

25. Medio Ambiente

Producción y Caracterización de Heterobactina B de *Rhodococcus erythropolis* S43, un sideróforo quelante de arsénico.

Retamal-Morales, Gerardo; Levicán, Gloria; Menhert, Marika; Schlömann, Michael;
Schwabe, Ringo.

perezj@gmail.com; sanchezm@yahoo.com;

Facultad de Química y Biología, Facultad de Física y Química

Universidad de Santiago de Chile, Technische Universität Bergakademie Freiberg.

Resumen

El arsénico es un metaloide ubicuo, sin embargo, puede convertirse en un contaminante debido a actividades industriales como la minería. Este metaloide es altamente tóxico y un problema ambiental en varios países, entre ellos Chile y Alemania, donde la descontaminación del arsénico es un problema pendiente. *Rhodococcus erythropolis* S43 es una actinobacteria tolerante al arsénico aislada de un suelo contaminado con el metaloide desde una mina de plata, ubicada cerca de Freiberg, Alemania. Esta cepa es capaz de producir sideróforos cuando se expone a condiciones de carencia de hierro. Este trabajo explora la ruta putativa de producción de sideróforos en *R. erythropolis* S43 y la capacidad quelante de arsénico de estos compuestos. Para inducir la producción de sideróforos, la cepa se cultivó en medio M9 libre de hierro y la capacidad quelante de hierro y arsénico se evaluó utilizando el ensayo colorimétrico CAS y As_mCAS respectivamente. La actividad quelante obtenida fue expresada en concentración μ MEq de desferroxamina B (DFOB). Los metabolitos obtenidos mostraron capacidad quelante hierro y arsénico, logrando una actividad equivalente a 160 μ M de DFOB en el extracto crudo y aproximadamente 10 mM de DFOB en un extracto concentrado en 80% metanol. Este último se analizó mediante HPLC, donde mostró un único pico de absorbancia a tiempo de retención de 11,8 minutos, el cual es responsable de la actividad quelante del extracto. Estos hallazgos sugieren que *R. erythropolis* S43 produce un solo tipo de sideróforo (heterobactina) el cual es capaz de quelar hierro y arsénico. Este resultado abre una nueva perspectiva para enfrentar el problema de la contaminación con arsénico utilizando la capacidad quelante de los sideróforos bacterianos.

Palabras clave: actinobacteria, sideróforos, arsénico, biorremediación

Introducción

El arsénico y el problema de la contaminación.

El arsénico (As) es un metaloide ubicuo en la corteza terrestre, ocupa el 20º lugar en abundancia en el planeta y se encuentra en suelos, agua y el cuerpo humano (Mandal and Suzuki 2002). Puede estar en cuatro estados de oxidación, como arseniato [As(V)], arsenito [As(III)], arsénico elemental [As (0)] y arsano [(As(-III))]. En general en forma insoluble en los minerales, este metaloide puede convertirse en contaminante de diversos ambientes, como resultado de la explotación minera, la industria textil y la industria productora de conductores y semiconductores (Welch et al. 2000). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha determinado como límite aceptable de As en el agua potable una concentración de 10 µg/L (Gorchev and Ozolins 2011), pero en muchas partes del mundo (por ej. Bangladesh, Camboya, Vietnam, Estados Unidos y Chile) las concentraciones exceden con creces los estándares internacionales (Marshall et al. 2007). Si bien hoy en día existen distintas tecnologías de remoción del As, la mayoría de estas tienen altos costos de inversión y mantención, convirtiéndolas en incompatibles con las comunidades de baja tecnología y bajos recursos. Por lo tanto, la contaminación por el metaloide sigue siendo un problema pendiente,

especialmente en el norte de Chile (Ferreo and Sancha 2006).

Sideróforos bacterianos para descontaminación de arsénico.

Los sideróforos son moléculas orgánicas de bajo peso molecular que poseen alta afinidad por el hierro férrico [Fe(III)]. Son producidos por plantas, hongos y bacterias bajo condiciones de déficit nutricional, debido a que el hierro es un nutriente vital para el desarrollo y crecimiento de plantas y bacterias. La función primaria de los sideróforos es la captura del ion férrico disponible en el medio extracelular para posteriormente utilizarlo en el metabolismo celular (Kraemer et al. 2015). La síntesis de sideróforos es producto de una acción combinada de sintetetasas de péptidos no ribosomales (NRPS de la sigla en inglés) y otras enzimas presentes en las bacterias productoras (Renshaw et al. 2002). Las NRPS son grandes proteínas multifuncionales con una estructura modular capaces de sintetizar péptidos independientemente de los ribosomas (Mootz, Schwarzer, and Marahiel 2002). Los péptidos formados por éstas proteínas pueden ser modificados por otras enzimas celulares, por lo que una misma NRPS puede participar en la formación de distintos sideróforos (Haas 2003). Por esto, la presencia de genes que codifican para NRPS en un genoma bacteriano es

indicativo de la producción de uno o más tipos de sideróforos por parte de un microorganismo.

Se ha reportado que estas moléculas son únicas de cada especie bacteriana, incluso, específicas de cada cepa, por lo que estudiar la síntesis y características de los sideróforos es un trabajo particular para cada organismo (Miethke and Marahiel 2007), de esta forma, los estudios de sideróforos deben efectuarse estudiando cepas puras y de los hallazgos pueden ser particulares de cada cepa.

Varios grupos de investigación han descrito cómo los sideróforos actúan frente a distintos elementos distintos del hierro y se ha determinado que independiente de su función fisiológica primaria (quelar el ion férrico frente en condiciones de déficit nutricional), la actividad quelante de los sideróforos bacterianos puede ser efectiva frente a otros elementos, sin embargo, la función fisiológica de este fenómeno no es siempre claro.

Se ha reportado que los sideróforos bacterianos son capaces de unir algunos elementos potencialmente tóxicos como cobre (Cu), cobalto (Co), cadmio (Cd) y As, sin embargo, en muchos casos la capacidad quelante de

éstos se restringe solo a experimentos del tipo químico (Ahmed and Holmström 2014). En un intento de analizar la participación de los sideróforos como un mecanismo nutricional frente a elementos distintos del hierro, se realizaron estudios en la bacteria *Azotobacter vinelandii*, la cual produce los sideróforos azotoquelina y azotobactina. Estos compuestos tienen la capacidad de quelar molibdeno (Mo) y vanadio (V) para utilizarlos como cofactor de una enzima nitrogenasa que requiere específicamente de estos metales (Thomas et al. 2009). Si bien este comportamiento no ha sido descrito ampliamente, es posible esperar la participación de éstos quelantes como un mecanismo nutricional frente a distintos elementos.

En otros estudios se ha señalado que los sideróforos pueden participar como un mecanismo de tolerancia frente a elementos tóxicos. Se ha visto que la pioquelina y pioverdina, sideróforos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, tienen la capacidad unir un amplio rango de metales tóxicos como Ag, Al, Cd, Co, Cr, Cu, Eu, Ga, Hg, Mn, Ni, Pb, Sn, Tb, Ti y Zn. En este caso, los metales son inmovilizados en el medio extracelular y no se incorporan a la célula bacteriana. Este comportamiento es diferente al descrito anteriormente, donde el elemento unido al sideróforo no es asimilado con un

fin nutricional, por lo tanto, se sugiere que los sideróforos podrían jugar un rol en la tolerancia a metales (Braud et al. 2010).

Respecto a la capacidad de los sideróforos de unir arsénico se ha descrito que los sideróforos de *P. azotoformans* tienen la capacidad de quelar un amplio rango de elementos, entre ellos arsénico; quelando hasta el 93% del arsénico de un suelo contaminado (Nair, Juwarkar, and Singh 2007), sin embargo las características moleculares de estos compuestos no han sido descritas. Si bien el rol de los sideróforos frente a la tolerancia a As no es claro hasta la fecha, estudios han reportado la producción de sideróforos quelantes de arsénico por parte de actinobacterias tolerantes al metaloide. Éstos aislados produjeron sideróforos con alta actividad quelante de arsénico, al ser comparados con la actividad quelante del EDTA (G. Retamal-Morales et al. 2018). Sin embargo, una vez más, las características estructurales de los metabolitos quelantes de arsénico no fueron descritas, dejando pendiente la interrogante si la naturaleza química de los sideróforos quelantes de arsénico es similar a la de los sideróforos quelantes de hierro tradicionalmente descritos.

En este trabajo se estudió la producción de sideróforos quelantes de

arsénico a partir de *Rhodococcus erythropolis* S43, un aislado tolerante al metaloide, para esto, se determinó la capacidad de unir arsénico de los sideróforos producidos por la cepa S43, los que posteriormente fueron caracterizados químicamente para conocer su estructura.

Objetivo

Caracterizar la estructura química de los sideróforos quelantes de arsénico producidos por *R. erythropolis* S43, en presencia y ausencia de estrés por arsénico.

Materiales y Métodos

Cultivo de cepa bacteriana y producción de sideróforos.

Rhodococcus erythropolis S43 fue obtenida por colaboración con la Universidad de Freiberg, Alemania. Esta ha sido previamente caracterizada como una cepa tolerante a arsénico (Sultana et al. 2012). La cepa fue incubada en medio LB hasta alcanzar la fase estacionaria. Las células se colectaron por centrifugación a 7.000 x g durante 20 min, y posteriormente se lavaron con NaCl 0,9% estéril para eliminar el hierro remanente. Finalmente, las células se cultivaron en dos condiciones, medio M9 libre de hierro suplementado con glucosa

0,4% (Alexander and Zuberer 1991) y medio M9 libre de hierro suplementado con arsenito de sodio 937 μM (1/8 de la concentración mínima inhibitoria) (Gerardo Retamal-Morales et al. 2018) y glucosa 0,4%. La producción de sideróforos se realizó en un biorreactor de 3 L a 30°C en agitación constante de 180 rpm por 7 días.

Extracción de sideróforos bacterianos.

A partir de 3L de cultivo en cada condición, se colectó el sobrenadante por centrifugación y se realizó una extracción utilizando las resinas Ambierlite® XAD-4 y Amberlite® XAD-16 en una concentración de 5 g/L cada una. La elución de la fase sólida se realizó utilizando metanol para análisis. Posteriormente, el volumen de los extractos fue reducido utilizando un rotavapor a 37°C y presión reducida.

Con el fin de separar los sideróforos de los otros compuestos presentes en el extracto, se realizó un protocolo de fraccionamiento utilizando una columna C18 de fase reversa Hypersep (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Cada extracto fue disuelto en una mezcla de metanol y agua en proporción 1:4 y eluido por la columna de separación. Se obtuvieron seis fracciones de 10 mL a concentraciones crecientes de metanol entre 20 - 100%. Cada fracción fue centrifugada por 10 minutos a 10.000 g y

posteriormente analizada por HPLC. Paralelamente, la actividad quelante de Fe(III) y As(III) de cada fracción se evaluó utilizando el ensayo CAS (Schwyn and Neilands 1987) y el ensayo As_mCAS (Gerardo Retamal-Morales et al. 2018), respectivamente.

Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

Con el objetivo de conocer el nivel de pureza de cada fracción obtenida a partir de los extractos, se realizó un análisis por HPLC a cada una de éstas. El análisis por HPLC se realizó utilizando un equipo U-HPLC Ultimate 3000-2015 (ThermoFischer), equipado con una columna C₁₈ Polaris 5, Agilent (5 μm ; 25 x 4,6 cm) de fase reversa, utilizando una gradiente de elución de metanol y agua des-ionizada con ácido tri-fluoroacético 0,1%. La detección se realizó con un detector Waters 2996 con arreglo de fotodiodo (DAD) y los espectros se registraron entre 200 y 800 nm. Se trabajó a longitud de onda del detector 250 nm. El equipo fue acoplado a un fraccionador Frac920, donde se recuperaron los picos de interés para análisis posteriores.

Análisis por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (CL-EM).

Luego de detectadas las fracciones con actividad quelante de Fe(III) y As(III) a partir del análisis por HPLC, éstas fueron secadas y disueltas en dimetil sulfóxido deuterado (d-DMSO) para su análisis por RMN. El espectro RMN-¹H se realizó utilizando un equipo Bruker Avance III de 600-MHz. Con el objetivo de obtener un espectro de masas, la fracción recuperada fue la del pico de absorbancia obtenido por HPLC, la cual fue secada y disuelta en metanol. Estas fracciones obtenidas por HPLC fueron enviadas al Departamento de Química de la Universidad de Bochum, Alemania, donde se realizó la medición de LC-EM. La separación se realizó utilizando una columna C18 y una gradiente de agua/acetonitrilo con ácido fórmico 0,1%. El espectro de masas fue realizado en modo positivo en un equipo Synapt G2-S HDMS con una fuente ESI y un detector TOF (Senges et al. 2018).

Resultados y Discusión

Este trabajo es la continuación de un estudio que investiga la capacidad quelante de arsénico de sideróforos bacterianos. La capacidad tolerar arsénico y producir sideróforos de *R. erythropolis* S43 fue comprobada y publicada previamente (Gerardo Retamal-Morales et al. 2018).

Análisis por HPLC de extractos de sideróforos de R. erythropolis S43

Con el objetivo de obtener y purificar los metabolitos con actividad quelante de arsénico, y realizar los análisis de estructura, se realizó un fraccionamiento de los extractos a partir de cultivos en medio M9 libre de Fe(III) (condición control) y medio M9 libre de Fe(III) suplementado con arsenito de sodio. Esto último, con el fin de determinar si la adición de As(III) provoca la producción de sideróforos químicamente diferentes a los detectados en una condición control.

Es necesario mencionar que la producción de sideróforos es un fenómeno que sucede en una condición de carencia de nutrientes (Miethke and Marahiel 2007), por lo tanto, son moléculas producidas en bajas cantidades y con alta actividad. De esta forma, el obtener la cantidad suficiente de sideróforos purificados de forma rápida para la caracterización química comprende un desafío que aún debe resolverse. Para enfrentar esta problemática, el cultivo de la cepa S43 se realizó en un biorreactor con agitación constante e inyección de aire, el cual permitió una producción de sideróforos mayor en relación al método tradicional de cultivo en matraz. Además, el protocolo de fraccionamiento utilizando una columna C18 y un sistema de distribución de vacío permitió la recuperación más eficiente, de hasta 104 μ mol de sideróforos (expresado en μ M Eq.

de DFOB) en la fracción obtenida en 80% metanol, y 101 μmol en la fracción de 60% metanol (Tabla 1 y 2), las cuales se

utilizaron posteriormente para los análisis RMN- ^1H y EM.

Tabla 1.- Fraccionamiento de extractos de sideróforos en medio M9 libre de hierro. La actividad quelante de Fe(III) fue determinada utilizando el ensayo CAS, la actividad quelante de As(III) fue evaluada usando el ensayo As-mCAS. Los valores de fold representan la actividad en comparación a un control de EDTA 83.3 μM .

Fraccionamiento de Extracto a partir de medio M9 libre de hierro						
Procedimiento	Etapas	Volumen de Fracción (mL)	Actividad quelante de Fe (fold)	Actividad quelante de As (fold)	mM [DFOB]Eq	Rendimiento (%)
Sobrenadante	Extracto Crudo	3000	1.1	85	160.94	100
Extracción con XAD eluido en metanol	Extracto de XAD	300	57	705	6.5	405
Fraccionamiento con HyperSep C18	C18 MeOH 20%	10	0	0	0	0
	C18 MeOH 40%	10	0.23	0.49	1.1	2.2
	C18 MeOH 50%	10	3.5	0.95	1.2	2.5
	C18 MeOH 60%	10	5.9	10.1	4.5	9.3
	C18 MeOH 80%	10	44	10.8	10.4	21.6
	C18 MeOH 100%	10	7.2	0.90	2.1	4.3

Tabla 2.- Fraccionamiento de extractos de sideróforos en medio M9 libre de hierro suplementado con arsenito de sodio 937 μM . La actividad quelante de Fe(III) fue determinada utilizando el ensayo CAS, la actividad quelante de As(III) fue evaluada usando el ensayo As-mCAS. Los valores de fold representan la actividad en comparación a un control de EDTA 83.3 μM .

Fraccionamiento de Extracto a partir de medio M9 libre de hierro + As(III) 937 μM						
Procedimiento	Etapas	Volumen de Fracción (mL)	Actividad quelante de Fe (fold)	Actividad quelante de As (fold)	mM [DFOB]Eq	Rendimiento (%)
Sobrenadante	Extracto Crudo	3000	0.90	100	0.09	100
Extracción con XAD eluido en metanol	Extracto de XAD	300	33.6	80.9	4	401.7
	C18 20% MeOH	10	0.99	0.94	14.50	4.9
	C18 40% MeOH	10	12	2.52	15.30	5.1
Fraccionamiento con HyperSep C18	C18 50% MeOH	10	13	14	19.80	6.6
	C18 60% MeOH	10	38	8.4	24	7.9
	C18 80% MeOH	10	16.1	1.8	10.1	16.2
	C18 100% MeOH	10	19	0.41	12	0.074

Los cromatogramas obtenidos por HPLC de las fracciones seleccionadas se muestran en la Fig. 1. En la Fig. 1A, se observa un único pico de absorbancia al tiempo de retención 11,8 min, este pico de absorbancia fue recuperado utilizando un fraccionador automático y mostró tener actividad quelante de hierro y arsénico (Tabla 3). La Fig. 1C muestra el cromatograma de la fracción de 60% metanol para el extracto obtenido en la condición de estrés por arsénico, al igual que en la condición anterior se observa un

pico de absorbancia de alta intensidad al tiempo de retención 11,8 min, y además un nuevo pico no registrado en la condición anterior a un tiempo de retención de 10,4 min. Ambos picos fueron recuperados y se evaluó su capacidad quelante de hierro y arsénico. Tal como se observa en la Tabla 3, el pico de absorbancia retenido a 10,4 min. no presentó actividad quelante, mientras que el obtenido al tiempo de retención 11,8 min. presentó actividad quelante de hierro y arsénico. A partir de estos resultados, es posible sugerir que, en ambas condiciones

de cultivo con y sin estrés por arsénico, los compuestos con actividad quelante presentan características químicas similares por tener un perfil de HPLC similar (Fig 1).

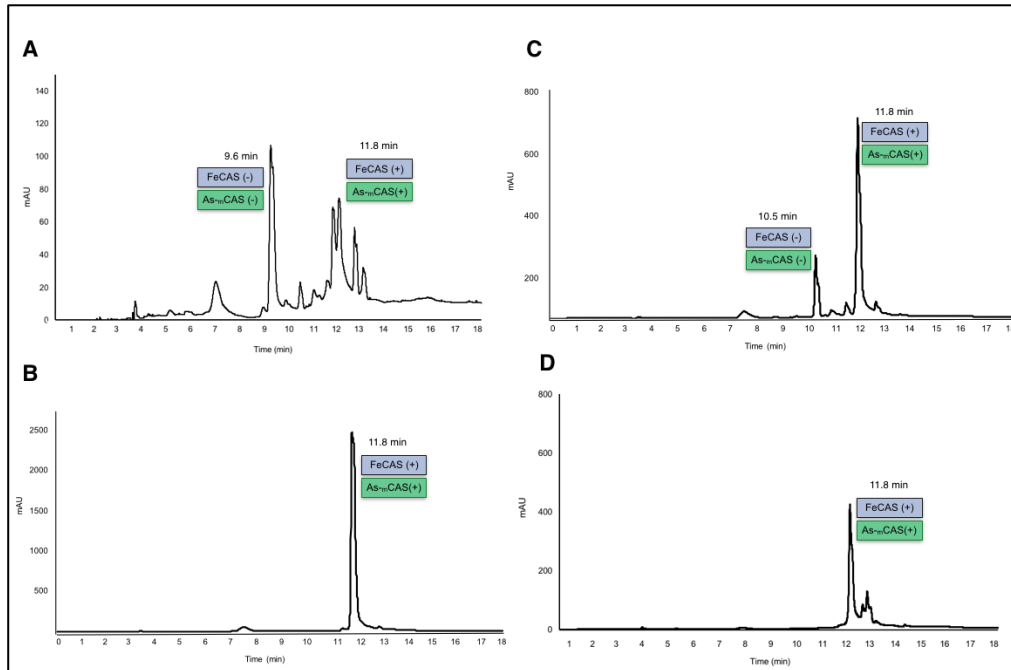


Figura 1.- Cromatogramas de HPLC de fracciones con mejor actividad quelante de Fe(III) y As(III) a partir de extractos extracelulares de *R. erythropolis* S43 (A) Cromatograma de corrida de 18 minutos de fracción en 60% metanol de cultivo obtenido a partir de medio M9 (B) Cromatograma de corrida de 18 minutos de fracción en 80% metanol de cultivo obtenido a partir de medio M9 (C) Cromatograma de corrida de 18 minutos de fracción en 60% metanol de cultivo obtenido a partir de medio M9 y arsenito de sodio 937 μ M (D) Cromatograma de corrida de 18 minutos de fracción en 60% metanol de cultivo obtenido a partir de medio M9 y arsenito de sodio 937 μ M.

Con el objetivo de dilucidar si las propiedades de absorción de estos compuestos son similares, se analizó el espectro de absorción de ambos picos con tiempo de retención 11,8 min. En la Fig. 2 se observa una comparación entre los espectros de absorción de estos

picos y el espectro del sideróforo heterobactina. El espectro de absorción de heterobactina ha sido descrito anteriormente (Bosello et al. 2013), y muestra un máximo de absorción a 300 nm. Para ambos extractos, se observa un único máximo de absorción, similar al

descrito previamente. La similitud entre los espectros de absorbancia descritos para heterobactina y los obtenidos en los

extractos en estudio sugiere fuertemente que estos podrían contener a este sideróforo.

Tabla 3.- Evaluación de actividad quelante de hierro y arsénico en picos de absorbancia obtenidos por HPLC.

Condición	Fracción	Tiempo de Retención (min)	de Act. Quelante de Fe (CAS)	de Act. Quelante de As (As _m CAS)
M9 libre de hierro	60% metanol	9.6	-	-
		11.8	+	+
	80% metanol	11.8	+	+
M9 libre de hierro + As(III) 1937 µM	60% metanol	10.5	-	-
		11.8	+	+
	80% metanol	11.8	+	+

Luego del análisis por HPLC se recuperaron los picos de interés, que presentaron actividad quelante de Fe(III) y As(III), y fueron utilizados para la siguiente

etapa de caracterización por química por CL-EM. Paralelamente, las fracciones con mejor actividad fueron secadas y disueltas en d-DMSO para su análisis por RMN.

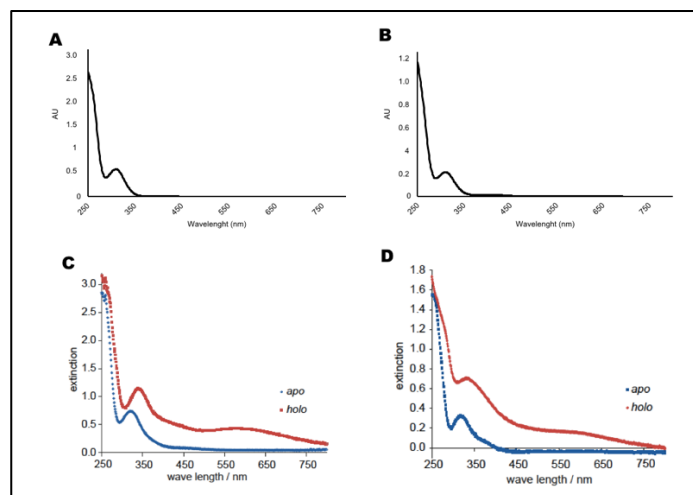


Figura 2.- Espectros de absorbancia de picos de HPLC con actividad CAS y heterobactina. (A) Espectro de pico de absorbancia con tiempo de retención 11,8 min obtenido a partir de cultivo en medio M9, (B) espectro de pico de absorbancia con tiempo de retención 11,8 min obtenido a partir de medio M9 suplementado con arsenito de sodio, (C)

espectro de absorbancia de heterobactina A (Bosello y cols., 2013), (D) espectro de absorbancia de heterobactina S1 (Bosello y cols., 2013).

Análisis de espectro de RMN y MS

Para determinar la estructura de los compuestos con actividad quelante de hierro y arsénico, se realizó un análisis del espectro de RMN-¹H y el espectro de masas (EM) a partir de los picos de absorbancia obtenidos por HPLC. El análisis de RMN-¹H fue realizado en el Instituto de Química orgánica de la Universidad de Freiberg, Alemania; mientras que el análisis por EM fue realizado en el Departamento de Química de la Universidad de Bochum, Alemania.

En el análisis del espectro RMN-¹H de heterobactina A y B han sido presentados previamente (Bosello et al. 2013; Carrano et al. 2001) identificando las señales de protones pertenecientes a

los aminoácidos que componen la estructura básica del sideróforo. El análisis del espectro de RMN-¹H fue realizado para las muestras con actividad quelante, evaluados en ambas condiciones de cultivo (medio M9 y M9 con arsénico), los espectros obtenidos mostraron alta similitud, sugiriendo la presencia del mismo compuesto mayoritario el cual puede observarse en la Fig 3. Con el objetivo de mantener el esquema de análisis de los estudios ya publicados, el análisis de la muestra fue realizado segmentando la molécula en los aminoácidos y ácidos (ornitina, glicina, arginina y ácido 2,3-dihidroxibenzoico) que la componen.

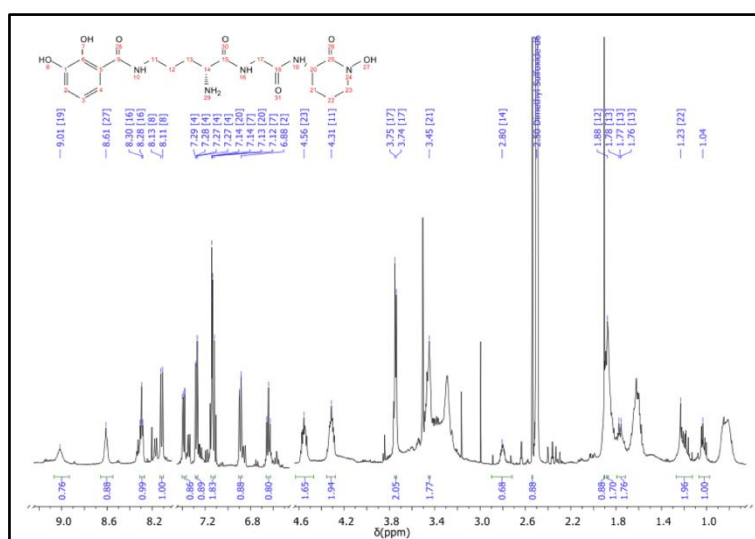


Figura 3.- Espectro RMN-¹H en d₆-DMSO del pico de absorbancia con actividad Fe/As CAS. Espectro obtenido de la muestra en medio M9 con arsenito de sodio.

El espectro de la muestra analizada presenta señales de protones en δ_H 7.27, δ_H 6.89 y δ_H 6.64 que indican la presencia de un anillo aromático correspondiente al ácido 2,3-dihidroxibenzoico, precursor del sideróforo heterobactina (Carran y cols., 2001). Las señales δ_H 8.12 y δ_H 7.13 corresponden a los grupos hidroxilo de este compuesto (Tabla 4, Fig. 4). Con respecto a la presencia del aminoácido ornitina se identificaron señales de protones pertenecientes a un grupo amida (δ_H 7.39) y el grupo amino (δ_H 1.23) así como los protones alifáticos correspondientes a las señales δ_H 4.31; δ_H 1.88; δ_H 1.77. Con relación al aminoácido glicina, se ve representado por la presencia de una señal δ_H 8.30 que sugiere la presencia de un protón perteneciente a un grupo amida y un protón alifático en δ_H 3.74.

Finalmente, una señal en δ_H 9.01 indicaría la presencia de un protón perteneciente a un grupo amida, junto a un anillo alifático de 6 átomos (δ_H 7.14; δ_H 3.45; δ_H 1.23; δ_H 4.56) y un grupo hidroxilo (δ_H 8.61). En la Fig. 4 se muestra la asignación de señales, mientras que en la Tabla 4 es posible analizar cómo cada señal correspondería a los protones de cada aminoácido.

En paralelo, se realizó el análisis de espectrometría de masas de las muestras con actividad quelante de Fe(III)

y As(III) de las fracciones obtenidas por HPLC. El espectro de masas de heterobactina A y B han sido estudiados previamente (Bosello et al. 2013) y los mismos sirven como referencia para comparar la asignación de señales. A partir de los espectros obtenidos se realizó el análisis de los fragmentos

Tabla 4.- Asignaciones (ppm) del espectro de RMN-¹H para Heterobactina B en d6-DMSO.

Señal	Integración (I)	Multiplicidad (m)	Segmento
7.13	1	d	
8.12	1	d	
6.89	1	d	DBHA
6.64	1	t	
7.27	1	d	
7.39	1	dd	
4.31	2	m	
1.88	2	m	Om
1.77	2	m	
2.80	1	m	
1.23	2	m	
8.3	1	t	Gly
3.74	2	d	
9.01	1	s	
7.14	1	d	
3.45	2	m	Arg
1.23	2	m	
4.56	2	m	
8.61	1	s	

utilizando como base la molécula de heterobactina B, obtenida a partir del análisis de RMN-¹H. Dicha asignación de fragmentos se observa en la Fig. 5, y fue entregada por el Instituto de Química de la Universidad de Bochum. La masa molecular del sideróforo heterobactina B (PubChem ID 53261294) es de 437.453 g/mol, mientras que la masa molecular del compuesto corresponde a 437.191 g/mol.

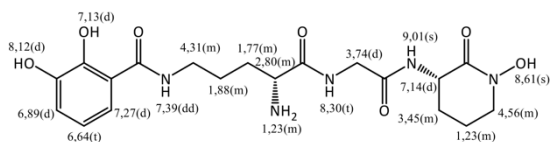


Figura 4.- Estructura de Heterobactina B con asignación de señales RMN-¹H. Los números representan el desplazamiento (ppm) en el espectro de RMN-¹H, mientras que las letras en paréntesis representan el tipo de multiplicidad de cada hidrógeno, s= singlete; d= doblete, t=triplete, m=multiplete.

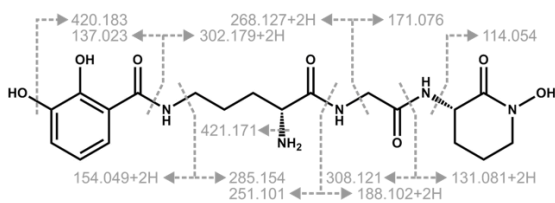


Figura 5.- Estructura de Heterobactina B con asignación de señales de espectrometría de masas. Las flechas grises representan los fragmentos encontrados en el espectro de masas, los números representan la masa (ppm) de cada segmento en particular.

Conclusiones

Para concluir, es necesario tener en cuenta que se ha descrito que algunos sideróforos pueden sufrir modificaciones y a pesar de presentar diferencias en su estructura, poseer un mismo perfil cromatográfico por HPLC. Para abordar este problema, recientemente se ha publicado un protocolo para la separación de sideróforos por HPLC (Heine et al. 2017). Teniendo esto en consideración, es posible que los picos analizados posean más de un tipo de heterobactina. Se ha reportado que además de la heterobactina B, esta puede presentarse en sus formas heterobactina A y heterobactina S1, ambas con estructuras altamente similares. Mientras la heterobactina B posee como sustituyente un hidrógeno en el grupo alfa-amino del aminoácido ornitina, las formas A y S1 presentan 2-hidroxibenzoato, el cual es, probablemente, unido durante la fase de producción del sideróforo (Bosello et al. 2013; Carrano et al. 2001). De este modo, en este caso, la presencia mayoritaria de heterobactina B no descarta la posibilidad de la presencia (en menor concentración) de heterobactina A o S1, por lo tanto, la capacidad quelante de arsénico de los extractos obtenidos de la cepa S43 puede atribuirse en su mayoría, pero no únicamente a heterobactina B. Estos hallazgos posicionan a los sideróforos producidos por *R. erythropolis* S43 como metabolitos con novedosas e interesantes

perspectivas desde el punto de vista
biotecnológico.

4.- Bibliografía

Ahmed, E. and S. J. M. Holmström. 2014. "Siderophores in Environmental Research: Roles and Applications." *Microbial Biotechnology* 7(3):196–208.

Alexander, D. B. and D. A. Zuberer. 1991. "Use of Chrome Azurol S Reagents to Evaluate Siderophore Production by Rhizosphere Bacteria." *Biology and Fertility of Soils* 12(1):39–45.

Bosello, Mattia et al. 2013. "Structural Characterization of the Heterobactin Siderophores from *Rhodococcus erythropolis* PR4 and Elucidation of Their Biosynthetic Machinery." *Journal of Natural Products* 76(12):2282–90.

Braud, Armelle, Valérie Geoffroy, Françoise Hoegy, Gaëtan L. A. Mislin, and Isabelle J. Schalk. 2010. "Presence of the Siderophores Pyoverdine and Pyochelin in the Extracellular Medium Reduces Toxic Metal Accumulation in *Pseudomonas aeruginosa* and Increases Bacterial Metal Tolerance." *Environmental Microbiology Reports* 2(3):419–25.

Carrano, Carl J., Megan Jordan, Hartmut Drechsel, Dietmar G. Schmid, and Günther Winkelmann. 2001. "Heterobactins: A New Class of Siderophores from *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 Containing Both Hydroxamate and Catecholate Donor Groups." *BioMetals* 14(2):119–25.

Ferreccio, Catterina and Ana María Sancha. 2006. "Arsenic Exposure and Its Impact on Health in Chile." *Journal of Health, Population and Nutrition* 24(2):164–75.

Gorchev, H. G. and G. Ozolins. 2011. *WHO Guidelines for Drinking-Water Quality*.

Haas, H. 2003. "Molecular Genetics of Fungal

Siderophore Biosynthesis and Uptake: The Role of Siderophores in Iron Uptake and Storage." *Applied Microbiology and Biotechnology* 62(4):316–30.

Heine, T., M. Mehnert, R. Schwabe, and D. Tischler. 2017. "Siderophore Purification via Immobilized Metal Affinity Chromatography." *Solid State Phenomena* 262 SSP:505–8.

Kraemer, Dennis, Malte Junge, Thomas Oberthür, and Michael Bau. 2015. "Improving Recoveries of Platinum and Palladium from Oxidized Platinum-Group Element Ores of the Great Dyke, Zimbabwe, Using the Biogenic Siderophore Desferrioxamine B." *Hydrometallurgy* 152:169–77.

Mandal, Badal Kumar and Kazuo T. Suzuki. 2002. "Arsenic Round the World: A Review." *Talanta* 58(1):201–35.

Marshall, Guillermo et al. 2007. "Fifty-Year Study of Lung and Bladder Cancer Mortality in Chile Related to Arsenic in Drinking Water." *Journal of the National Cancer Institute* 99(12):920–28.

Miethke, M. and M. A. Marahiel. 2007. "Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71(3):413–51.

Mootz, Henning D., Dirk Schwarzer, and Mohamed A. Marahiel. 2002. "Ways of Assembling Complex Natural Products on Modular Nonribosomal Peptide Synthetases." *ChemBioChem* 3(6):490.

Nair, Anupa, Asha A. Juwarkar, and Sanjeev K. Singh. 2007. "Production and Characterization of Siderophores and Its Application in Arsenic Removal from Contaminated Soil." *Water, Air, and Soil Pollution* 180(1–4):199–212.

Renshaw, Joanna C. et al. 2002. "Fungal Siderophores: Structures, Functions and Applications." *Mycological Research* 106(10):1123–42.

Retamal-Morales, G. et al. 2018. "Detection of Arsenic-Binding Siderophores in Arsenic-Tolerating Actinobacteria by a Modified CAS Assay." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 157.

Schwyn, Bernhard and J. B. Neilands. 1987. "Universal Chemical Assay for the Detection and Determination of Siderophores." *Analytical Biochemistry* 160(1):47–56.

Senges, Christoph H. R. et al. 2018. "The Secreted Metabolome of *Streptomyces Chartreusis* and Implications for Bacterial Chemistry." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 201715713.

Sultana, Munawar et al. 2012. "New Clusters of Arsenite Oxidase and Unusual Bacterial Groups in Enrichments from Arsenic-Contaminated Soil." *Archives of Microbiology* 194(7):623–35.

Thomas, Wichard, Jean Philippe Bellenger, François M. M. Morel, and Anne M. L. Kraepiel. 2009. "Role of the Siderophore Azotobactin in the Bacterial Acquisition of Nitrogenase Metal Cofactors." *Environmental Science and Technology* 43(19):7218–24.

Welch, Alan H., D. B. Westjohn, Dennis R. Helsel, and Richard B. Wanty. 2000. "Arsenic in Ground Water of the United States: Occurrence and Geochemistry." *Ground Water* 38(4):589–604.

Financiamiento: Beca Conycit (G.RM),
Fondecyt 1170799 (GL), Dicyt-USACH,
DAAD (G. RM)