

Anexo 1

Comparación del perfil de metabolitos y la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes que contienen metabolitos de las cepas de *Streptomyces melanosporofaciens* AGL225 y EF-76.

Para comprobar que el *Streptomyces melanosporofaciens* AGL225 y el *S. melanosporofaciens* EF-76 tienen una actividad antimicrobiana y un perfil de metabolitos diferentes, se realizaron diferentes ensayos. Uno de ellos, fue el análisis por HPLC del sobrenadante de los cultivos de cada cepa. Por otro lado, se realizaron diferentes ensayos antimicrobianos con el sobrenadante de los cultivos de ambas cepas.

La cepa *S. melanosporofaciens* AGL225 de Agrolac SA y la cepa *S. melanosporofaciens* EF-76 (BAA-668) adquirida en la colección de cultivos de ATCC se cultivaron en ISP2 y agar avena en placas Petri durante 7 - 12 días a 28°C. La suspensión de esporas se recogió añadiendo 10 ml de agua destilada estéril a la superficie de la placa y raspando con un esparcidor Digralsky estéril. Las suspensiones se filtraron y el recuento se realizó mediante diluciones seriadas 10 veces, tres gotas de 20 µl de cada dilución se extendieron en placas ISP2. Las placas se incubaron durante cinco días a 28°C.

Para el cultivo en matraces agitados, las dos cepas se cultivaron en 30 ml de ISP2 en matraces Erlenmeyer de 100 ml con deflectores. Los matraces se inocularon con 3 ml de suspensión de esporas a 10^6 - 10^7 ufc/ml y se cultivaron a 28°C en un agitador orbital a 125 rpm durante 5-7 días, dependiendo del medio de cultivo. Tras 5 o 7 días de incubación, se obtuvieron sobrenadantes libres de células por centrifugación a 12.000 rpm durante 30 minutos a 15°C y se filtraron con filtros de jeringa de acetato de celulosa (CA) de 0,2 µm - 0,45 µm de tamaño de poro.

1. Análisis por HPLC

Para comparar los perfiles de metabolitos entre las cepas, los sobrenadantes crudos obtenidos anteriormente se sometieron a un análisis de HPLC.

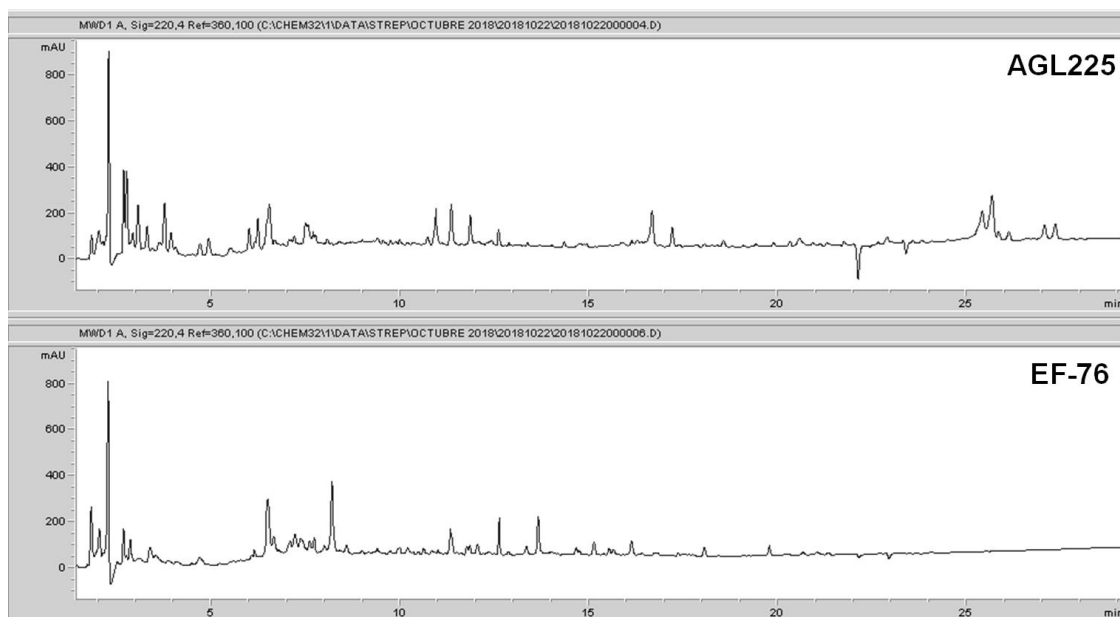
El análisis por HPLC se llevó a cabo en el sistema de HPLC Agilent 1200 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) equipado con un detector de longitud de onda múltiple, utilizando una columna Kinetex XB-C18 de fase inversa (dimensiones de la columna, 250 x 4,6 mm; tamaño de partícula 5 µm; tamaño de poro 100 Å; Phenomenex, España). La elución se controló mediante un detector de UV a 220 nm. El volumen de inyección fue de 50 µl y las muestras se analizaron mediante un procedimiento que consistía en un caudal de 1,25 ml/min utilizando TFA (ácido trifluoroacético) acuoso al 0,1% como disolvente A y 0,1% de TFA en acetonitrilo como disolvente B. El gradiente de disolvente B (%) utilizado se describe a continuación:

Tabla 1. Porcentaje de disolvente B utilizado en relación con el tiempo.

Paso	Tiempo (min)	% de disolvente B
1	0.00	2
2	2.00	2
3	40.00	100
4	45.00	100
5	47.00	2
6	50.00	2

Como era de esperar, los perfiles de HPLC de los sobrenadantes crudos de las dos cepas mostraron claras diferencias entre ellos, indicando que contenían diferentes metabolitos (figura 1).

220 nm



220 nm

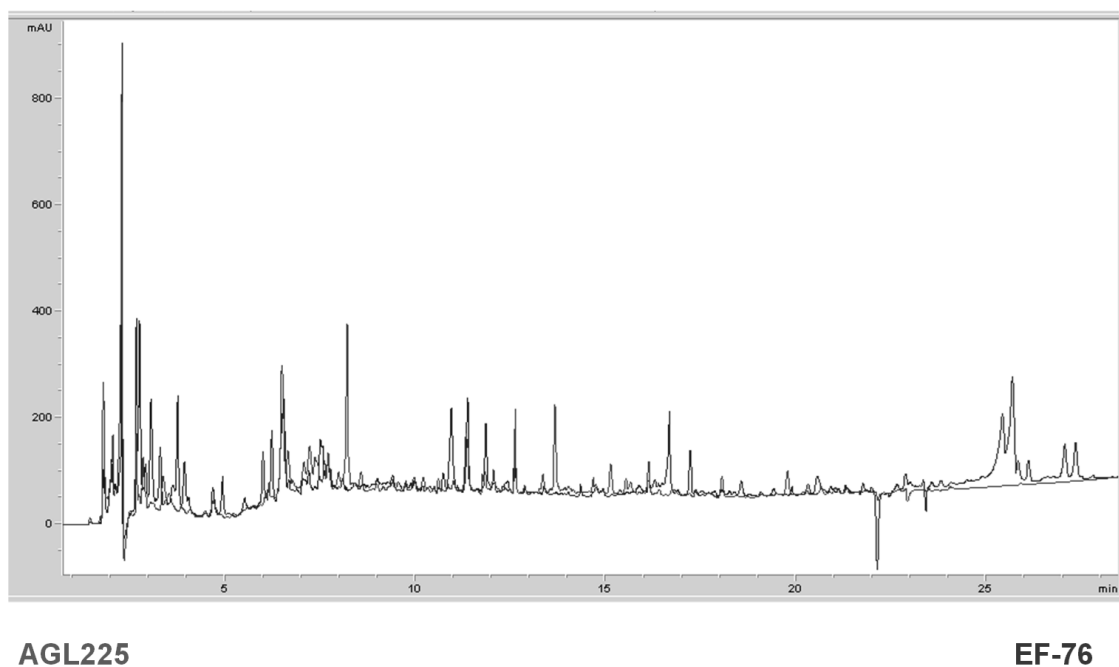


Figura 1. Perfiles de HPLC a 220 nm de sobrenadantes que contienen metabolitos crudos de las cepas de *S. melanosporofaciens* AGL225 y AF-76 (perfiles individuales y superpuestos).

2. Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de los sobrenadantes que contienen metabolitos crudos de cada cepa se determinó mediante un ensayo de inhibición del crecimiento en cultivo líquido. La actividad se

probó contra dos patógenos vegetales bacterianos, *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 y *Xanthomonas arboricola* pv. pruni CFBP5563.

Se obtuvieron sobrenadantes que contenían metabolitos de *Streptomyces melanosporofaciens* AGL225 y de *S. melanosporofaciens* EF-76 cultivados en dos medios diferentes (A y B) siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

El ensayo antimicrobiano se realizó en placas de 100 pocillos. Las muestras contenían sobrenadantes que contenían metabolitos diluidos en $\frac{1}{2}$ o $\frac{1}{4}$, 20 μ l de suspensiones de bacterias patógenas (10^8 ufc/ml) y 80 μ l de caldo LB en un volumen total de muestra de 200 μ l. Los controles positivos contenían agua en lugar del sobrenadante que contenía metabolitos y los controles negativos contenían agua en lugar de la suspensión bacteriana. Se hicieron cinco réplicas para cada sobrenadante de *Streptomyces* y cepa de patógeno vegetal. El ensayo se realizó en un lector automático de densidad óptica (Bioscreen C, Labsystems, Finlandia). Las microplacas se incubaron durante 48 h a 28°C con 10 s de agitación antes de la medición de la absorbancia horaria a 600 nm. La inhibición del crecimiento se determinó mediante el área bajo la curva de crecimiento (AUGC) en comparación con el control. El AUGC de los tratamientos y del control no tratado se calculó de la siguiente manera:

$$AUGC = \sum [(A_i + A_{i+1})/2] * (t_{i+1} - t_i)$$

Donde A_i es la densidad óptica (DO) inicial, A_{i+1} son las mediciones sucesivas de la DO en A_i , t_i es el tiempo inicial de medición de la DO y t_{i+1} es el tiempo sucesivo de las mediciones en t_i .

Las cepas mostraron una actividad antimicrobiana diferente, como se muestra en la figura 2.

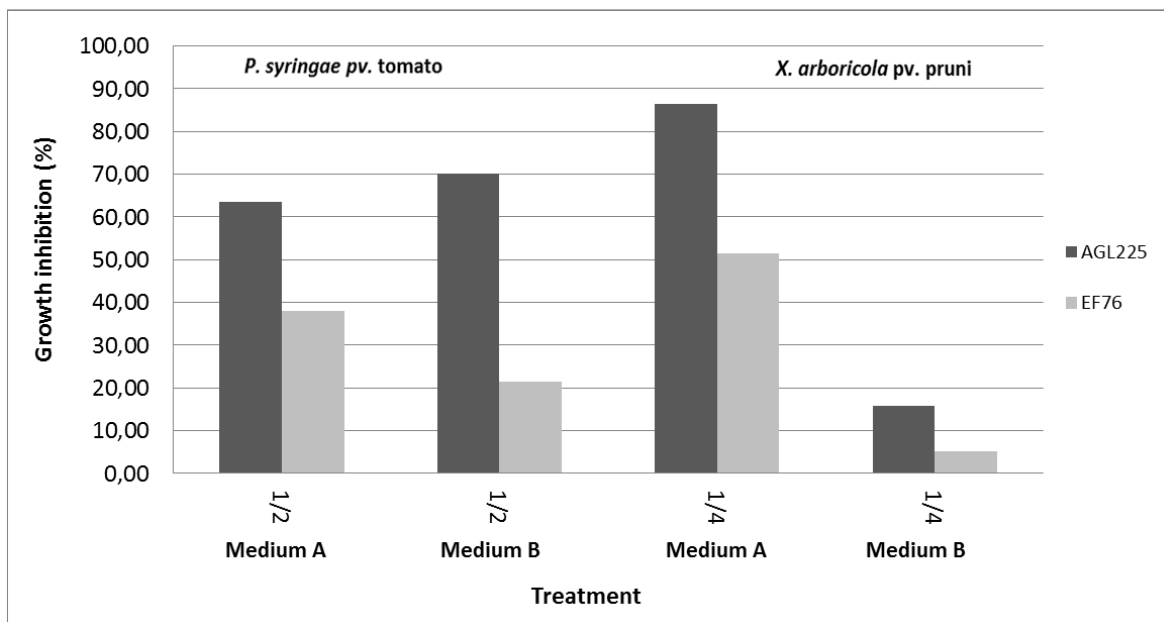


Figura 2. Inhibición del crecimiento (%) de las bacterias patógenas *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 y *Xanthomonas arboricola* pv. pruni CFBP5563 producidas por sobrenadantes que contienen metabolitos de las cepas de *Streptomyces melanosporofaciens* AGL225 y EF-76 cultivadas en dos medios diferentes (A y B).

Los resultados muestran que los sobrenadantes que contienen metabolitos de la cepa AGL225 de *Streptomyces melanosporofaciens* inhiben el crecimiento de las bacterias patógenas ensayadas en mayor medida que los sobrenadantes que contienen metabolitos de la cepa EF-76 de *Streptomyces melanosporofaciens*.