija [15]. Među svim mogućim bioremedijacijskim procesima za uklanjanje arsena iz okoliša, najviše se koristi unutarstanična akumulacija. Kada se vrsta *Lysinibacillus sphaericus*, soj B1-CDA, izloži arsenatu, dolazi do unosa i akumulacije različitih oblika arsena (slobodni arsen, meta-arsenit, orto-arsenit i arsenat), unutar stanice. Mutant *Corynebacterium glutamicum*, također ima sposobnost akumulacije arsena unutar stanice, a arsenatna akumulacija je povećana tako što su uklonjene arsenat reduktaza (*arsC*) i *Acr3* sustav za izbacivanje arsena iz stanice. U ovom slučaju, arsenatna akumulacija povećana je za 28-30 puta u odnosu na kontrolni soj [15]

## 5. ZAKLJUČAK

Arsen je u okolišu široko rasprostranjen i prisutan u nekoliko oksidacijskih stanja među kojima su neki izrazito toksični, npr. arsenit i plin arsin. Prirodni izvori arsena, ali i antropogeni učinak te aktivnost mikroorganizama doprinose povišenoj koncentraciji arsena u prirodi. Problem nastaje kada se arsen nađe u vodi ili hrani koja se unosi u organizam, što za većinu organizama može biti fatalno. Međutim, neki mikroorganizmi imaju nekoliko mehanizama za detoksifikaciju arsena, putem kojih dobivaju energiju za vlastiti rast i aktivnost. Bakterije unose arsen u organizam, te ga putem reakcija redukcije, oksidacije ili metilacije, prerađuju u različite oblike, koje onda ili akumuliraju ili izbacuju iz stanice. Stoga je nesumnjivo da mikrobna aktivnost može pogoršati okolišne probleme, otpuštajući arsen i kontaminirajući okoliš. Zbog toga je jako važno razumijevanje ovih procesa kako bi se umanjio štetan učinak arsena na okoliš. Mikrobni metabolizam arsena bi se mogao koristiti za bioremedijaciju okoliša kontaminiranog arsenom. Stoga znanstvenici sve više rade na razvoju metoda koje će koristiti mikroorganizme koji imaju sposobnost oksidacije izrazito toksičnog arsenita, u manje toksičan arsenat. Arsenat je manje topljiv od arsenita i lakše se može vezati za biosorbense koji se inače koriste za uklanjanje teških metala iz okoliša. Isto tako, nastoji se genetički modificirati organizme koji imaju sposobnost akumulacije toksičnog arsenita kako bi akumulirali što višu koncentraciju arsenita unutar stanice.

Ova otkrića omogućuju razumijevanje funkcije, raznolikosti i evolucije bakterija rezistentnih na arsen. Biosorbensi, bioakumulacija i genetički modificirani organizmi koji imaju mogućnost akumulacije visoke koncentracije arsena, predstavljaju nove metode u bioremedijaciji arsena. Stoga su većina istraživanja, koji u središtu interesa imaju ovo područje mikrobiologije, usmjerena prema razvoju mehanizama i metoda koje će doprinijeti smanjenju koncentracije arsena u zemljama koje imaju rizik izlaganja toksičnom učinku arsena.

## 6. LITERATURA

- [1] M. A. Jebelli, A. Maleki, M. A. Amoozegar, E. Kalantar, B. Shahmoradi, and F. Gharibi, "Isolation and identification of indigenous prokaryotic bacteria from arsenic-contaminated water resources and their impact on arsenic transformation," *Ecotoxicology Environmental Safety*, vol. 140, pp. 170–176, 2017.
- [2] A. Hartwig, U. D. Gröblichhoff, D. Beyersmann, A. T. Natarajan, R. Filon, and L. H. F. Mullenders, "Interaction of arsenic(III) with nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts," *Carcinogenesis*, vol. 18, no. 2, pp. 399–405, 1997.
- [3] R. N. Ratnaik, "Acute and chronic arsenic toxicity," *Postgraduate Medical Journal*, vol. 79, pp. 391–396, 2003.
- [4] M. Sri Lakshmi Sunita, S. Prashant, P. V. Bramha Chari, S. Nageswara Rao, P. Balaravi, and P. B. Kavi Kishor, "Molecular identification of arsenic-resistant estuarine bacteria and characterization of their ars genotype," *Ecotoxicology*, vol. 21, pp. 202–212, 2012.
- [5] U. Dey, S. Chatterjee, and N. K. Mondal, "Isolation and characterization of arsenic-resistant bacteria and possible application in bioremediation," *Biotechnology Reports*, vol. 10, no. June 2016, pp. 1–7, 2016.
- [6] C. Rensing and B. P. Rosen, "Heavy Metals Cycle (Arsenic, Mercury, Selenium, others), pp. 205–227. *Encyclopedia of Microbiology*, 3.izd, Uredio M. Schaechter, Academic press (Elsevier), pp 4600, 2009.
- [7] R. A. Shrestha, B. Lama, J. Joshi, and M. Sillanpää, "Effects of Mn(II) and Fe(II) on microbial removal of arsenic (III)," *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 15, no. 4, pp. 303–307, 2008.
- [8] A. R. Achour, P. Bauda, and P. Billard, "Diversity of arsenite transporter genes from arsenic-resistant soil bacteria," *Research in Microbiology*, vol. 158, no. 2, pp. 128–137, 2007.
- [9] S. Gao and R. G. Burau, "Environmental Factors Affecting Rates of Arsenic Evolution from and Mineralization of Arsenicals in Soil," *Journal of Environment Quality*, vol. 26, no. 3, pp. 753–763, 1997.

- [10] U. P. Dhuldhaj, N. K. Sharma, and S. Singh, "Microbial Removal of Arsenic: An Overview," pp. 112–127, *Bioremediation of Pollutants*, 1.izd, Uredili R.C. Dubey i D. K. Maheshwari, IK International Publishing House, pp. 322, 2012.
- [11] P. Jyothsna and S. D. S. Murthy, "A review on bioremediation of Arsenic from contaminated groundwater.," *Octa Journal of Environmental Research*, vol. 4, no. 2, pp. 155–166, 2016.
- [12] M. Letek, M. Letek, and J. A. Gil, "Corynebacterium glutamicum as a model bacterium for bioremediation of arsenic glutamicum as a model bacterium for the bioremediation of arsenic," *International Microbiology*, vol. 9, no. 3, pp. 207–215, 2006.
- [13] D. Páez-Espino, J. Tamames, V. De Lorenzo, and D. Cánovas, "Microbial responses to environmental arsenic," *BioMetals*, vol. 22, no. 1, pp. 117–130, 2009.
- [14] B. P. Rosen, "Biochemistry of arsenic detoxification," *FEBS Letters*, vol. 529, no. 1, pp. 86–92, 2002.
- [15] G. K. Satyapal and S. Rani, "Potential Role of Arsenic Resistant Bacteria in Bioremediation: Current Status and Future Prospects," *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, vol. 8, no. 3, pp. 256–258, 2016.
- [16] S. L. Tsai, S. Singh, and W. Chen, "Arsenic metabolism by microbes in nature and the impact on arsenic remediation," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 20, no. 6, pp. 659–667, 2009.
- [17] S. Silver and L. T. Phung, "Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, no. 2, pp. 599–608, 2005.
- [18] R. S. Oremland and J. F. Stolz, "The ecology of arsenic," *Science*, vol. 300, no. 5621, pp. 939–944, 2003.
- [19] V. Mary Kensa, "Bioremediation - An overview," *Pure and Applied Chemistry*, vol. 73, no. 7, pp. 1163–1172, 2001.
- [20] M. M. Bahar, M. Megharaj, and R. Naidu, "Arsenic bioremediation potential of a new arsenite-oxidizing bacterium *Stenotrophomonas* sp. MM-7 isolated from soil," *Biodegradation*, vol. 23, no. 6, pp. 803–812, 2012.

- [21] D. D. Simeonova *et al.*, “Arsenite oxidation in batch reactors with alginate-immobilized ULPAs1 strain,” *Biotechnology Bioengineering*, vol. 91, no. 4, pp. 441–446, 2005.
- [22] C. R. Anderson and G. M. Cook, “Isolation and Characterization of Arsenate-Reducing Bacteria from Arsenic-Contaminated Sites in New Zealand,” *Current Microbiology*, vol. 48, no. 5, pp. 341–347, 2004.

<http://www.assignmentpoint.com/science/chemistry/arsenic.html> (Preuzeto: 30.8.2018.)



## 7. SAŽETAK

Arsen spada u skupinu teških metala i u okolišu se javlja u nekoliko oksidacijskih stanja, pri čemu su arsenat i arsenit najčešći oblici. Toksičnost, mobilnost i raspoloživost arsena u okolišu ovise o njegovom oksidacijskom stanju. Arsen se otpušta u okoliš kao rezultat geogenih i antropogenih aktivnosti. Toksičnost arsena postao je jedan od globalnih problema diljem svijeta, s obzirom da se otpušta u vode i tla gdje dolazi do kontaminacije. Izlaganje arsenu može izazvati promjene na razini stanice kao što su inaktivacija enzima uključenih u DNA replikaciju i popravak, sintezu nukleinskih kiselina i fosfolipida, te na razini organizma npr. rak kože, mučnina, povraćanje, svrbež itd. Iako je toksičan za većinu organizama, neki prokarioti su razvili mehanizme za dobivanje energije putem redukcije ili oksidacije arsena. Upravo su mikroorganizmi uključeni u kruženje arsena u prirodi, utječući na njegov biokemijski ciklus, na način da pretvaraju arsen u oblike različite topljivosti, mobilnosti, raspoloživosti i toksičnosti. Glavni mehanizmi kojim bakterije mijenjaju ove značajke su reakcije oksidacije, redukcije i metilacije. Zahvaljujući ovim sposobnostima, bakterije se mogu koristiti za smanjivanje koncentracije arsena u okolišu. Razumijevanje raznolikosti i rasprostranjenosti bakterija rezistentnih na arsen te mehanizama koji im omogućuju rezistenciju može doprinijeti uspješnoj bioremedijaciji na područjima kontaminiranim arsenom.

## 8. SUMMARY

Arsenic is a heavy metal occurring in several oxidation states with arsenate and arsenite being the most common forms. Arsenic toxicity, bioavailability and mobility depend on its oxidation state. It is released into the environment as the result of geogenic and anthropogenic activities. Arsenic toxicity has become a global concern due to increasing contamination of water and soil in many regions of the world. Exposure to arsenic causes changes both on the cellular level, i.e. inactivation of enzymes involved in DNA replication, repair, nucleic acid and phospholipid synthesis, and on the level of the whole organism, i.e. skin cancer, nausea, vomiting, itching etc. Although As is toxic to most organisms, some prokaryotes have developed mechanisms to produce energy by oxidizing or reducing it. Therefore, microorganisms are involved in the arsenic cycle by influencing its biochemical cycle through conversion to forms with different solubility, mobility, bioavailability, and toxicity. These bacteria may be used for removal of arsenic from contaminated environment. Understanding the diversity and distribution of arsenic-resistant bacteria and the mechanisms involved in arsenic-resistance could contribute to successful bioremediation of arsenic-contaminated areas.