

## Uma bactéria que pode crescer usando arsênio ao invés de fósforo

Felisa Wolfe-Simon,<sup>1,2\*</sup> Jodi Switzer Blum,<sup>2</sup> Thomas R. Kulp,<sup>2</sup> Gwyneth W. Gordon,<sup>3</sup> Shelley E. Hoefft,<sup>2</sup> Jennifer Pett-Ridge,<sup>4</sup> John F. Stolz,<sup>5</sup> Samuel M. Webb,<sup>6</sup> Peter K. Weber,<sup>4</sup> Paul C. W. Davies,<sup>1,7</sup> Ariel D. Anbar,<sup>1,3,8</sup> Ronald S. Oremland<sup>2</sup>

1 NASA Astrobiology Institute, USA.

2 U.S. Geological Survey, Menlo Park, CA, USA.

3 School of Earth and Space Exploration, Arizona State University, Tempe, AZ, USA.

4 Lawrence Livermore National Laboratory, Livermore, CA, USA.

5 Department of Biological Sciences, Duquesne University, Pittsburgh, PA, USA.

6 Stanford Synchrotron Radiation Lightsource, Menlo Park, CA, USA.

7 BEYOND: Center for Fundamental Concepts in Science, Arizona State University, Tempe, AZ, USA.

8 Department of Chemistry and Biochemistry, Arizona State University, Tempe, AZ, USA.

### Resumo

A vida é majoritariamente composta dos elementos carbono, hidrogênio, nitrogênio, oxigênio, enxofre e fósforo. Embora esses seis elementos constituam ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos e, assim, sejam a essência da matéria viva, é teoricamente possível que alguns outros elementos da tabela periódica possam servir para mesma função. Aqui nós descrevemos uma bactéria, cepa GFAJ-1 das Halomonadaceae, isolada do lago Mono Lake, Califórnia, a qual substitui o fósforo por arsênio para sustentar seu crescimento. Nossos dados indicam evidências de arsenato em macromoléculas que normalmente possuem fosfato, notavelmente ácidos nucleicos e proteínas. Alterações em um dos maiores bio-elementos podem ter profunda significância evolucionária e geoquímica.

### Apresentação

A dependência biológica dos seis maiores elementos nutrientes carbono, hidrogênio, nitrogênio, oxigênio, enxofre e fósforo é complementada por uma matriz de outros elementos, normalmente metal(óides) presentes em quantidades ínfimas que servem para funções celulares críticas, como por exemplo cofatores enzimáticos<sup>1</sup>. Existem diversos casos em que esses elementos são substituídos por outros. Uns poucos exemplos incluem a substituição do tungstênio por molibdênio além de cádmio por zinco em algumas famílias enzimáticas<sup>2,3</sup> e cobre por ferro como um carreador de oxigênio em alguns artrópodes e moluscos<sup>4</sup>. Nesses exemplos e em outros, os elementos que são trocados compartilham similaridades químicas que facilitam a troca. Contudo, não existem relatos de substituição para nenhum dos seis maiores elementos essenciais a vida. No presente artigo nós apresentamos evidências de que o arsênio podem substituir o fósforo em biomoléculas que ocorrem naturalmente em bactérias.

O arsênio (As) é um análogo químico do fósforo (P), o qual se encontra diretamente abaixo de P na tabela periódica. arsênio possui um raio atômico similar, bem como possuir uma eletronegatividade bem próxima do P<sup>5</sup>. A forma mais comum do P em biologia é o fosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), o qual comporta-se de forma similar ao arsenato (AsO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) acima da faixa de pH de interesse biológico e de gradiente redox<sup>6</sup>. A similaridade físico-química entre AsO<sub>4</sub><sup>3-</sup> e PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> contribui para toxicidade biológica devido ao fato de que as vias metabólicas destinadas ao PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> não conseguem distinguir as duas moléculas<sup>7</sup> e o arsenato pode ser incorporado antecipadamente em alguns passos dessas vias<sup>6</sup>. Entretanto, pensava-se que a continuidade dos processos metabólicos eram, de forma geral, incompatíveis com moléculas que incorporaram As por causa da diferença de reatividade entre compostos de P e compostos de arsênio<sup>8</sup>. Essa continuidade das vias bioquímicas podem requerer o mais quimicamente estável metabólito baseado em P; acredita-se que o tempo de vida do mais

rapidamente hidrolisado análogo do condutor de As seja muito curto. Todavia, dadas as similaridades do P e do As, e pela analogia da substituição de elementos traços, nós hipotetizamos que o  $\text{AsO}_4^{3-}$  poderia substituir especificamente o  $\text{PO}_4^{3-}$  em um organismo que possua mecanismos para lidar com a instabilidade dos compostos de  $\text{AsO}_4^{3-}$ .<sup>6</sup> Aqui, testamos experimentalmente esta hipótese usando  $\text{AsO}_4^{3-}$ , combinando com nenhuma adição de  $\text{PO}_4^{3-}$ , para selecionar e isolar um micróbio capaz de realizar essa substituição.

## Geomicrobiologia do GFAJ-1

Mono Lake, localizada no leste da Califórnia, é um lago hipersalino e alcalino com altas concentrações de arsênio dissolvido (média  $200 \mu\text{M}^9$ ). Usamos sedimentos de Lake como inóculos em um meio aeróbico artificial com pH  $9,8^{10,11}$  contendo 10 mM de glicose, vitaminas, metais traços, mas sem nenhuma adição de  $\text{PO}_4^{3-}$  nem nenhum suplemento orgânico nutricional complexo (ex. extrato de levedura, peptona) com um regime de aumento de adição de  $\text{AsO}_4^{3-}$  inicialmente abrangendo o intervalo de  $100 \mu\text{M}$  a 5 mM. Esses enriquecimentos foram feitos por meio de muitas transferências de diluições decimais reduzindo grandemente qualquer transporte de fósforo autóctone<sup>11</sup>. O background de  $\text{PO}_4^{3-}$  no meio foi igual a  $3,1 (\pm 0,3) \mu\text{M}$ , com ou sem adição de  $\text{AsO}_4^{3-}$ , provenientes de traços de impurezas dos principais sais (tabela S1)<sup>11</sup>. A sexta transferência de 5 mM de  $\text{AsO}_4^{3-}$  (sem adição de  $\text{PO}_4^{3-}$ ) foi monitorada de perto e demonstrou uma taxa de crescimento ( $\mu$ ) de  $0,1 \text{ dia}^{-1}$ . Após diluições de  $10^{-7}$ , usamos um enriquecimento de 5 mM de  $\text{AsO}_4^{3-}$  para inocular uma placa de ágar que continha a mesma composição química do meio artificial. Uma colônia isolada foi escolhida das placas de ágar, reintroduzida no meio líquido artificial sem adição de  $\text{PO}_4^{3-}$  onde então aumentamos progressivamente a concentração de  $\text{AsO}_4^{3-}$  de forma a determinar o nível ótimo de crescimento. Essa cepa isolada de GFAJ-1, que foi identificada por meio da sequência filogenética do 16S rRNA como um membro da família Halomonadaceae de Gammaproteobacteria (figura S1)<sup>11</sup>, está mantida aerobicamente com 40 mM de  $\text{AsO}_4^{3-}$ , 10 mM de glicose e sem adição de  $\text{PO}_4^{3-}$  (condição +As/-P). Membros dessa família demonstraram acumular As intracelular previamente<sup>12</sup>.

GFAJ-1 cresceu a um  $\mu_{\text{max}}$  médio de  $0,53 \text{ dia}^{-1}$  sobre +As/-P, aumentando em 20 vezes seu número de células após seis dias. Elas também cresceram mais rápido e mais extensivamente com a adição de 1,5 mM  $\text{PO}_4^{3-}$  (-As/+P,  $\mu_{\text{max}}$   $0,86 \text{ dia}^{-1}$ ). Contudo, na ausência de  $\text{AsO}_4^{3-}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  nenhum crescimento foi observado (figuras 1A e 1B). Para demonstrar o crescimento da células de forma inequívoca, usamos dois métodos independentes: densidade óptica e contagem direta de células. Células crescidas sobre +As/-P são oblongas e possuem aproximadamente 1-2 microns quando observadas por microscopia eletrônica (figura 1C)<sup>11</sup>. Microscopia eletrônica de transmissão revelou grandes regiões semelhantes a vacúolos em células que cresceram em meio +As/-P, o que pode contar para este aumento de tamanho (figura 1E). Estes experimentos demonstraram que o crescimento dependente de arsenato, diferenças morfológicas em GFAJ-1 causadas pelo  $\text{AsO}_4^{3-}$  presente no meio de crescimento e o fato de que os níveis de impureza do  $\text{PO}_4^{3-}$  no meio foram insuficientes para eliciar o crescimento no controle (-As/+P).

## Estequiometria celular e distribuição elementar

De forma a determinar se GFAJ-1 absorveu  $\text{AsO}_4^{3-}$  do meio, nós medimos o conteúdo intracelular de As por ICP-MS<sup>11</sup>. Em células crescidas em meio +As/-P, a média intracelular de As foi  $0,19 (\pm 0,25)$  do seu peso seco (tabela 1), enquanto as células continham apenas  $0,02 (\pm 0,01)\%$  de P de seu peso seco. Este P foi, presumivelmente, eliminado dos traços de impurezas de  $\text{PO}_4^{3-}$  nos reagentes; e não provavelmente devido ao carregamento dado por nossa estratégia de enriquecimento e isolamento. Além disso, quando as células cresciam em +As/-P o valor intracelular de P foi 30 vezes menor do que nossos valores de P medidos quando este micróbio cresceu em -As/+P e muito abaixo do 1-3% de P do peso seco necessário para suportar o crescimento em uma típica bactéria heterotrófica<sup>13</sup>. Do contrário, o crescimento celular de GFAJ-1 sobre condições -As/+P

tiveram um conteúdo médio de P de cerca de 0,54 ( $\pm$  9,21)% de peso seco. Houve uma variação no conteúdo total de As das células +As/-P, possivelmente um resultado da coleta durante a fase estacionária e perdas durante as centrifugações e ciclos de lavagem devido a instabilidade potencial das estruturas celulares no estado túrgido (figura 2C e 2E). Em contraste, a integridade aparentemente robusta das células -As/+P (figura 2D) e, desse modo, a medida intracelular de P dessas células reflete seu conteúdo. Contudo, o baixo total de P intracelular medido em células +As/-P estava consistentemente muito abaixo da quantidade necessária para sustentar o crescimento, sugerindo que esses valores baixos estão corretos apesar das variações dos dados das células +As/-P. O baixo conteúdo de P, em conjunto com alto conteúdo intracelular de As, foi confirmado por espectrometria de massa de íons de alta resolução e por análises de raios-X, são discutidas abaixo.

Usamos um radiomarcador  $^{73}\text{AsO}_4^{3-}$  para obter informações mais específicas sobre a distribuição intracelular do arsênio<sup>11</sup>. Observamos arsênio intracelular em frações celulares de proteínas, metabólitos, lipídeos e ácidos nucleicos (tabela 2). A fase celular estacionária incorporou aproximadamente um décimo do total de  $^{73}\text{AsO}_4^{3-}$  em ácidos nucleicos, mas mais de três quartos do  $^{73}\text{AsO}_4^{3-}$  em frações fenol extraídas de proteínas, com uma pequena fração em lipídeos. Nós advertimos que a grande fração proteica é, provavelmente, uma super estimativa, visto que esse passo de extração possivelmente contém numerosos pequenos metabólitos não proteináceos. De forma a determinar se a distribuição padrão reflete o uso de  $\text{AsO}_4^{3-}$  no lugar de  $\text{PO}_4^{3-}$  no DNA, nós estimamos que o genoma médio da bactéria é de 3,8 Mbps, o qual deve conter aproximadamente  $7,5 \cdot 10^6$  átomos ou  $12,5 \cdot 10^{-18}$  mols de P. Assumindo um genoma completo por célula, isso deve ser igual a 0,39 fg de P no genoma. Por meio de ICP-MS, medimos cerca de 9,0 fg de P por célula em condição -As/+P, o que implica que somente  $\sim$  4% do total intracelular de P está associado com o genoma. Uma vez que essas células são coletadas na fase estacionária<sup>11</sup>, a fração de P associada com RNA é possivelmente pequena<sup>14</sup>. Consequentemente, aproximadamente 96% do P está presumivelmente distribuído entre lipídeos e frações proteicas. Se o  $\text{AsO}_4^{3-}$  está substituindo o  $\text{PO}_4^{3-}$  no DNA, então podemos assumir que aproximadamente a mesma fração do total intracelular de  $\text{AsO}_4^{3-}$  deverá refletir uma distribuição similar a nossa distribuição estimada de  $\text{PO}_4^{3-}$ . A distribuição intracelular de  $^{73}\text{AsO}_4^{3-}$  em nossos experimentos foi consistente com essas estimativas. Se o  $^{73}\text{AsO}_4^{3-}$  está cumprindo o papel biológico do  $\text{PO}_4^{3-}$ , então o  $\text{AsO}_4^{3-}$  poderia atuar em muitos papéis bioquímicos análogos, incluindo DNA, fosforilação de proteínas metabólitos de pequeno peso molecular (ex. Análogos arsenilados de NADH, ATP e intermediários como glicose e acetil-CoA) e fosfolipídeos.

Nossos dados sugerem que o arsênio estava presente em várias biomoléculas e em particular procuramos confirmar a presença de arsênio no DNA. Inicialmente, medimos traços de As por análise de ICP-MS do extrato de ácido nucleico e de proteínas/metabólitos de células crescidas em +As/-P (tabela S1)<sup>11</sup>. Nós então utilizamos uma espectrometria de massa de íons de alta resolução (NanoSIMS) para identificar positivamente o As no extrato (figura 2A). Estes dados mostram que o DNA derivado de células +As/-P tinham um conteúdo elevado de As e baixo de relativo ao DNA de células -As/+P. Análises NanoSIMS do DNA mostrou que a razão As:P em um átomo por átomos base foi significativamente maior em células +As/-P versus -As/+P (figura 2A, tabela S2)<sup>11</sup>. Tanto expressado como uma razão entre íons relativa ao C ( $^{75}\text{As}^-:^{12}\text{C}^-$ , figura 2A) ou  $^{31}\text{P}^-:^{12}\text{C}^-$  (tabela S2)<sup>11</sup> ou normalizado pela produção relativa de íons e expressado como uma concentração em partes por bilhão (tabela S2)<sup>11</sup>, percebemos uma tendência consistente de similaridade, com significativamente mais As em DNA +As/P-, e maior P em DNA -As/+P. Em ambos os casos os elementos não alterados foram iguais ou menores que os níveis do background. Estas medidas, portanto, demonstram especificamente que o extrato de DNA purificado de células +As/-P continham As. Nossas análises nanoSIMS, combinadas com evidências de arsênio intracelular por ICP-MS e nosso experimento usando radiomarcador  $^{73}\text{AsO}_4^{3-}$  demonstraram que o  $\text{AsO}_4^{3-}$  intracelular foi incorporado a biomoléculas chave, especificamente DNA.

Usamos estudos de raio-X síncrotron para determinar a especificação e o meio químico do arsênio intracelular<sup>11</sup>. Micro absorção de raios-X próximos da banda de espectroscopia ( $\mu$ XANES) de células +As/-P exibiram uma banda de absorção de As(V) coordenada sem evidências de As(III) observado. Os melhores ajustes do espectro estendido de micro absorção de raios-X de fina estrutura ( $\mu$ EXAFS) estão listados na tabela 3 e mostrados na figura 3. A primeira região vizinha ao redor do arsênio em células +As/-P consiste de quatro ligantes do oxigênio (tabela 3), mas possui uma segunda região que é inconsistente com nossos modelos As-Fe e As-S, íons de arsenato livre ou espectros organo-arsênios já publicados (figura 3A)<sup>15,16</sup>. Enquanto outros compostos de arsênio, como o dimetillarsinato (DMA), também possuem ligações As-O e As-C, eles possuem posições de borda que são deslocadas para energias abaixo do observado As(V) e tem distâncias de ligações As-C muito menores<sup>16</sup>. Em contraste aos nossos modelos, estas distâncias As-O e As-C são consistentes com o que foi relatado a partir da estrutura cristalina do DNA para a posição análoga do P relativo aos átomos de O e C (figura 3A)<sup>16,17</sup>. Portanto, nossos dados obtidos por raios-X dão embasamento a posição do arsenato em uma configuração similar a do fosfato no esqueleto de DNA ou bem como potencialmente a outras moléculas. Estes dados também indicam evidências para a presença de arsenato em metabólitos de baixo peso molecular (ex. Análogos arsenilados de NADH, ATP e intermediários como glicose e acetil-CoA), bem como proteínas arsenilatadas em que o arsenato substituiria o fosfato em resíduos de serina, tirosina e treonina (tabela S3)<sup>1,11</sup>. Dados de fluorescência de micro raios-X ( $\mu$ XRF) confirmaram nossas medidas de ICP-MS e mostraram um pequeno background de P que contrasta com regiões de alto conteúdo de arsênio correlacionado com altos conteúdos de ferro e zinco (figura 3B, figura S2)<sup>11</sup>. Estes dois últimos elementos são rotineiramente usados como representantes para presença de material celular (como C, N e O) em nossos experimentos devido ao fato de que a luz desses elementos não pode ser detectada por fluorescência de raios-X sobre nossas condição de ausência de vácuo. Entretanto, para dar suporte a distribuição de arsênio com material celular, nós usamos NanoSIMS para mapear taxas iônicas celulares de  $^{75}\text{As}^{+12}\text{C}^{-}$  e  $^{31}\text{P}^{+12}\text{C}^{-}$  (figura 2B-G, figura S2)<sup>11</sup>. Essas análises confirmam, com uma resolução muito mais precisa, a distribuição intracelular de As com C na condição +As/-P com um baixo background de P (figuras 2B, 2D, 2F). Isto está em contraste a distribuição intracelular de P em células que cresceram em condições -As/+P (figuras 2C, 2E, 2G). Pelo fato de que os dados da absorção de raios-X forneceram informações a respeito da coordenação média do arsênio, nossos dados identificaram uma mistura de componentes nas células. Esses resultados indicam que esses componentes são dominados pelas estruturas coordenadas arsênio(V)-oxigênio-carbono e, assim, o meio das ligações que descrevemos é consistente com nossos dados NanoSIMS (figura 2A) e podem ser atribuídos ao DNA. Em resumo, estes dados mostram que o arsênio está no estado redutor +5 e ligado ao O e distal aos átomos de C com comprimentos de ligação covalente aceitáveis identificando o arsenato assimilado em biomoléculas dentro das células em especificamente coordenação relevante.

Nossos dados mostram o crescimento arsênio-dependente de GFAJ-1 (figura 1). O crescimento foi acompanhado pela tomada de arsenato e assimilação em biomoléculas incluindo ácidos nucleicos, proteínas e metabólitos (tabela 1 e 2, figuras 2 e 3). Em alguns organismos, o arsênio induz genes específicos de resistência para fazer frente a sua toxicidade<sup>7</sup>; enquanto alguns micróbios dissimiladores utilizadores de arsênio podem conservar energia para o crescimento a partir da oxidação de espécies reduzidas de arsênio, ou “respirar”  $\text{AsO}_4^{3-}$ , como um acceptor terminal de elétrons. Nosso estudo é diferente pois nós usamos arsênio como um agente seletivo e excluimos o fósforo, até agora o maior de todos os requerimentos em todos os organismos conhecidos. Todavia, GFAJ-1 não é um arsenófilo obrigatório e cresce consideravelmente melhor quando disponibilizado de P (figura 1A, 1B). Embora esters de  $\text{AsO}_4^{3-}$  são previstos ser em ordens de magnitude menos estáveis que os esters de  $\text{PO}_4^{3-}$ , pelo menos para moléculas simples<sup>8</sup>, GFAJ-1 pode enfrentar essa instabilidade. As regiões semelhantes a vacúolos observadas em células GFAJ-1 quando crescem em condições +As/-P são potencialmente ricas em poli- $\beta$ -hidroxibutirato [como

mostrado em outras espécies de *Halomonas*]<sup>19</sup>, as quais podem estabilizar estruturas do tipo As(V)-O-C por que ambientes não aquosos parecem promover taxas de hidrólise mais lentas para os compostos relatados<sup>8</sup>. Propomos que regiões intracelulares ou mecanismos que excluem água podem também promover esta estabilidade.

Nós reportamos a descoberta de um micróbio incomum, cepa GFAJ-a, que excepcionalmente pode variar a composição elementar de suas biomoléculas por meio da substituição do P por As. Como o arsênio se insinua na estrutura das biomoléculas pe ainda incerto, e os mecanismos pelos quais essas moléculas operam são desconhecidos.

## Referências

1. J. Berg, J. Tymoczko, L. Stryer, Biochemistry . (WH Freeman & Co, New York, ed. 6th, 2007).
2. R. Hille, Trends Biochem Sci 27 , 360 (2002).
3. T. Lane, F. Morel, Proc Natl Acad Sci U S A 97 , 4627 (2000).
4. G. Jameson, J. Ibers, in Biological Inorganic Chemistry: Structure and Reactivity, I. Bertini, H. Gray, I. Stiefel, J. Valentine, Eds. (University Science Books, Sausalito, 2007), pp. 354.
5. D. Lide, Ed., CRC Handbook of Chemistry and Physics, 90th Edition (Internet Version 2010) , (CRC Press/Taylor and Francis, Boca Raton, 2010).
6. F. Wolfe-Simon, P. C. W. Davies, A. D. Anbar, Int J Astrobio 8 , 69 (2009).
7. B. Rosen, FEBS Lett 529 , 86 (2002).
8. C. D. Baer, J. O. Edwards, P. H. Rieger, Inorg. Chem. 20 , 905 (1981).
9. R. Oremland, J. F. Stolz, J. T. Hollibaugh, FEMS Microbiol Ecol 48 , 15 (2004).
10. J. Switzer Blum, A. Burns Bindi, J. Buzzelli, J. Stolz, R. Oremland, Arch Microbiol 171 , 19 (1998).
11. Materials and methods are available as supporting material on Science Online.
12. M. Takeuchi et al. , J Biotechnol 127 , 434 (2007).
13. W. Makino, J. Cotner, R. Sterner, J. Elser, Funct Ecol 17 , 121 (2003).
14. J. Mandelstam, Bactierol Rev. 24 , 289 (1960).
15. P. Smith et al. , Environ. Sci. Technol 39 , 248 (2005).
16. I. Pickering et al. , Plant Physiol. 122 , 1171 (2000).
17. S. Holbrook, R. Dickerson, S. H. Kim, Acta Cryst B41 , 255 (1985).
18. R. S. Oremland, J. F. Stolz, Science 300 , 939 (2003).
19. J. Quillaguaman, O. Delgado, B. Mattiasson, R. Hatti-Kaul, Enzyme Microb Technol 38 , 148 (2006).

## Imagens e tabelas

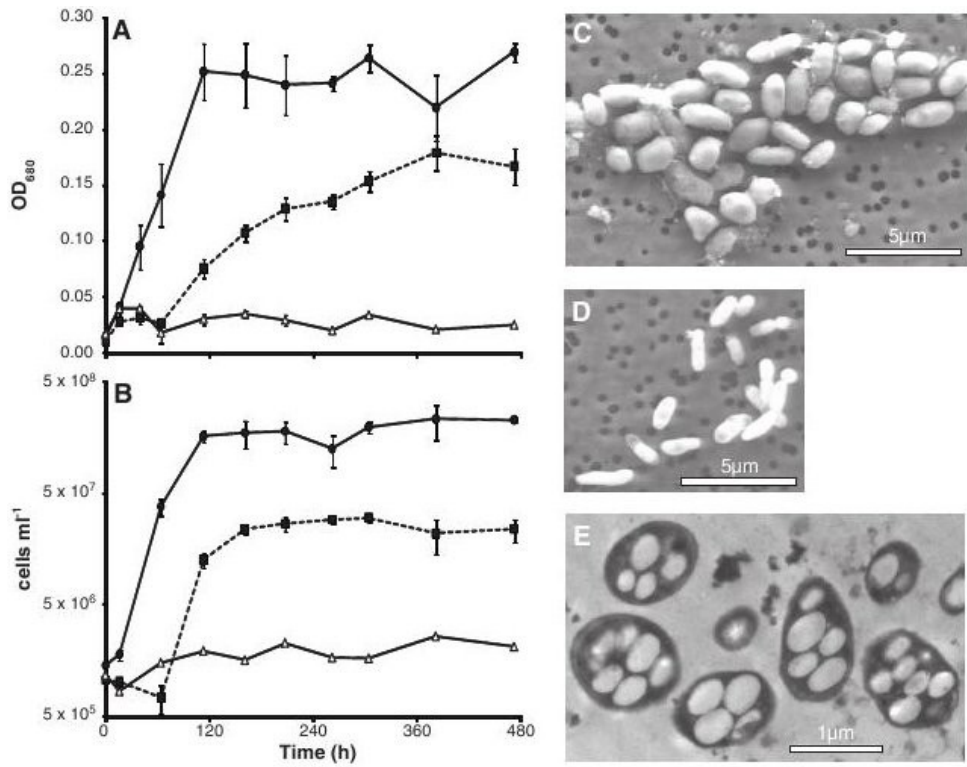


Figura 01

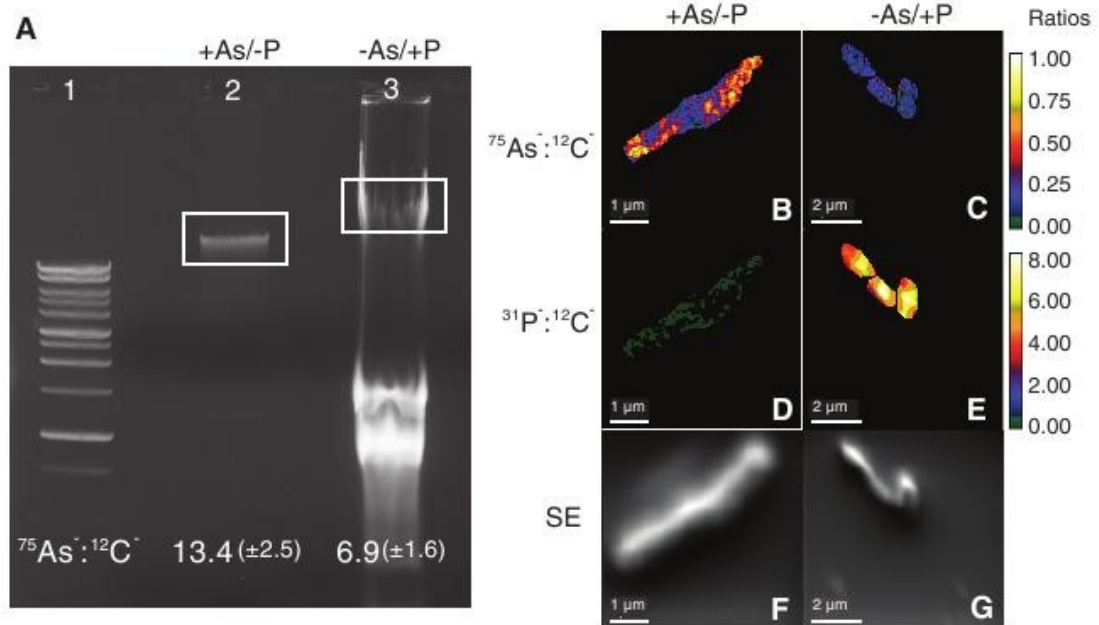


Figura 02

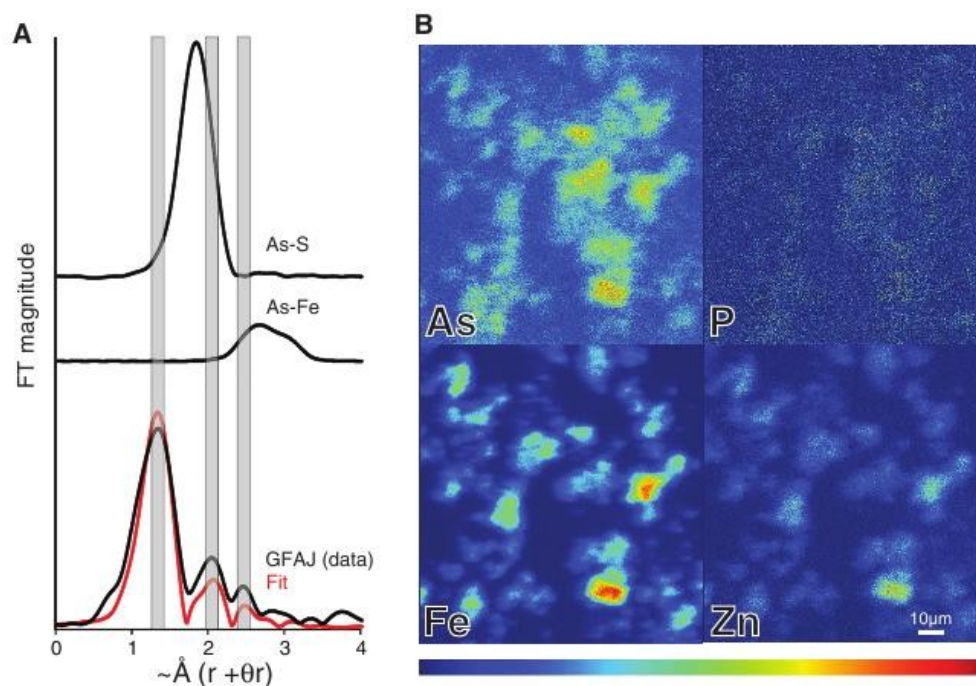


Figura 03

**Table 1.** Bulk intracellular elemental profile of strain GFAJ1.\*

Condition (n)	(% dry weight)		
	As	P	As:P
+As/-P (8)	$0.19 \pm 0.25$	$0.019 \pm 0.0009$	7.3
-As/+P (4)	$0.001 \pm 0.0005$	$0.54 \pm 0.21$	0.002

\*Cells grown and prepared with trace metal clean techniques (11). Number in parentheses indicates replicate samples analyzed.

**Table 2.** Intracellular radiolabeled  $^{73}\text{AsO}_4^-$  arsenate distribution\*

Solvent (subcellular fraction)	Cellular radiolabel recovered (% of total)
Phenol (protein + s.m.w. metabolites)	$80.3 \pm 1.7$
Phenol:Chloroform (proteins + lipids)	$5.1 \pm 4.1$
Chloroform (lipids)	$1.5 \pm 0.8$
Final aqueous fraction (DNA/RNA)	$11.0 \pm 0.1$

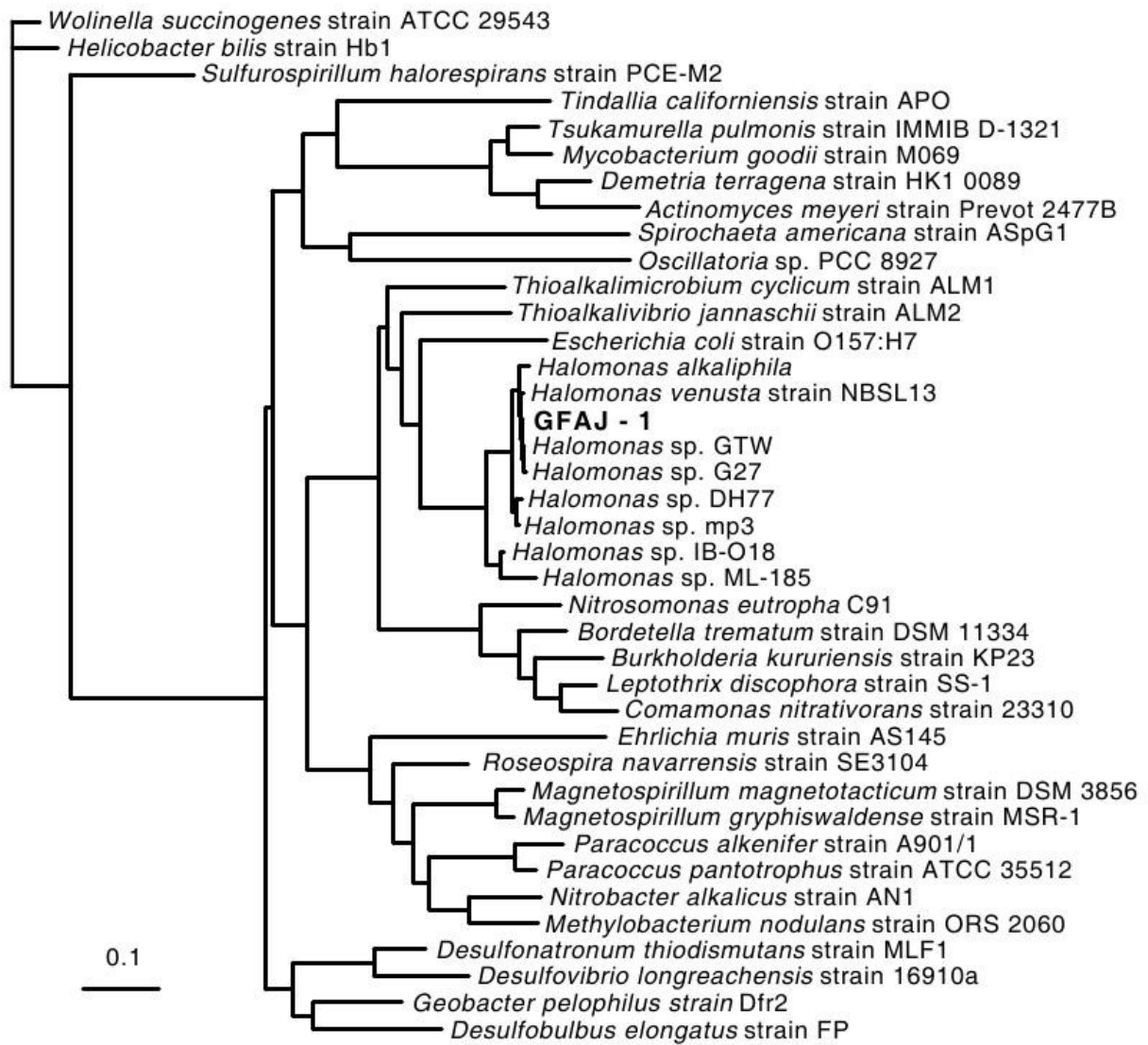
\*All major cellular sub - fractions contained radiolabel after cell washing procedures. Small molecular weight metabolites (s.m.w. metabolites) potentially include arsenylated analogs of ATP, NADH, acetyl - CoA and others (11). Standard error shown.

**Table 3.** Results of fitting arsenic K-edge EXAFS of GFAJ1.\*

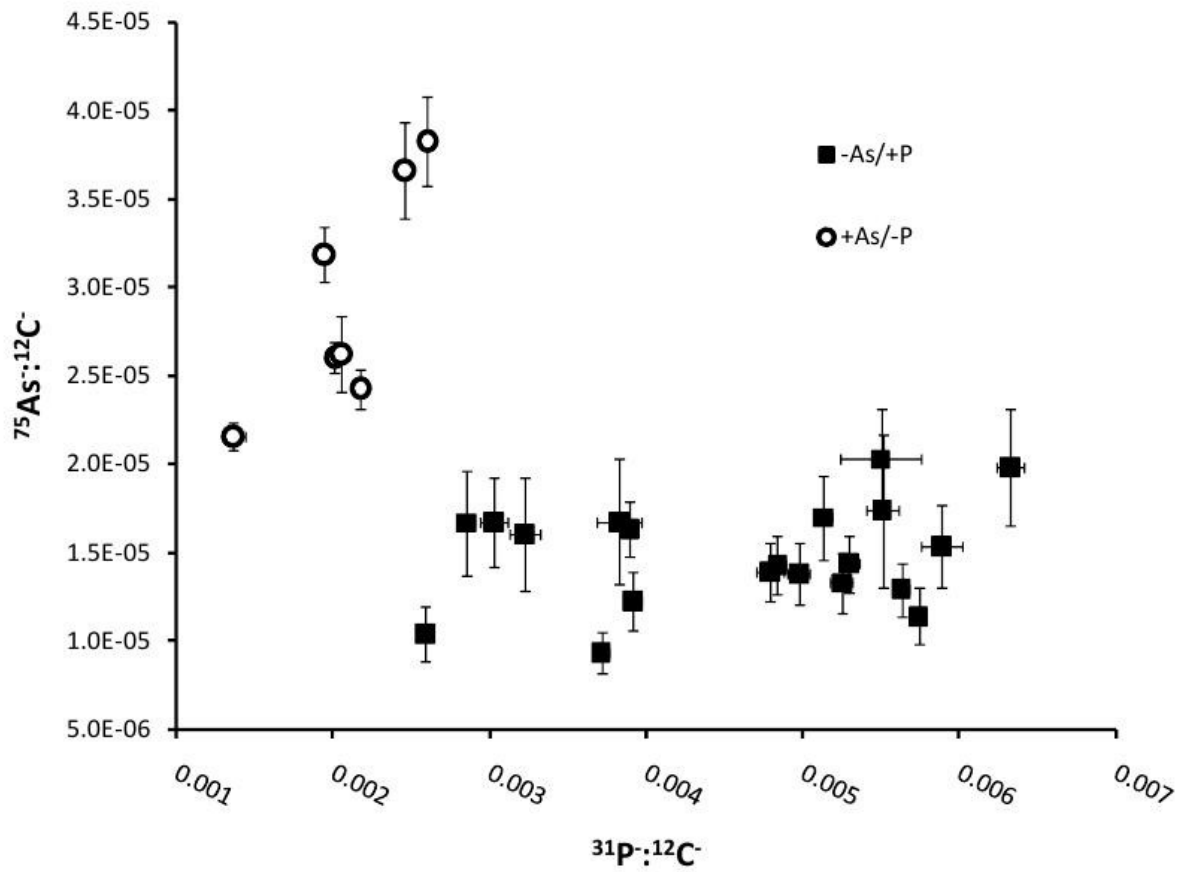
Type	Number	R	$\sigma^2$
As-O	4.2 (0.6)	1.73 (2)	0.003 (2)
As-C	2.5 (0.5)	2.35 (4)	0.003 (2)
As-C	2.2 (0.5)	2.92 (6)	0.003 (2)

\*Details for table: S02=1, global amplitude factor and E0= 13.97, offset for calibration. Type, the coordination type; Number, the coordination number; R, interatomic distance;  $\sigma^2$ , the measure of the static disorder of the shell. See Table S2 for comparison to P in P-containing biomolecules (11).

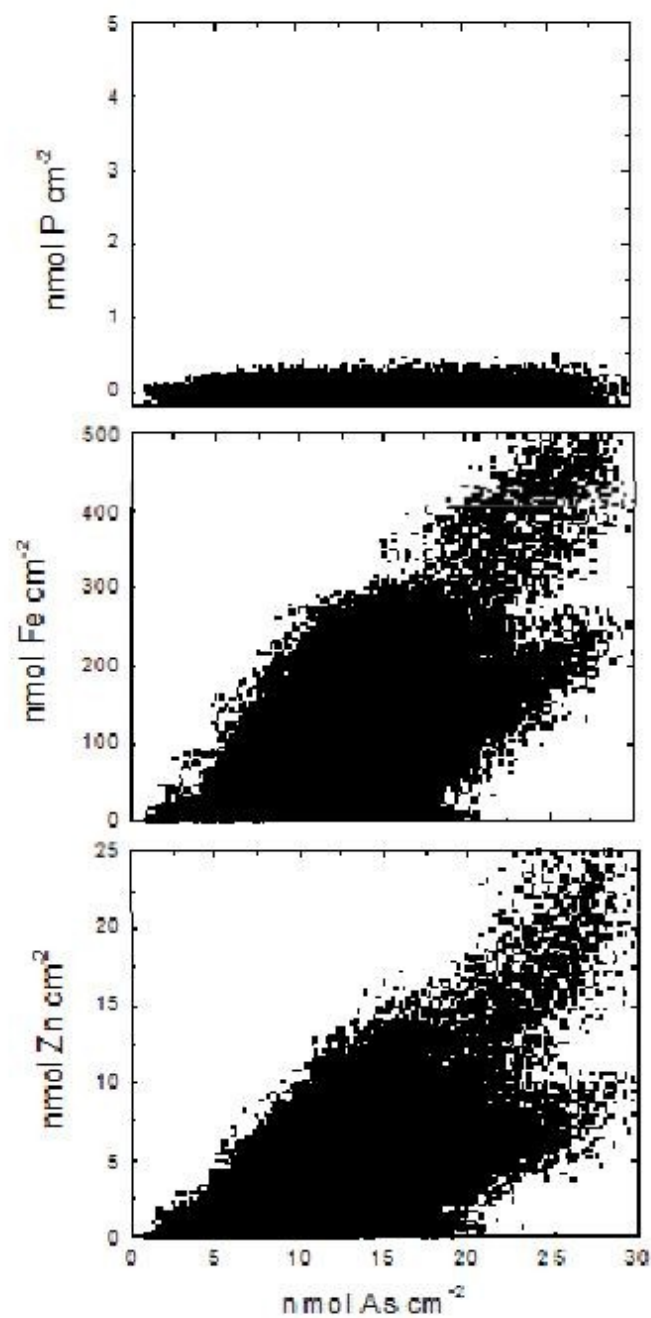
**Imagens e tabelas suplementares**



**Figure S1. Phylogenetic analysis of strain GFAJ-1.** Maximum likelihood phylogenetic tree based on 16S rRNA genes identified GFAJ-1 as a member of the Halomonadaceae family in the Gammaproteobacteria.



**Figure S2.**  $^{75}\text{As}:^{12}\text{C}^-$  versus  $^{31}\text{P}:^{12}\text{C}^-$  ratio plot from GJAJ-1 cells by NanoSIMS. Data showing the relationships between As, P and C for GFAJ-1 cells grown +As/-P (open circles) and -As/+P (closed squares). Error bars represent 1 standard deviation of analytical variance during a single measurement.



**Figure S3. Correlation plots of P, Fe, and Zn versus As XRF mapping data for GFAJ-1 cells.**

Correlation plots showing the relationship of the spatial distribution of phosphorus (top), iron (middle) and zinc (bottom) with respect to arsenic for the images and data shown in Figure 3B. Strong correlations exist between Fe, Zn and As while there is no correlation between As and P.

**Table S1. ICP-MS analyses.\***

	<b>P</b>	<b>+/-<sup>c</sup></b>	<b>As</b>	<b>+/-<sup>c</sup></b>	<b>As/P</b>	<b>+/-<sup>d</sup></b>
<b>BLANKS</b>	<b>ng</b>		<b>ng</b>			
<i>sterile falcon tube blank</i>	<1		<1			
<i>repeat</i>	<1		<1			
<i>+As/-P digestion process blank</i>	<1		<1			
<i>repeat</i>	<1		<1			
<i>-As/+P digestion process blank</i>	<1		<1			
<i>repeat</i>	<1		<1			
<i>+As/+P digestion process blank</i>	<3		<1			
gel blank	795 <sup>a</sup>	80	42.5 <sup>a</sup>	9		
repeat	1,066	107	<2			
repeat	599	60	<2			
<b>MEDIA</b>	<b>μM</b>		<b>μM</b>			
<i>water blank</i>	<0.03		<0.01			
<i>repeat</i>	<0.03		<.01			
-P/-As media (-vitamins, - arsenic, -phosphate, - glucose) 5 Apr 2010 batch	3.7	0.4	0.26	0.03		
-P/-As media (-vitamins, - arsenate -phosphate, - glucose) 11 June 201 batch	<0.3		0.43	0.04		
-P/+As media (+vitamins, +10 mM glucose, + arsenate) 29 July 2010 batch	2.9	0.3	33,520	3,352		
-P/+As media (+ vitamins, +10 mM glucose, +arsenate) 5 Apr 2010 batch	2.7	0.3	39,920	3,992		
+P/-As media (+ vitamins, +10 mM glucose, + phosphate) 5 Apr 2010 batch	2,003	200	0.16	0.02		
cell wash solution -P/-As media (-vitamins, - arsenic, -phosphate, - glucose, - trace metals), 3 July 2010 batch	7.4 <sup>o</sup>	23	<0.01 <sup>o</sup>			

Table S1 continued. ICP-MS analyses.\*

DNA/RNA EXTRACTS, GELS AND PHENOL SAMPLES	P ppb	+/- <sup>c</sup>	As ppb	+/- <sup>c</sup>	As/P	+/- <sup>d</sup>
<i>+As/-P DNA/RNA extract GFAJ</i>	2,081	174	<20			
<i>-As/+P DNA/RNA extract</i>	266,000 <sup>b</sup>	26,600	118	35.3		
<i>+As/-P DNA/RNA GFAJ gel</i>	2,339	117	89	18	0.038	0.008
<i>+As/-P RNA gel</i>	455	46	<1		-	
<i>-As/+P DNA/RNA GFAJ gel</i>	1,820	180	12	2	0.007	0.0015
<i>-As/+P RNA gel</i>	4,063	406	6.3	1.3	0.002	0.0003
<i>-As/+P gel</i>	6,110	610	<1		-	
<i>-As/+P phenol</i>	241,100	12,100	3,650	365	0.02	0.0017
<i>repeat</i>	269,100	29,100	3,717	370	0.01	0.002
<i>+As/-P phenol</i>	4,170	830	4,880	770	1.17	0.30
<i>repeat</i>	4,670	930	4,570	460	0.98	0.22
<b>CELLS</b>	<b>dry wt %</b>	<b>dry wt %</b>	<b>dry wt %</b>	<b>dry wt %</b>		
<i>+As/-P cells<sup>b</sup></i>	0.023	0.002	0.114	0.011	4.91	0.69
<i>repeat<sup>b</sup></i>	0.023	0.002	0.200	0.020	8.55	1.21
<i>repeat<sup>b</sup></i>	0.024	0.002	0.624	0.062	26.56	3.76
<i>repeat<sup>b</sup></i>	0.036	0.004	0.550	0.055	15.19	2.15
<i>+As/-P cells</i>	0.014	0.001	0.010	0.001	0.76	0.08
<i>repeat</i>	0.011	0.001	0.010	0.001	0.97	0.11
<i>repeat</i>	0.011	0.001	0.009	0.001	0.83	0.09
<i>repeat</i>	0.011	0.001	0.011	0.001	0.95	0.11
<b>average</b>	0.019	0.009	0.191	0.25	<b>7.3</b>	<b>9.3</b>
<i>-As/+P cells<sup>b</sup></i>	0.66	0.07	0.0006	0.0001	0.0004	0.0001
<i>repeat<sup>b</sup></i>	0.23	0.02	0.0005	0.00005	0.0011	0.0002
<i>-As/+P cells</i>	0.63	0.06	0.0015	0.0001	0.0023	0.0003
<i>repeat</i>	0.65	0.06	0.0015	0.0001	0.0022	0.0003
<b>average</b>	0.542	0.210	0.0010	0.00053	<b>0.0015</b>	<b>0.0009</b>

\*Correlation coefficient of sample addition curve was between 0.58 and 0.9. <sup>b</sup>Sample was from batch grown in June 2010. All other samples were grown in a separate batch in July 2010. <sup>c</sup>Errors are calculated as the standard deviation on replicate analyses or 10%, whichever is larger. <sup>d</sup>Error is the expanded error including uncertainties on measurements. "Repeat" indicates a replicate sample digestion and analysis. Sample names in italics designates that the sample was analyzed in several dilutions and on multiple analytical sessions with separate calibration curves, but not as standard addition curves.

**Table S2. NanoSIMS gel elemental concentrations and ion ratios.<sup>†</sup>**

	P		As		As/P	As/P	<sup>31</sup> P/ <sup>12</sup> C <sup>-</sup>	+/-	<sup>75</sup> As/ <sup>12</sup> C <sup>-</sup>	+/-	<sup>75</sup> As/ <sup>31</sup> P <sup>-</sup>
	ppb <sup>a</sup>	+/- <sup>b</sup>	ppb <sup>c</sup>	+/-	g/g	atom/atom					
+As/-P DNA	299	36	27	5	0.09045	0.03738	2.52E-04	3.06E-05	1.34E-05	2.48E-06	5.31E-02
-As/+P DNA	1017	237	14	3	0.01361	0.00562	8.58E-04	2.00E-04	6.85E-06	1.56E-06	7.99E-03
-As/+P RNA	1202	93	5	1	0.00411	0.00170	1.01E-03	7.81E-05	2.45E-06	5.25E-07	2.41E-03
Blank <sup>d</sup>	820	143	15	3	0.01829	0.00756	6.92E-04	1.21E-04	7.43E-06	1.50E-06	1.07E-02

<sup>†</sup>Measurements are mean values for splits of excised agarose gel bands loaded with purified GJAJ-1DNA and RNA; the other portion was run by ICP-MS. <sup>a</sup>Elemental concentrations are for hydrated agarose. <sup>b</sup>All error values reported in this table are 2 \* standard error. <sup>c</sup>Blank values were measured on agarose gel segments excised from outside of electrophoresis lanes; these are an upper limit of expected background ion concentrations caused by trace impurities in agarose, loading dye or ethidium bromide stain.

**Table S3. Various bond length distances of typical phosphate containing biomolecules between phosphorus, oxygen and carbon atoms.<sup>‡</sup>**

<i>Compound (PDB ID)</i>	<i>Type</i>			
	P-O	P-C	P-P	P-C <sub>2</sub>
ATP (ANP)	1.69 1.75 1.76	2.91	3.24	-
NAD (NAD)	1.65 1.78	2.70	2.86	4.24
Glucose-6-phosphate (B6G)	1.49 1.62	2.45	-	3.86
acetyl-CoA (ACO)	1.50 1.64	2.49	2.63	3.65 3.91
Glycogen synthase kinase-3β inhibitor complex(3F88)	1.46 1.55 1.56 1.58	2.51	-	3.35 3.38
DNA (7BNA)	1.47 1.58	2.52 2.66	-	3.36 3.76 3.97 4.14

<sup>‡</sup>These structures were taken directly from the protein databank ([www.pdb.org](http://www.pdb.org), S22) and are “ligand structures” standards in the PDB while 3F88 is an example of a phosphorylated protein. They have been identified in a range of biomolecules.

**Table S3: Sequences used for phylogenetic tree construction**

<b>Taxon</b>	<b>Accession</b>
<i>Actinomyces meyeri</i> strain Prevot 2477B	NR_029286
<i>Bacillus selenitireducens</i> strain MLS10	NR_028707
<i>Bordetella trematum</i> strain DSM 11334	NR_025404
<i>Burkholderia kururiensis</i> strain KP23	NR_024721
<i>Comamonas nitratorans</i> strain 23310	NR_025376
<i>Demetria terrigena</i> strain HK1 0089	NR_026425
<i>Desulfobulbus elongatus</i> strain FP	NR_029305
<i>Desulfonatronum thiodismutans</i> strain MLF1	NR_025163
<i>Desulfovibrio longreachensis</i> strain 16910a	NR_029364
<i>Ehrlichia muris</i> strain AS145	NR_025962
<i>Escherichia coli</i> strain O157:H7	EU118103
<i>Geobacter pelophilus</i> strain Dfr2	NR_026077
<i>Halomonas alkaliphila</i>	AJ640133
<i>Halomonas</i> sp. DH77	FJ404755
<i>Halomonas</i> sp. G27	EF554887
<i>Halomonas</i> sp. GTW	DQ279849
<i>Halomonas</i> sp. IB-O18	AM490136
<i>Halomonas</i> sp. ML-185	AF140007
<i>Halomonas</i> sp. mp3	AJ551117
<i>Halomonas venusta</i> strain NBSL13	FJ973521
<i>Helicobacterbilis</i> strain Hb1	NR_029182
<i>Leptothrix discophora</i> strain SS-1	NR_025916
<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> strain MSR-1	NR_027605
<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> strain DSM 3856	NR_026381
<i>Methylobacterium nodulans</i> strain ORS 2060	NR_027539
<i>Mycobacterium goodii</i> strain M069	NR_029341
<i>Nitrobacter alkalicus</i> strain AN1	NR_024920
<i>Nitrosomonas eutropha</i> C91	NR_027566
<i>Oscillatoria</i> sp. PCC 8927	GQ351575
<i>Paracoccus alkenifer</i> strain A901/1	NR_026424
<i>Paracoccus pantotrophus</i> strain ATCC 35512	NR_026457
<i>Roseospira navarrensis</i> strain SE3104	NR_025440
<i>Spirochaeta americana</i> strain ASpG1	NR_028820
<i>Sulfurospirillum halorespirans</i> strain PCE-M2	NR_028771
<i>Thioalkalimicrobium cyclicum</i> strain ALM1	NR_028806
<i>Thioalkalivibrio jannaschii</i> strain ALM2	NR_028807
<i>Tindallia californiensis</i> strain APO	NR_025162
<i>Tsukamurella pulmonis</i> strain IMMIB D-1321	NR_029302
<i>Wolinella succinogenes</i> strain ATCC 29543	NR_025942