

Purificación y caracterización de un metabolito antifúngico producido por *Pseudomonas fluorescens* CFBP2392

Nadia Riera Faraone

7 de febrero de 2012



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY

Tutor: Natalia Bajsa

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable
Laboratorio de Ecología Microbiana

Tesina de Graduación

Licenciatura en Bioquímica

Facultad de Ciencias



Índice

Introducción	4
1. Microorganismos presentes en la rizósfera	4
2. Control Biológico	4
3. <i>Pseudomonas</i> fluorescentes como agentes de control biológico	7
4. Metabolitos producidos por <i>Pseudomonas</i> fluorescentes	9
5. Antibióticos peptídicos	11
6. Clasificación de péptidos antimicrobianos	12
Antecedentes	14
1. <i>Pseudomonas fluorescens</i> CFBP2392	14
Objetivos	15
1. Objetivo general:	15
2. Objetivos específicos:	15
Estrategia	16
1. Estrategia de trabajo	16
Metodología	17
1. Caracterización funcional del metabolito producido por <i>P. fluorescens</i> CFBP2392	17
2. Purificación del metabolito bacteriano	19
Resultados	22
1. Caracterización funcional	22
2. Purificación del compuesto	28
Discusión	35
1. Caracterización funcional	35
2. Purificación del compuesto antifúngico	38

Conclusiones y Perspectivas	40
Bibliografía	41
Anexo	45
1. Medios de cultivo	45
2. Composición de los buffers	45
3. Abreviaturas	46
Lista de Figuras	47
Lista de Tablas	48

Resumen

La cepa *P. fluorescens* CFBP2392, aislada por primera vez en Francia de la rizófera de poroto, es un potencial agente de control biológico debido a que presenta actividad antagonista contra diferentes microorganismos y no tiene genes correspondientes a metabolitos fitotóxicos. Trabajos anteriores mostraron que esta cepa no produce ninguno de los antibióticos más caracterizados para el género *Pseudomonas*, y sin embargo se pudo observar su actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo*. Este trabajo tuvo como objetivo identificar, purificar y caracterizar un nuevo metabolito antimicrobiano producido por esta cepa. Se probó la actividad antagonista de esta cepa frente a diferentes microorganismos testeando su capacidad inhibitoria *in vitro* contra hongos y bacterias. En primer lugar, se comprobó su capacidad antifúngica contra diferentes especies de hongos fitopatógenos observándose mayor actividad contra *Rhizoctonia solani*. En segundo lugar, se evaluó su posible actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. En este último caso se observó actividad solamente contra dos cepas de *Clavibacter michiganensis*. Para maximizar la producción del compuesto con actividad se probó la capacidad inhibitoria de la cepa crecida en diferentes medios de cultivo. Se logró mayor producción del mismo cuando se agregaba al medio mínimo para *Pseudomonas* casamino ácidos, triptófano y se aumentaba la concentración de Mg^{2+} . Se analizó la estabilidad del compuesto a diferentes condiciones de pH y temperatura para conocer más sobre las características del mismo. Este trabajo se centró en la purificación del compuesto, para ello se realizó una extracción orgánica a partir de un cultivo líquido de la bacteria y se realizaron diferentes métodos a posteriori para lograr purificar las fracciones del extracto total que poseían actividad biocontroladora. Para esto, se realizaron ensayos de antagonismo *in vitro* en cada paso para evaluar la presencia o no del compuesto con actividad. Se lograron identificar dos fracciones de HPLC con actividad antifúngica conteniendo uno o dos compuestos activos, de los cuales se comenzó a estudiar su naturaleza estructural.

INTRODUCCIÓN

1. Microorganismos presentes en la rizósfera

La rizósfera es la zona cercana a la raíz rica en nutrientes debido a los exudados producidos por el vegetal. Se toma como rizósfera hasta unos milímetros de la raíz y allí el crecimiento de microorganismos se ve favorecido. Por este motivo, en esta zona se encuentra una amplia gama de bacterias asociadas que pueden ser beneficiosas, neutras o perjudiciales para las plantas. Muchas de éstas, llamadas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR (del inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria) han sido muy estudiadas ya que se asocian a vegetales ayudándolos a promover su crecimiento. Este nombre se le asigna a aquellas bacterias que cumplen por lo menos con dos de estas tres características: colonizan la raíz de la planta, estimulan el crecimiento vegetal de forma directa o tienen actividad como agentes de biocontrol (Haas D. & Défago G. 2005).

Las PGPR son bacterias asociadas a la mayoría de las plantas, en muchos y diversos ambientes. Algunas colonizan la raíz y otras generan relaciones endofíticas, mostrando que pueden generar relaciones muy estrechas con los vegetales que colonizan. A pesar de tener un nicho ecológico diferente, las bacterias libres de la rizósfera y las endófitas ayudan a promover el crecimiento vegetal básicamente mediante los mismos mecanismos. Éstos microorganismos pueden promover el crecimiento vegetal tanto de forma directa como indirecta (Compant S. *et al* 2005). Los mecanismos directos incluyen el mejoramiento de la nutrición mineral del vegetal (bacterias fijadoras de N_2 , solubilizadoras de fosfato, secuestradoras de hierro), mejora de la tolerancia en la planta al estrés biótico y abiótico y modificación del desarrollo de la raíz (por producción de fitohormonas como auxinas, citoquininas, giberelinas)(Gamalero E. & Glick B. R. 2011). Dentro de los mecanismos de promoción indirecta más conocidos está la competencia con potenciales patógenos por el nicho o un sustrato, la producción de aleloquímicos inhibitorios y la inducción de la resistencia sistémica en el vegetal (Compant S. *et al* 2005).

2. Control Biológico

2.1. ¿Qué es el control biológico?

En un sentido amplio se define al control biológico como cualquier medio por el cual se puede controlar o reducir el efecto o la cantidad de patógenos por un mecanismo biológico que no sea la acción del hombre. Un enfoque un poco más acotado entiende al control biológico como la introducción artificial de microorganismos vivos (también llamados biopesticidas) con el fin de controlar un patógeno vegetal (Hofte M. & Altier N. 2010). En la figura 1 se muestra una ilustración de la interacción planta microorganismo benéfico-patógeno.

Muchos microorganismos patogénicos son una amenaza para los cultivos agrícolas ya que afectan la salud de las plantas. Por este motivo, los productores agrícolas se han visto obligados a utilizar agroquímicos como un método confiable para lograr la estabilidad económica en sus actividades. Sin embargo, el uso de estos pesticidas puede causar efectos negativos y existe una tendencia a disminuir su uso principalmente por tres razones. En primer lugar, los pesticidas químicos generan un impacto negativo a nivel ambiental. Se ha visto que estos compuestos contaminan suelos y aguas, causan pérdidas y daños ambientales, generan un efecto negativo sobre especies no blanco y a su vez tienen un impacto en la biodiversidad (Genevieve L. M. *et al* 2006). En segundo lugar, pueden generar resistencia en los patógenos lo que disminuye la efectividad de los pesticidas (Compant S. *et al* 2005). Por último, existe una creciente demanda por parte de los consumidores de productos libres de pesticidas (Raaijmakers J.

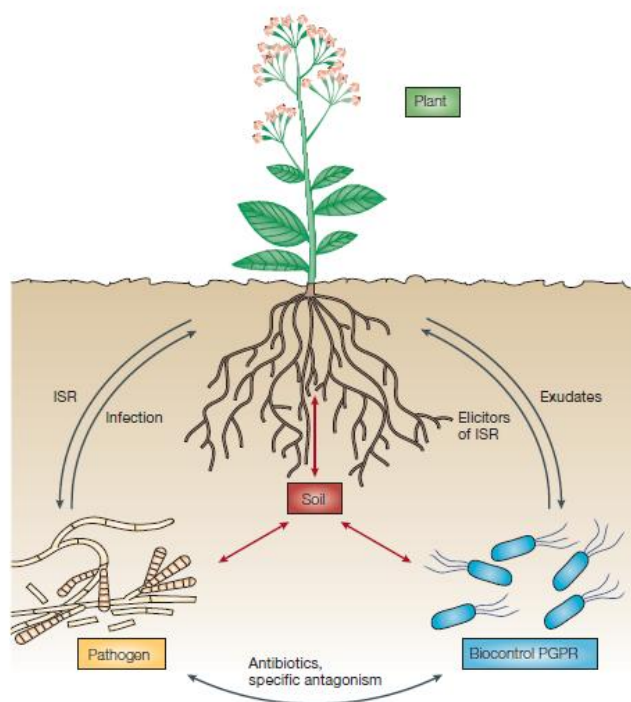


Figura 1: Interacciones entre agentes de control biológico, patógenos y plantas. Estos organismos interactúan entre sí a través de diferentes señales (Haas D. & Défago G. 2005)

M. et al 2002, Compant S. et al 2005). Este aumento se debe a consideraciones en cuanto a la salud humana, ya que muchas autoridades en la salud están expresando su preocupación por los posibles efectos de los residuos químicos que quedan sobre los alimentos. En la Unión Europea, por ejemplo, se ha prohibido el uso de fungicidas que antes estaban permitidos (como el tiabendazol), lo que hace que aumente la desconfianza por parte de los consumidores de estos productos (Raaijmakers J. M. et al 2002, Compant S. et al 2005, Genevieve L. M. et al 2006). Recientemente en Uruguay se ha prohibido el uso de sustancias químicas, preparaciones o formulaciones que contengan endosulfán¹. Estas tres razones, en conjunto con otros factores económicos como el aumento en el costo de estos químicos han hecho que los productores busquen alternativas más amigables para reducir las pérdidas de sus cosechas (Hofte M. & Altier N. 2010).

Por otro lado, hay numerosas enfermedades de las plantas causadas por microorganismos patógenos para las cuales no hay soluciones mediante los agroquímicos convencionales o las soluciones son ineficientes (Raaijmakers J. M. et al 2002, Compant S. et al 2005, Hofte M. & Altier N. 2010). El control biológico ha sido utilizado como método alternativo al uso de químicos y ha mostrado tener muy buenos efectos en cultivos altamente dependientes del uso de éstos (Compant S. et al 2005, Thomashow L. et al 1990). Desde hace varias décadas que se han incorporado bacterias en suelo, raíz, tallo y otras partes de la planta como forma de prevenir enfermedades mejorando así el crecimiento y la salud de la planta (Raaijmakers J. M. et al 2002).

Hasta ahora se han incorporado artificialmente distintos géneros de bacterias con el fin de promover el crecimiento vegetal, fenómeno conocido como bacterización. Dentro de los principales objetivos de la introducción de microorganismos benéficos se encuentra aumentar las asociaciones simbióticas de fijadores de N_2 , degradar compuestos xenobióticos, o el control

¹Montevideo 5 de diciembre de 2011, Decreto aprobado por el Poder Ejecutivo (Aún sin numerar) - Se prohíbe la introducción, producción y utilización de las sustancias químicas y las preparaciones o formulaciones que contengan endosulfán.

biológico de microorganismos patógenos (Raaijmakers J. M. *et al* 2002).

Se han descrito distintos géneros de bacterias como agentes de control biológico como *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, etc. (Raaijmakers J. M. *et al* 2002). Hay registradas 14 bacterias y 12 hongos como agentes de biocontrol por la United States Environmental Protection Agency (EPA). Dentro de estas 14 bacterias se encuentran seis del género *Bacillus*, cinco del género *Pseudomonas*, dos de *Agrobacterium* y una dentro del género *Streptomyces* (Fravel D. R. 2005).

El interés por el control biológico está en aumento. Al 2005, los productos de biocontrol representan aproximadamente un 1 % de las ventas de productos para la agricultura (los pesticidas alcanzan cerca de un 15 %) (Fravel D. R. 2005). En Latinoamérica en particular, los productos de control biológico son aproximadamente el 1,2 % de las ventas y se espera que alcancen un 15-20 % en los próximos 20 años. (Bettiol W. 2011)

2.2. ¿Cómo funciona el control biológico?

Los avances tecnológicos, sobre todo en el área de la biología molecular, han permitido tener un mejor entendimiento de cómo funcionan los mecanismos que operan en estas interacciones planta-microorganismo benéfico-patógeno.

Las bacterias agentes de control biológico pueden mejorar el crecimiento vegetal de diversas maneras. Muchas de éstas tienen la capacidad de usar más de un mecanismo para promover el crecimiento. Los métodos incluyen: producción de compuestos específicos para quelar hierro (sideróforos) y la producción del un amplio espectro de compuestos bioactivos (antibióticos, enzimas, volátiles) que juegan un importante rol en la supresión de patógenos.

A continuación se enumeran los principales mecanismos de biocontrol:

1. Competición por hierro mediada por **sideróforos**. El hierro es un elemento necesario para el crecimiento y muchas veces se encuentra en forma escasa o poco disponible en los suelos. En estas condiciones algunas PGPR pueden sintetizar compuestos llamados sideróforos. Éstos son capaces de quelar el hierro haciéndolo menos disponible para los patógenos u otros microorganismos (los sideróforos producidos por hongos tienen menor afinidad por este mineral que los bacterianos) (Compant S. *et al* 2005).
2. **Antibiosis**. Muchas PGPR son capaces de producir antibióticos. Dentro de estos se encuentran compuestos como el 2,4 diacetilfluoroglucinol (DAPG), cianuro de hidrógeno (HCN), pirrolnitrina y lipopéptidos cíclicos (LPC) entre otros metabolitos secundarios producidos por *Pseudomonas* spp. y otros como oligomicina A, kanosamina, zwittermicina A y xantobaccina producidos por *Bacillus*, *Streptomyces* y *Stenotrophomonas* spp. Estos compuestos inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos, lo cual favorece el crecimiento vegetal (Compant S. *et al* 2005).
3. **Detoxificación** y degradación de factores virulentos. Dentro de los mecanismos de detoxificación se encuentra la capacidad de algunas PGPR de producir proteínas que se unen reversiblemente a toxinas de patógenos, así como la producción de esterases que degradan las toxinas (Compant S. *et al* 2005). Recientemente también se ha descubierto que algunas bacterias tienen la capacidad de degradar señales de quorum-sensing ²de patógenos, impidiendo así que se dispare la síntesis de genes virulentos (Dong Y. H. *et al* 2004).
4. Producción de **enzimas líticas**. Muchos microorganismos pueden producir hidrolasas de la pared celular de algunos patógenos. Se ha demostrado que la quitinasa extracelular y la síntesis de una laminarinasa son las reponsables de la digestión y lisis del micelio de *R. solani* por *Pseudomonas stutzeri* (Lim H. S. *et al* 1991).

²Mecanismo de comunicación intercelular que permite a las bacterias regular la expresión de algunos genes en función de la densidad poblacional.

5. Algunas PGPR logran reducir enfermedades mediante el mecanismo de **inducción de resistencia sistémica**. Este fenómeno denominado ISR (del inglés, Induced Systemic Resistance) es fenotípicamente similar a un fenómeno natural en plantas conocido como SAR (Systemic Acquired Resistance). Ambos mecanismos proporcionan protección a la planta de diferentes tipos de patógenos como hongos, bacterias, virus y en algunos casos también protegen de lesiones de insectos y nemátodos. La SAR se dispara cuando la planta logra activar su mecanismo de defensa en respuesta a una infección primaria. Cuando esto ocurre, la planta logra detener el avance de la enfermedad y se notan síntomas como lesiones necróticas en las hojas. Cuando un microorganismo activa la resistencia sistémica (ISR) no hay síntomas visibles en la planta (Compant S. *et al* 2005).

2.3. Problemas para la utilización de control biológico

Dentro de los requerimientos para ser usados como agentes de biocontrol se encuentra la capacidad de los microorganismos para competir bien en la rizósfera y colonizar el nicho. Estudios muestran que las *Pseudomonas* spp. forman microcolonias en las raíces de cultivos agrícolas. Hay estudios de un amplio espectro de *Pseudomonas* spp. con potencial para ser utilizados como agentes de biocontrol, pero menos de 10 cepas se encuentran comercialmente disponibles como inoculantes. La principal razón de esto es que las *Pseudomonas* spp. no presentan estructuras de resistencia por largos períodos de tiempo (no forman esporas como otros géneros como *Bacillus* y *Trichoderma*) (Walsh U.F. *et al* 2001, Haas D. & Défago G. 2005).

Otra razón es que muchas veces se puede ver inhibición de patógenos *in vitro* pero no aparecen los efectos positivos cuando son probadas *in vivo*. Esta inconsistencia está relacionada en gran parte con lo poco que sabemos hoy en día de qué mecanismos gobiernan la producción de los metabolitos activos en la naturaleza. Poco se sabe de cómo está regulada genéticamente la síntesis de estos compuestos en estudios a campo.

Para registrar una cepa como producto de protección para plantas debe cumplir con requerimientos estrictos en cuanto a potenciales daños en la salud humana y ambiental. Estas pruebas son similares a las que deben pasar los pesticidas químicos. También hay estudios sobre potenciales daños al sistema por el efecto que puede tener la inoculación de estos agentes de control biológico sobre organismos no blanco. En especial se presta mayor atención al efecto sobre micorrizas (asociaciones benéficas de plantas con hongos) y rizobios. También se prueba el efecto sobre bacterias simbióticas o mutualistas y sobre poblaciones totales (Walsh U.F. *et al* 2001).

A su vez, el control biológico ha sido cuestionado como método efectivo para el mejoramiento del crecimiento vegetal ya que su efectividad depende de distintos factores bióticos y abióticos que aun no han sido caracterizados (McSpadden-Gardener B. B. 2007). Además de la especie de cultivo hay otros factores ambientales que tienen un efecto en la diversidad relativa y la actividad de las *Pseudomonas* spp. asociadas a plantas. Dentro de estos factores se destaca el tejido de la planta, el tipo de suelo, la estructura y fertilidad del mismo y la temperatura. Falta conocimiento sobre cómo afectan éstos factores la efectividad de los inoculantes con agentes de biocontrol para que sea eficiente su uso en la agricultura (Picard C. & Bosco M. 2008).

3. *Pseudomonas* fluorescentes como agentes de control biológico

Las *Pseudomonas* fluorescentes son bacterias Gram negativas que pueden contener uno o más flagelos polares. Una característica importante de este género es que no tienen la capacidad

de formar esporas como estructuras de resistencia. Las pseudomonas viven generalmente en condiciones aerobias y están presentes en forma abundante en la rizósfera (Holt J. G. *et al* 1994).

Diversas *Pseudomonas* spp. han probado tener actividad como agentes de biocontrol ya que pueden suprimir enfermedades de vegetales y promover así el crecimiento de plantas. Aparentemente esta capacidad no parece estar ligada a una única especie dentro del género, sino que los genes funcionales relacionados al biocontrol parecerían estar bien distribuidos en diferentes especies a lo largo del género *Pseudomonas*.

Poco se sabe hoy en día de los orígenes evolutivos y de la distribución de estos genes funcionales dentro de las *Pseudomonas* spp. esto quiere decir que no parece haber relación directa entre la actividad biocontroladora y la filogenia dentro de este género. Se han realizado estudios dentro del género *Pseudomonas* buscando genes funcionales relacionados con la capacidad de biocontrol. Estudios realizados a partir del análisis de genomas completos han podido determinar que existen muchas cepas biocontroladoras dentro del género y muchas son diferentes entre sí. Además se ha visto que cepas pertenecientes a un mismo cluster filogenético pueden ser aisladas de lugares geográficos muy diferentes (Hofte M. & Altier N. 2010). Se han encontrado cepas con actividad biocontroladora en diferentes especies dentro del género: *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* y algunas cepas no patógenas de *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas brassicacearum* y *Pseudomonas thevervalensis* (McSpadden-Gardener B. B. 2007)

Las *Pseudomonas* fluorescentes muestran actividad antagonista tanto *in vivo* como *in vitro* y además de aparecer frecuentemente en los aislamientos provenientes de la rizósfera de varios suelos, normalmente son las bacterias cultivables más numerosas (Howell C. & Stipanovic R. 1978, Jayaswal R. & Fernandez M. 1991, Haas D. & Keel C. 1997, Walsh U. F. *et al* 2001). Muchas cepas de *Pseudomonas* spp. han resultado efectivas antagonizando ciertas bacterias y hongos patógenos como *Rhizoctonia solani*³, *Pythium* spp. y *Fusarium* spp. Las *Pseudomonas* spp. son la base de la mayor cantidad de estudios en control biológico por su capacidad de colonizar la raíz, competir agresivamente contra otros microorganismos, adaptarse a diferentes situaciones de estrés ambiental, sintetizar antibióticos, enzimas, volátiles y activar la resistencia sistémica en plantas (Walsh U. F. *et al* 2001, Raaijmakers J. M. *et al* 2002, de Bruijn I. & Maarte J. D. 2007, Weller D. M. 2007, Michelsen F. & Stougaard P. 2010).

La producción de antibióticos por las *Pseudomonas* tanto *in vitro* como en la rizósfera ha sido postulada como el método responsable de la inhibición de patógenos y protección de la planta. Este género de bacterias es el responsable de suelos supresivos⁴ (Walsh U.F. *et al* 2001, Haas D. & Défago G. 2005, Weller D. M. 2007), capaces de suprimir las enfermedades vegetales o reducirlas en forma significativa. Son escasos los casos reportados de estos suelos en el mundo y se caracterizan por su capacidad de detener el crecimiento de patógenos vegetales o por lo menos inhibir los síntomas de plantas con “root rot” y “take-all disease”⁵. Una hipótesis es que esto se debe en gran parte a la producción del antibiótico 2,4 DAPG (Haas D. & Défago G. 2005).

La eficacia de las *Pseudomonas* spp. como agentes de biocontrol está estrechamente ligada a la producción de metabolitos secundarios (Walsh U. F. *et al* 2001) (Thomashow L. S. *et al* 1990). Dentro de los antibióticos más estudiados se encuentran: 2,4 DAPG, derivados de la fenazina, pirrolnitrina, pioluteorina, lipopéptidos cíclicos y moléculas de la superficie celular con actividad biosurfactante y antifúngica (Haas D. & Défago G. 2005). Algunas de estas *Pseudomonas* spp. productoras de antibióticos pueden afectar la viabilidad de los esclerocios

³*Rhizoctonia solani* se caracteriza por tener un amplio rango de huésped, infectando a más de 27 familias de plantas tanto mono como dicotiledóneas (Oard S. *et al* 2004)

⁴Suelos supresivos: Aquellos suelos donde la planta no sufre de enfermedades o éstas se ven reducidas aunque haya patógenos y la planta sea susceptible a éstos. La enfermedad no puede desarrollarse debido a la presencia de microorganismos que lo impiden (Haas D. & Défago G. 2005).

⁵“root rot” pobredumbre radicular, “take-all disease” pietín o mal del pie.

del hongo *Rhizoctonia solani*, inhibir el crecimiento de éstos y proteger a plantas arroz de la infección (Rosales A. M. *et al* 1995). Además, se ha visto que cepas productoras de 2,4 DAPG y derivados de fenazina presentes en la rizósfera tienen un rol importante en la disminución del “take-all disease” y tienen la capacidad de proteger de enfermedades cuando son aplicadas como inoculantes a las semillas (Weller D. M. 2007).

4. Metabolitos producidos por *Pseudomonas* fluorescentes

Dentro de los compuestos con actividad antimicrobiana producidos por *Pseudomonas* fluorescentes más estudiados se encuentran cuatro tipos de metabolitos, cuyas vías de síntesis están caracterizadas. Estos son: la pioluteorina, la pirrolnitrina, el 2,4 diacetilfloroglucinol y derivados de la fenazina. La figura 2 muestra la estructura de algunos de los compuestos más frecuentes sintetizados por *Pseudomonas fluorescens*.

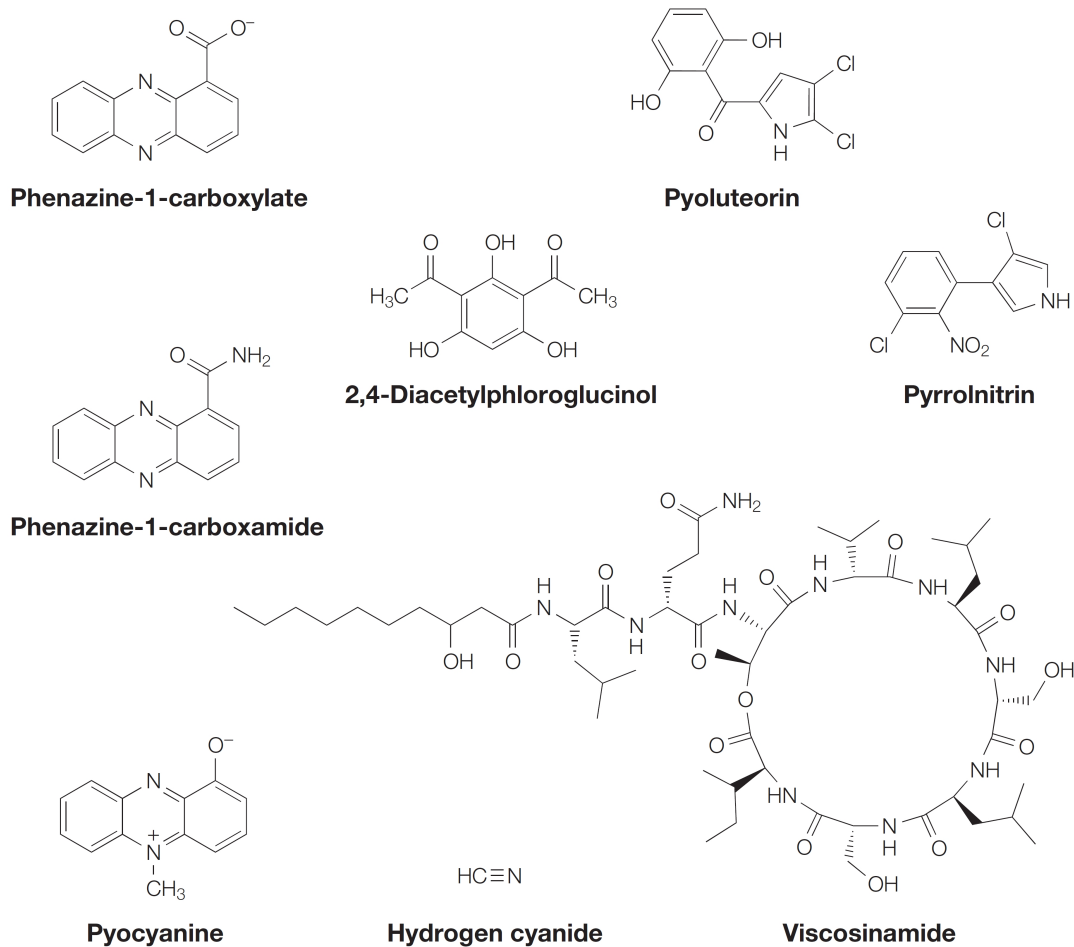


Figura 2: Algunos compuestos con actividad antibiótica producidos por *Pseudomonas* fluorescentes relevantes para el biocontrol (Haas D. & Défago G. 2005).

Los derivados de **fenazina** son generalmente solubles en agua y tienen actividad como antiparasitario, antitumoral y antibiótico contra una amplia gama de microorganismos. Estos compuestos deben sus propiedades antibióticas a su capacidad de reducir agentes como NADH y NADPH causando la acumulación de superóxido y peróxido de hidrógeno. Cepas de *P.*

fluorescens y *P. chlororaphis* han mostrado capacidad para inhibir hongos fitopatógenos gracias a su capacidad de sintetizar estos compuestos.

El antibiótico **2,4 diacetilfloroglucinol** (2,4 DAPG) tiene actividad antiviral, antibacteriana, antifúngica, antihelmítica y propiedades fitotóxicas. Sus mecanismos de acción no han sido del todo caracterizados, pero se ha visto que daña las membranas y zoosporas de *Pythium* spp. Es un inhibidor de la aldosa reductasa, una enzima implicada en el metabolismo de la glucosa y la fructosa. Además de actuar como antagonista directo de patógenos de plantas ayuda al crecimiento vegetal ya que puede inducir resistencia en *Arabidopsis thaliana* contra *Peronospora parasitica* y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

La **pirrolnitrina** es un compuesto con gran actividad antifúngica. Este metabolito es producido por una amplia gama de *Pseudomonas* spp. y tiene actividad contra bacterias y hongos. Se ha utilizado como antimicótico para uso farmacéutico y se han sintetizado derivados para uso en la agricultura.

La **pioluteorina** es un compuesto que tiene actividad contra oomicetos producida por algunas cepas de *Pseudomonas*. Ésta se libera al medio luego de ser producida y tiene actividad herbicida, bactericida y fungicida (De La Fuente L. *et al* 2008)

Las *Pseudomonas* fluorescentes deben su nombre a la capacidad de sintetizar un compuesto extracelular llamado pioverdina. Este compuesto es un sideróforo y tiene la capacidad de unirse al catión férrico (Fe^{3+}) con una constante de asociación del orden de 10^{24} a $pH = 7$. El complejo pioverdina-catión férrico interacciona con un receptor específico de membrana y traspa el Fe^{3+} al interior celular reduciéndolo a catión ferroso Fe^{2+} . En condiciones de baja cantidad de hierro muchas de estas bacterias son capaces de inhibir el crecimiento de hongos y otras bacterias, mostrando actividad bacteriostática y fungistática. Pueden competir a distancia con otros microorganismos que no tienen la capacidad de quelar este catión o con capacidad reducida. Este tipo de inhibición por captura de hierro suele ser dependiente del pH. Aunque se ha visto este mecanismo en diferentes situaciones de antagonismo de varias cepas de *Pseudomonas fluorescens* se cree que éste solo no es suficiente en la mayoría de los casos para causar la inhibición. Esto explica en parte el hecho de que no todas las *Pseudomonas* spp. que producen este compuesto tienen actividad como agentes de biocontrol (Haas D. & Défago G. 2005)

La pioverdina tiene diferentes estructuras dependiendo de la cepa que la sintetiza, y no sólo es producida por *Pseudomonas fluorescens* sino también por otras especies como *P. syringae*. La estructura de este metabolito ha sido caracterizado para varias cepas, incluida la cepa *P. fluorescens* CFBP2392 estudiada en este trabajo. En la figura 3 se muestra la estructura de este metabolito para esta cepa en particular. Este compuesto está formado por tres subunidades: una dihidroxiquinolina (cromóforo), un ácido dicarboxílico y una cadena peptídica de 6 a 12 aminoácidos. La cola peptídica es diferente según la cepa y su estructura es importante para entender el mecanismo de unión a la membrana. Dentro de los aminoácidos que integran la cola peptídica se pueden encontrar tanto D como L-aminoácidos ya que la síntesis del compuesto es a partir de NRPS (Non ribosomal peptide synthase) cuyo mecanismo no se restringe a los 20 aminoácidos de la síntesis ribosomal (Beiderbeck H. *et al* 1999).

Además de los antibióticos mejor caracterizados para la inhibición de microorganismos otros compuestos responsables del antagonismo de ciertos patógenos son los **trigliceripéptidos** encontrados en algunas cepas de *Pseudomonas* spp. Estos péptidos tienen la capacidad de quelar compuestos pero no son sideróforos. Estos compuestos parecerían formar complejos con carbohidratos utilizando el catión Zn^{2+} . Esto muestra otro ejemplo de inhibición por competición por nutrientes (Loginov O. N. *et al* 2003).

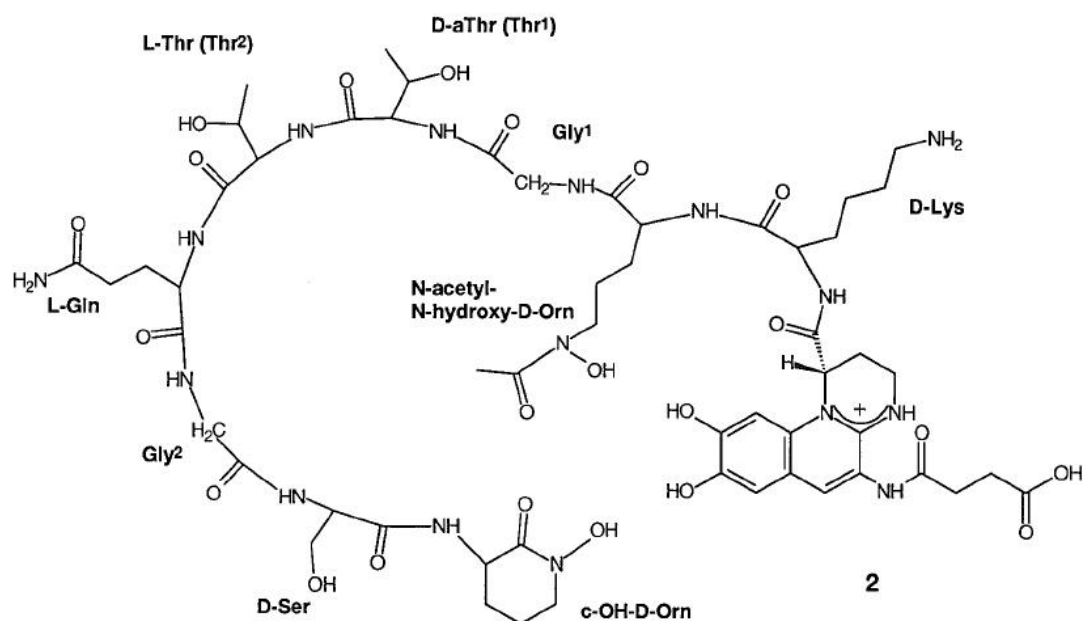


Figura 3: Estructura de la pioverdina producida por *P. fluorescens* CFBP2392 (Beiderbeck H. *et al* 1999).

5. Antibióticos peptídicos

Los péptidos antimicrobianos están siendo muy estudiados hoy en día debido a la necesidad creciente de nuevas drogas antimicrobianas. Para la implementación y desarrollo de éstas, muchos investigadores han tratado de sintetizar químicamente estos péptidos, aunque también es importante la búsqueda de nuevas estructuras en la naturaleza. Si bien existe una amplia gama de péptidos con actividad antimicrobiana *in vitro*, los pequeños péptidos cíclicos son estructuras más prometedoras ya que suelen ser más estables y de una conformación más flexible. Muchos de estos péptidos son producidos por bacterias como producto de su metabolismo secundario (Yang L. *et al* 2002). Otros tienen orígenes en organismos más alejados filogenéticamente como animales marinos, hongos y plantas superiores (Yun Y. S. *et al* 1996).

A continuación se nombran algunos ejemplos de péptidos encontrados en diferentes organismos con diversas actividades biológicas:

Se han encontrado ciclopéptidos alcaloides producidos por *Zyzphuslotus*, una especie vegetal de la familia de las ramnáceas, que se ha utilizado en mezclas de esta planta medicinal por sus propiedades antidiabéticas y antimicrobianas (Ghedira K. *et al* 1994). Otros casos de péptidos cíclicos con actividad biológica no antimicrobiana son los producidos por *Paliurus ramosissimus*, un vegetal de la costa este de Tailandia, que se ha usado como aliviador del dolor en tratamientos de dolor dental y de estómago. Este vegetal produce alcaloides ciclopéptidicos como producto del metabolismo secundario (Lin H. *et al* 2000). Otro ejemplo es *Vaccaria segetalis*, de la familia de las cariofiláceas, que produce segetalinas H y G, pentapéptidos con actividad tipo estrógeno (Yun Y. S. *et al* 1996).

Dentro del dominio Bacteria, otros géneros muy diferentes a las *Pseudomonas spp.* forman compuestos con diversas actividades. Un ejemplo es *Halobacillus litoralis* Y53106 de origen marino que forma ciclopéptidos de diferentes tamaños con actividad antifúngica y antimicrobiana, llamados halolitoralina A, B, y C. (Yang L. *et al* 2002). *Ruegeria sp.* (alfa-proteobacteria marina asociada a la esponja *Suberites domuncula*) produce péptidos cíclicos con actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis* (Mitova M. *et al* 2004). También se ha visto la producción de metabolitos activos en algunas bacterias Gram positivas como *Paenibacillus kobonsis*, que

produce maticina la cual es estructuralmente muy similar a la polimixina M. Este último compuesto ha sido reportado en especies de *Bacillus* y es usado como antibiótico comercial. Se trata de un péptido cíclico con un enlace amino entre el extremo C- terminal de un residuo de treonina y el aminoácido de la cuarta posición. La actividad antimicrobiana se ha testeado contra una gran cantidad de bacterias Gram positivas y Gram negativas incluyendo patógenos de plantas y animales (Martin N. I. *et al* 2003).

Las cianobacterias han recibido mucha atención en el pasado por ser una fuente de compuestos naturales con un amplio espectro de actividades biológicas (Jaki B. *et al* 2000). *Lyngbya confervoides* (cianobacteria marina) produce obinamida, un depsipéptido citotóxico cíclico con un amplio espectro de actividad biológica, desde antimicrobiano a inmunosupresor (Williams P. G. *et al* 2001). *Tolypothrix byssoidea* (cianobacteria) produce tridecapéptidos cíclicos llamados tolisisidinas A y B. Ambos contienen al aminoácido sedhidrohormoalanina (Dhha) y aminoácidos tanto de la conformación D como L, mostrando su origen de síntesis no ribosomal. Estos compuestos muestran actividad antifúngica contra el hongo patógeno humano *Candida albicans* (Jaki B. *et al* 2000). *Lyngbya majuscula* (cianobacteria de Madagascar) produce una gran variedad de metabolitos secundarios como lingbiastatinas, lingbiabellinas, microcolinas, que tienen distintos tipos de actividad biológica como citotoxicidad, inmunosupresión y actividad antibacteriana (Nogle M. & Gerwick W. 2002).

Dentro del reino animal *Philineopsis speciosa* (molusco marino) produce depsipéptidos relacionados a kulolide-1. Estos compuestos son lineales y se han encontrado otros relacionados dentro del género *Laurencia* producto de su metabolismo secundario. Existe la hipótesis de que se trata de péptidos que se encuentran en el molusco como resultado de su ingesta de algas azules que produzcan estos metabolitos (Nakao Y. *et al* 1998).

Nigrosabulum globosum (hongo ascomicota), produce dos péptidos cíclicos, pseudodestruixinas A y B. Éstos compuestos tienen actividad antifúngica contra *Candida albicans*, *Sordaria fimicola* y *Ascobolus furfuraceus* y también presentan actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis* (Che Y. *et al* 2001). *Glarea lozoyensis* (hongo ascomicota) produce metabolitos secundarios llamados pneumocandinas. Estas tienen estructuras muy similares y comprenden hexapéptidos cíclicos que difieren solamente en la sustitución de un residuo de prolina (Osawa A. E. *et al* 1998). *Cochilobolus carbonum* (hongo) produce un tetrapéptido cíclico responsable de la toxicidad y especificidad de este hongo con la planta de trigo. Este hongo produce HSTs (Host Specific Toxins) metabolitos secundarios responsables de su fitopatogenicidad (Walton J. D. 2006). Estos compuestos son químicamente muy diversos, pueden ser policétidos, péptidos cíclicos, terpenos o sacáridos (Walton J. D. 1996). Es importante entender los mecanismos de especificidad en las interacciones planta-patógeno para poder utilizarlos en forma efectiva sin provocar tanto impacto en el ambiente.

6. Clasificación de péptidos antimicrobianos

Una clasificación de los péptidos antimicrobianos producidos por bacterias se basa en su forma de síntesis. Según esta clasificación, estos compuestos pueden ser de dos grupos: de síntesis ribosomal o no ribosomal. El primer tipo incluye los péptidos codificados por el genoma bacteriano y sintetizados en los ribosomas. Este tipo se trata típicamente de péptidos de unos 30 a 60 residuos y generalmente tienen actividad contra bacterias cercanas filogenéticamente (Martin N. I. *et al* 2003). Por otro lado, los péptidos de síntesis no ribosomal denominados NRPs (del inglés Non Ribosomal Peptides) se sintetizan en complejos multienzimáticos. Cada unidad de este complejo contiene dominios catalíticos que luego de diferentes procesos forman un péptido. Algo característico de esta vía de síntesis es que los aminoácidos que se adicionan no están restringidos a los 20 aminoácidos de síntesis ribosomal sino que incluyen residuos de D-aminoácidos, hidroxiaácidos y otros sustituyentes inusuales. Generalmente los aminoácidos de esta cadena formada son más cortos que los péptidos de síntesis ribosomal (menos de 20

aminoácidos) (Becker J. *et al* 2003, Ackerley D. & Lamont I. 2004, Minowa Y. *et al* 2007, Binz T. M. *et al* 2010, Strieker M. *et al* 2010,).

2,4 diacetilfloroglucinol

ANTECEDENTES

1. *Pseudomonas fluorescens* CFBP2392

El Laboratorio de Ecología Microbiana del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable cuenta con la cepa *Pseudomonas fluorescens* CFBP2392 (sinónimo A6) aislada por primera vez a partir de rizófera de poroto (*Phaseolus vulgaris*). Esta cepa ha mostrado tener actividad como agente de biocontrol ya que suprime la podredumbre radicular inducida por *R. solani* en tomate. Se observó que esta bacteria disminuye la infección por el fitopatógeno en células radiculares hasta un 90% e interviene positivamente en el desarrollo de la raíz y tallo de plantas de tomate en un 214% y 156%, respectivamente (Gamalero E. & Martinotti M. G. 2002, Berta G. *et al* 2005).

Se han realizado estudios sobre esta bacteria para identificar y aislar los compuestos implicados en su actividad biocontroladora. Estos mostraron que esta cepa no produce ninguno de los antibióticos más caracterizados dentro del género *Pseudomonas* involucrados en la protección de plantas contra patógenos (Bajsa N. 2003, Bajsa N. *et al* 2003).

Trabajos previos han contribuido a la determinación parcial de la estructura del metabolito activo aunque todavía ésta no se ha logrado establecer completamente. Estos estudios parecerían indicar que la cepa *P. fluorescens* CFBP2392 produce un péptido cíclico con actividad antifúngica de tres o cuatro aminoácidos. Análisis preliminares mostraron que podría contener valina, leucina, glutamato e isoleucina aunque aun resta determinar su secuencia (Bajsa N. 2003). Hasta el momento no han sido encontrados péptidos de estas características dentro del género *Pseudomonas*, aunque sí se conocen moléculas de naturaleza similar aisladas a partir de otras especies. Se ha observado que estos péptidos pueden actuar de diferentes formas ya sea inhibiendo el crecimiento fúngico (Yang L. *et al* 2002) o bacteriano (Mitova M. *et al* 2004), presentando actividad anticancerígena (Zhao P. *et al* 2007), o participando en la interacción hongo-planta (Walton J. D. 2006, Yin J. *et al* 2010).

Este trabajo busca optimizar un protocolo para la purificación del compuesto activo para continuar con su caracterización funcional y la posterior elucidación estructural.

OBJETIVOS

1. Objetivo general:

Purificar y caracterizar un compuesto con actividad antifúngica producido por la cepa *P. fluorescens* CFBP2392.

2. Objetivos específicos:

1. Caracterizar el espectro de acción del compuesto.
2. Evaluar la estabilidad de la actividad frente a cambios de temperatura y pH.
3. Optimizar un método de purificación del metabolito antifúngico a partir de cultivos de *P. fluorescens* CFBP2392.

ESTRATEGIA

1. Estrategia de trabajo

En este trabajo se estudió la actividad antagonista de la cepa *P. fluorescens* CFBP2392 contra diferentes organismos blanco mediante ensayos de antagonismo in vitro, con el fin de estudiar el espectro de acción del antibiótico y encontrar un microorganismo sensible a la acción del mismo. Una vez seleccionado el microorganismo blanco, se buscó un medio de cultivo químicamente definido que maximice la producción del compuesto. Se estudió también la estabilidad del compuesto al calor y a diferentes condiciones de pH. Luego se procedió a la optimización de un método de purificación del compuesto. Para esto se partió de cultivos de la bacteria y se realizó una extracción orgánica seguida de purificación mediante cromatografía. Se evaluaron diferentes técnicas cromatográficas como capa fina, alta resolución, adsorción. En cada paso de la purificación se verificó la presencia del metabolito activo mediante bioensayos observando su acción frente al microorganismo blanco elegido. Por último se estudió la naturaleza estructural de la fracción obtenida mediante espectrometría de masas, espectroscopía UV y ensayo de ninhidrina. El diagrama de trabajo se muestra en la figura 4.

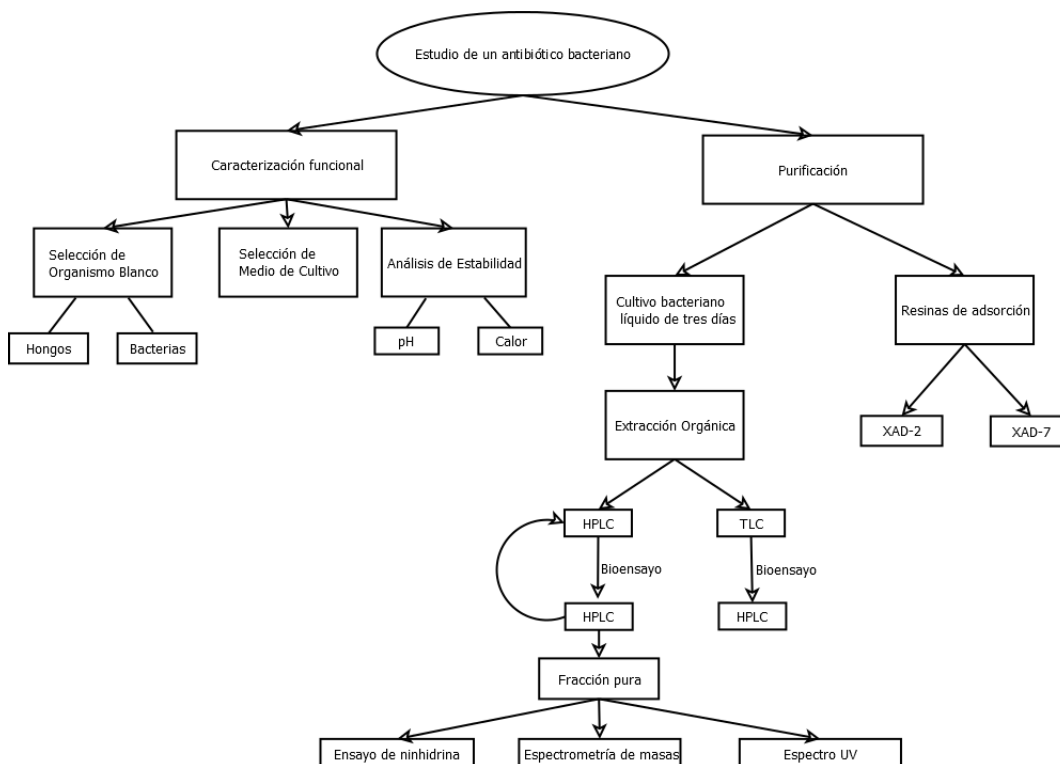


Figura 4: Diagrama de flujo del trabajo

METODOLOGÍA

Microorganismos y condiciones de cultivo

Los microorganismos utilizados en este trabajo se describen en la tabla 1. Las bacterias utilizadas fueron conservadas en glicerol 25 % a -20 °C y -80 °C y fueron repicadas a placa antes de ser utilizadas. Los aislamientos fúngicos utilizados fueron a lmacenados en Agar Papa Dextrosa (PDB 24 g/L 1,6 % agar) a 4 °C.

Tabla 1: Microorganismos utilizados en este trabajo.

Cepas bacterianas	Características	Referencia o fuente
<i>Clavibacter michiganensis</i> LEM	Aislada de tomate (Uruguay)	Laboratorio de Ecología Microbiana, IIBCE
<i>Clavibacter michiganensis</i> R33/2	Aislamiento patógeno de tomate (Uruguay)	Sección Protección Vegetal, INIA Salto Grande
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z69	Aislada de rizósfera de arroz (Brasil); fijadora de nitrógeno	Baldani <i>et al.</i> , 1986
<i>Ralstonia solanacearum</i> Rs8	Cepa patógena de papa (Uruguay)	Departamento de Biología Molecular, IIBCE
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CFBP2392	Aislada de rizósfera de poroto (Francia)	UMR Microbiologie du Sol et de l'Environnement, INRA-Dijon (Francia)
Aislamientos fúngicos		
<i>Alternaria</i> sp.	Aislamiento fitopatógeno	Departamento de Biología Molecular, IIBCE
<i>Fusarium oxysporum</i>	Aislamiento patógeno de arveja	Root Disease and Biological Control Unit, USDA (Estados Unidos)
<i>Pythium debaryanum</i>	Aislamiento fitopatógeno (Uruguay)	Sección Protección Vegetal, INIA-Las Brujas
<i>Rhizoctonia solani</i> AG3	Aislamiento fitopatógeno (EEUU)	Department of Plant Pathology. University of Minnesota (Estados Unidos)
<i>Rhizoctonia solani</i> 118 AG4	Aislamiento fitopatógeno (Argentina)	Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola, INTA Castelar (Argentina)
<i>Rhizoctonia solani</i> R81 AG4	Aislamiento fitopatógeno (Argentina)	Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola, INTA Castelar (Argentina)
<i>Rhizoctonia solani</i> 109	Aislamiento fitopatógeno (Argentina)	Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola, INTA Castelar (Argentina)

1. Caracterización funcional del metabolito producido por *P. fluorescens* CFBP2392

1.1. Selección del organismo blanco

La selección del microorganismo blanco tuvo como objetivo encontrar un microorganismo sensible a la acción inhibitoria de la cepa para poder evaluar de forma efectiva la presencia o ausencia del compuesto activo mediante bioensayos durante el proceso de purificación. A su vez, estos ensayos de antagonismo *in vitro* permitieron evaluar el espectro de acción de la cepa frente a distintos microorganismos. Con este fin, se testeó la capacidad de la cepa *P. fluorescens* CFBP2392 para inhibir el crecimiento de diferentes hongos fitopatógenos y diferentes especies de bacterias. Particularmente se eligieron bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, y patógenas o no de plantas.

Ensayos de antagonismo *in vitro* contra hongos fitopatógenos

Se testeó la actividad de la cepa *P. fluorescens* CFBP2392 frente a diferentes hongos fitopatógenos: *Pythium debaryanum*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Alternaria sp.* y distintos aislamientos de *Rhizoctonia solani*. Los ensayos de antagonismo se realizaron en cultivos duales en placas de petri, donde se sembró en el centro micelio del hongo fitopatógeno y a 4 cm se sembró la bacteria (Geel F. P & Schippers B. 1983). Estos ensayos se realizaron en medio Pseudomonas agar F modificado (PSFM) y en medio mínimo para Pseudomonas (MMP). La composición de los medio de cultivo se muestra en el anexo. Para cada caso se realizó un control negativo del hongo sembrado solo y las placas se incubaron a 25 °C.

Ensayos de antagonismo *in vitro* contra bacterias

Se probó la inhibición contra *Clavibacter michiganensis* cepa LEM y cepa R33/2, *Ralstonia solanacearum* Rs8 y *Herbaspirillum seropedicae* Z69. Para esto, se sembró con un ansa *P. fluorescens* CFBP2392 en una placa de vidrio con PSFM, se creció durante un día y se sometió a vapores de cloroformo durante una hora para matar todas las células. Luego de eliminar los vapores de cloroformo ventilando las placas, se sembró por encima un medio semisólido (termostatizado a 60 °C) con un cultivo incorporado de la bacteria blanco. Este se preparó creciendo cada cepa en un tubo conteniendo 5 mL de medio caldo nutriente (NB) durante dos días en agitador rotatorio a 200 rpm y 30 °C. Se midió la DO a 600 nm y se sembró el equivalente a $0,5 \times 10^9$ células en medio agar nutriente (NA) soft (0,6 % agar) en cultivo incorporado. Cada ensayo se realizó por duplicado y las placas se incubaron a 25 °C por 24 hs.

1.2. Selección del medio de cultivo

Medios de cultivo

La producción de antibióticos por *P. fluorescens* es altamente dependiente del medio de cultivo (Slininger P. J. & Jackson M. A. 1992, Duffy B.K. & Défago G. 1999). Para aislar el metabolito involucrado en el antagonismo se buscó un medio de cultivo en el que la cepa CFBP2392 presente mayor actividad. Además se buscó que fuera químicamente definido para simplificar el proceso de purificación y minimizar interacciones complicadas con el propio metabolismo de la bacteria (Yung M. D. 1984).

Tomando en cuenta que estudios previos indican que el metabolito se trataría de un péptido, se evaluó un medio mínimo complementado con el agregado de aminoácidos y se comparó con el medio de cultivo PSFM, utilizado anteriormente para su obtención (Bajsa N. 2003).

La selección del medio de cultivo se realizó por ensayos de antagonismo *in vitro* como se describe en 1.1 en cinco condiciones diferentes: MMP (medio mínimo para *Pseudomonas*), MMP con agregado de casamino ácidos, MMP con agregado de casamino ácidos y triptófano, MMP con agregado de cinco aminoácidos (Ile, Glu, Leu, Val, Trp), MMP con mayor agregado de magnesio. Para cada caso, con excepción del MMP, se aumentó la concentración de $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$ de 0,4 a 1,5 g/L para mantener la concentración correspondiente al medio PSFM que se tomó como control de alta inhibición. Por otro lado, todos los medios de cultivo fueron complementados con $FeCl_3$ 50 μM . La composición de todos los medio de cultivo se muestra en el anexo.

Bioensayo por difusión

Para comprobar la producción del compuesto activo en cultivos de la cepa en medio líquido se realizó un bioensayo por difusión (Bauer A. W. & Kirby W. M. 1966). Se realizó una extracción orgánica del sobrenadante de cultivo de *P. fluorescens* CFBP2392 crecida durante tres días en MMP, PSFM y MMP Cas Trp, de acuerdo al procedimiento explicado en el punto

3.1. Se tomó el extracto correspondiente a 5 mL de cultivo y se resuspendió en metanol. Esta suspensión se sembró en un disco de papel Whatman N°1, se dejó evaporar el solvente y se colocó sobre agar-agua 1,6 % o agar papa dextrosa (12 g/L -PDB y 1,6 % agar) en placas de 6 pocillos conteniendo 4 mL de medio de cultivo. En cada pocillo se sembró posteriormente micelio de *R. solani*. Se usó metanol como control negativo.

1.3. Análisis de la estabilidad del compuesto

Se analizó la estabilidad del compuesto a diferentes condiciones de pH y temperatura. Para ello se trabajó con extracto bacteriano obtenido como se describe en el punto 2.1, estudiando la actividad del mismo luego de ser tratado con diferentes condiciones.

Para ambos casos se evaluó la actividad mediante bioensayos por inclusión. Esto se realizó incorporando el extracto tratado en medio PDA (12 g/L, 1,6 % agar) en placas de doce pocillos. En cada pocillo se colocó un volumen de 0,2 mL de medio 2X termostatzado a 60 °C y 0,2 mL de la solución conteniendo el extracto. Se sembró micelio de *R. solani* sobre la superficie y se dejó crecer por cuatro días a 25°C. Se utilizaron los siguientes controles: agua estéril, extracto sin tratar a pH 6 (pH del medio de cultivo), buffer estéril para cada valor de pH.

Estabilidad a diferentes valores de pH

La estabilidad del compuesto a diferentes valores de pH fue testada evaluando en cada caso la capacidad antagonica del extracto total de *P. fluorescens* CFBP2392 a pH 4, 5, 7 y 8. Se resuspendió la cantidad de extracto correspondiente a 5 mL de cultivo en buffer citrato-fosfato para los dos primeros casos o buffer fosfato para los otros dos. Ver composición de los buffers en el anexo .

Estabilidad al calor

La estabilidad al calor fue testada sometiendo el extracto de *P. fluorescens* CFBP2392 a diferentes temperaturas. Por un lado se probó la estabilidad a 55 °C, 75 °C y 100 °C del extracto durante 5 minutos y a su vez se incubó el extracto a 45 °C por un período de 90 minutos. En el último caso se trató de ver el efecto del calor por un período equivalente al tiempo de rotaevaporación que lleva obtener el extracto.

2. Purificación del metabolito bacteriano

Bioensayo por inclusión

Se probó una purificación a pequeña escala a partir de 50 mL de cultivo para optimizar la metodología y luego se prosiguió con la purificación a mayor escala, a partir de 1L de cultivo.

Para todos los casos, se verificó en cada paso de purificación la presencia de metabolito evaluando su actividad mediante bioensayos por inclusión. En cada caso se incorporó la fracción a evaluar en medio PDB 12 g/L 1,6 % agar sembrando micelio de *R. solani* y evaluando su crecimiento luego de cuatro días.

2.1. Extracción Orgánica

La purificación a pequeña escala del metabolito se realizó a partir de un cultivo líquido de la cepa *P. fluorescens* CFBP2392 en MMP Cas Trp. Se inocularon 50 mL de medio con un cultivo fresco de la bacteria y se dejó crecer durante tres días en un agitador rotatorio a 200 rpm y 30°C.

Para la purificación a mayor escala se realizó un escalado, en primer lugar se inocularon 50 mL de medio con un cultivo fresco y se dejó crecer por 24 horas. A partir de este cultivo

se inoculó el correspondiente a $2,0 \times 10^{11}$ células en un cultivo de 1 L y se dejó crecer durante tres días en un agitador rotatorio a 200 rpm y 30 °C.

Posteriormente se centrifugó el cultivo a 5000 rpm durante 10 minutos para descartar las células y se descartó el pellet. El sobrenadante de cultivo se acidificó con TFA 10 % hasta pH 2. Se realizó una extracción orgánica de compuestos del sobrenadante agregando 1,5 volúmenes de acetato de etilo y luego de agitar en un embudo de decantación, se conservó la fase orgánica (superior). Se repitió el procedimiento con la fase acuosa nuevamente utilizando 1,5 volúmenes de acetato de etilo. Se rotaevaporó el solvente de la fase orgánica a 30°C y vació hasta obtener un extracto del cultivo seco. Se evaluó la actividad de la fase orgánica y de la fase acuosa.

2.2. Cromatografía en Capa fina (TLC)

Se realizó cromatografía de capa fina (TLC) preparativa con placas de sílica gel en un soporte de aluminio previamente activadas durante una hora a 100 °C. Se sembró el extracto seco correspondiente a 5mL de cultivo resuspendido en metanol. Como fase móvil se usó acetato de etilo para los primeros ensayos y luego se optimizó cambiando a una fase móvil compuesta por acetato de etilo 50 % y hexano 50 %. Las diferentes bandas fueron recortadas del soporte y eluidas en aproximadamente 1 mL de metanol en agitador durante una hora. Cada fracción se centrifugó para descartar restos de sílica y se eliminó el solvente por rotaevaporación a 30 °C y vacío.

La actividad de las fracciones eluidas fue analizada por bioensayos de inclusión como se explica en el punto 2.

2.3. Cromatografía de alta resolución (HPLC)

HPLC ANALÍTICA - A las fracciones obtenidas por TLC que mostraron actividad en el bioensayo se las sometió a HPLC analítica. Se acidificó la muestra con ácido fórmico 0,1 % hasta un pH = 2,5 y se realizó un gradiente de acetonitrilo, comenzando con un porcentaje de 8 %, subiendo el mismo hasta un 90 % de los 13 a los 33 minutos (aumento lineal de 4 % por minuto) y luego bajando hasta un 8 % a los 34 minutos. Esto se realizó en un equipo HPLC-DAD (detector de arreglo de diodos) marca Waters, MA, USA equipado con una columna analítica C-18 (Luna 5u C18 100 A, 150 * 4.60 mm, Phenomenex) con un flujo de (1.0 mL/min).

HPLC PREPARATIVA - Posteriormente se probó separar los componentes del extracto total de cultivo de *P. fluorescens* CFBP2392 crecida en el medio seleccionado por HPLC. Se intentó primeramente utilizando el mismo gradiente que para la HPLC analítica y posteriormente se optimizó un porcentaje de acetonitrilo para la separación del compuesto. Finalmente se realizaron corridas preparativas isocráticas acidificadas con ácido fórmico 0,1 % hasta pH = 2,68 con un 20 % de acetonitrilo en columna preparativa C-18 (Columna Luna 10u C18 100 A, 250 * 21.20 mm, Phenomenex) con un flujo de (1.0 mL/min).

2.4. Purificación con AMBERLITE

Se realizaron dos ensayos de purificación del sobrenadante de un cultivo de *P. fluorescens* CFBP2392 con la resina de adsorción Amberlite para dos cantidades de sobrenadante diferentes. Los ensayos se realizaron con Amberlite XAD2 y XAD7. La extracción se realizó en "batch" utilizando el sobrenadante de cultivo líquido de MMP + Cas + Trp de 50 mL inoculado con un cultivo fresco y crecido en agitador rotatorio a 200 rpm y 35 °C durante tres días. Se centrifugó el mismo a 5000 rpm durante 10 minutos. Se descartó el pellet y se guardó el sobrenadante, el cual se acidificó con TFA 10 % hasta un pH 2. Para equilibrar la resina se tomaron 10 mL de cada amberlite y se les agregó 2 volúmenes de agua destilada agitando durante 5 minutos con agitador magnético y se descartó el agua. Se probó el método para dos cantidades de sobrenadante, 15 mL y 30 mL, esto se agregó a la resina y se dejó nuevamente

agitar durante 5 minutos. Se eluyó posteriormente en dos etapas agregando 2 volúmenes de metanol y agitando durante 10 minutos. Cada fracción fue guardada y en cada una se evaluó su actividad contra *R. solani* mediante bioensayos *in vitro* por inclusión como se explican en el punto 2.

2.5. Estudio de la naturaleza estructural de la fracción purificada

Ensayo de Ninhidrina

El ensayo con ninhidrina se realizó con el objetivo de evaluar la naturaleza peptídica del compuesto. Para ello se mezcló la fracción purificada con una solución de ninhidrina 1:10:100 (ninhidrina: etanol: agua) y se calentó durante 10 minutos a 100 °C. Se utilizó como control positivo una solución de 1 g/L de triptófano y como control negativo agua destilada.

Se probó también el ensayo de ninhidrina luego de un tratamiento de hidrólisis de la muestra. Se tomó la fracción purificada y se sometió a HCl 6N a 110 °C durante media hora y luego se realizó el ensayo de ninhidrina.

Espectrometría de masas

Estos estudios se realizaron en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas del IIBCE-Instituto Pasteur de Montevideo, la cual cuenta con equipos de espectrometría de masas para el análisis y determinación de péptidos.

MALDI- TOF -TOF Equipo 4800 MALDI-TOF-TOF (Abi sciex) modo lineal y reflector usando dos matrices:

- CHCA (-Cyano-4-hydroxycinnamic acid) disuelta en 60% Acetonitrilo 0.1%, ácido trifluoroacético (TFA).
- DHB (2,5 - dihydroxybenzoic acid) disuelta de la misma manera

En todos los casos se adquirieron espectros de matriz para comparar

LC-MS Equipo LTQ –velos (Thermo-Fisher), y se hicieron diluciones 1/10000, 1/1000 y 1/100 en 30% acetonitrilo 0.1% ácido fórmico. Se realizó una inyección directa y se detectó en los rangos de m/z de 50 a 300 y de 200 a 2000 Da.

RESULTADOS

1. Caracterización funcional

1.1. Selección del organismo blanco

Con el fin de optimizar el seguimiento de la presencia de metabolito se eligió un organismo blanco que mostrara mayor inhibición frente a la cepa *P. fluorescens* CFBP2392. A su vez se estudió el espectro de acción del compuesto frente a diferentes hongos fitopatógenos y bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas.

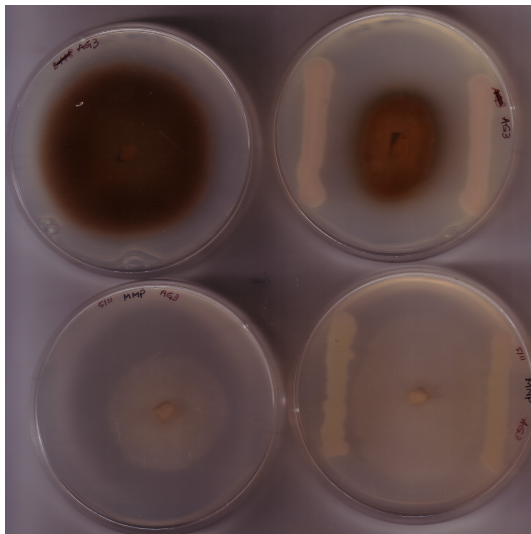
Actividad antifúngica

Se testeó la actividad inhibitoria de *P. fluorescens* CFBP2392 contra *R. solani*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium debaryanum*, *Alternaria* sp. evaluando en cada caso el crecimiento del micelio frente a un control. Para cada ensayo se comparó la actividad en MMP y en PSMF como se muestra en la figura 5. La mayor actividad inhibitoria se observó contra *R. solani* por lo que se probó la capacidad inhibitoria de la bacteria contra diferentes aislamientos de esta especie. La figura 6 muestra la actividad inhibitoria de *P. fluorescens* CFBP2392 contra *R. solani* AG3, R118 AG4, R81 AG4 y R109. La mayor actividad se vio contra *R. solani* AG3.

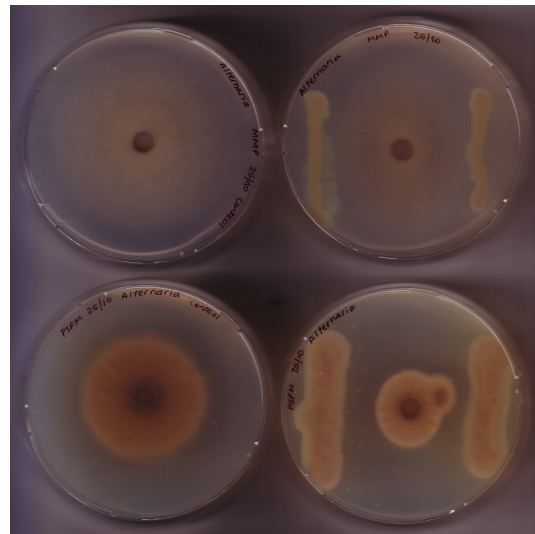
Actividad antibacteriana

Para evaluar la capacidad inhibitoria de la cepa *P. fluorescens* CFBP2392 se realizaron ensayos de antagonismo *in vitro* contra *Clavibacter michiganensis* cepa LEM y cepa R33/2, *Ralstonia solanacearum* Rs8 y *Herbaspirillum seropedicae* Z69. Se tomó como inhibición la aparición de un halo transparente en la zona donde fue sembrada la cepa CFBP2392 (figura 7).

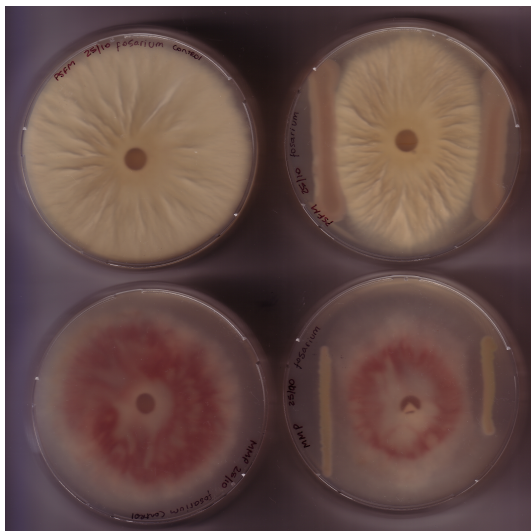
No se detectó actividad antagonica contra *Ralstonia solanacearum* ni contra *Herbaspirillum seropedicae*. Se observó halo de inhibición contra las dos cepas de *C. michiganensis*, ver tabla 3.



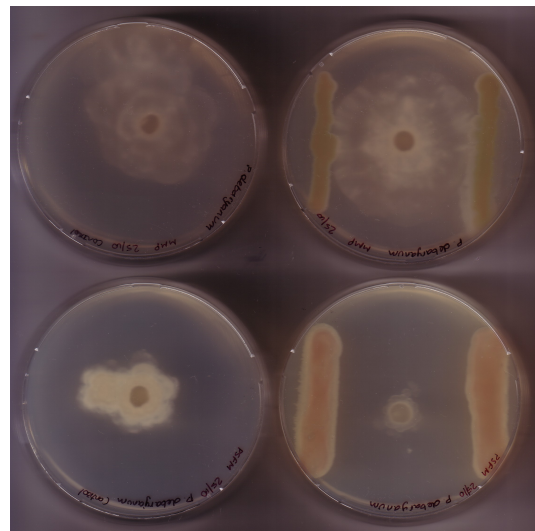
(a) *R. solani* AG3. PSFM (arriba) y MMP (abajo)



(b) *Alternaria* sp. MMP (arriba) y PSFM (abajo).

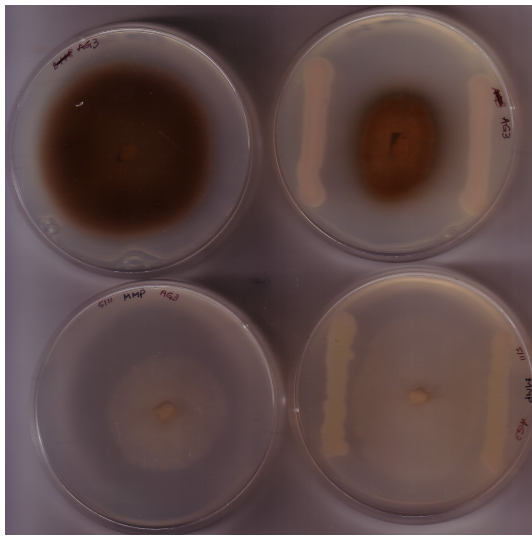


(c) *Fusarium oxysporum*. PSFM (arriba) y MMP (abajo)

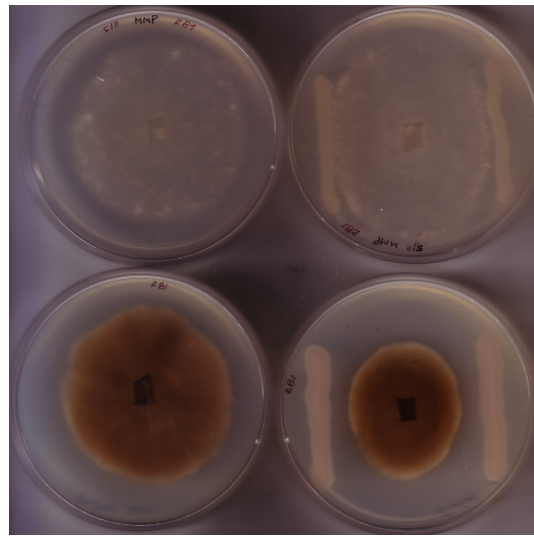


(d) *Pythium debaryanum*. PSFM (arriba) y MMP (abajo)

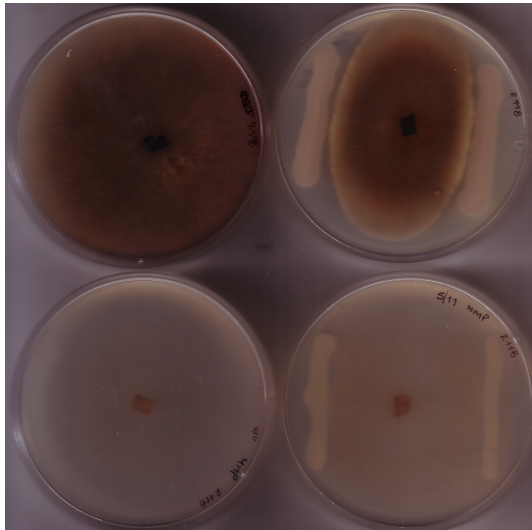
Figura 5: Ensayos de antagonismo *in vitro* de *P. fluorescens* CFBP2392 contra diferentes hongos fitopatógenos. En cada caso se puede ver el control negativo a la izquierda.



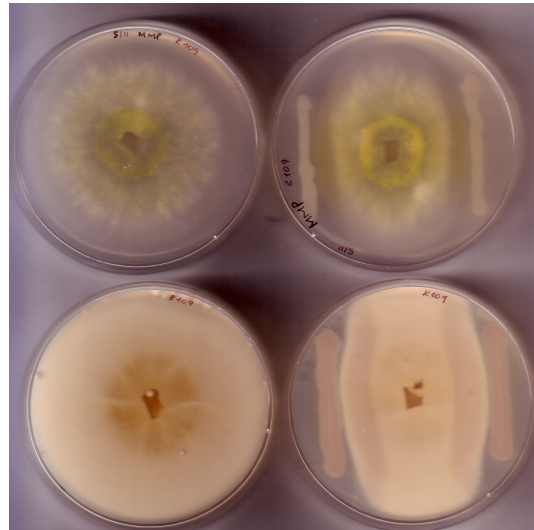
(a) Aislamiento AG3. PSFM (arriba) y MMP (abajo).



(b) Aislamiento R81. MMP (arriba) y PSFM (abajo).



(c) R118. MMP (arriba) y PSFM (abajo).



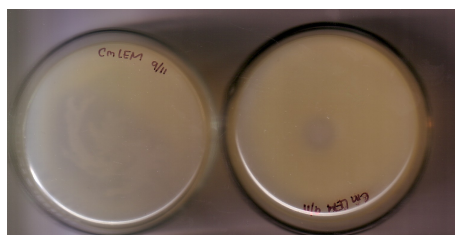
(d) R109. MMP (arriba) y PSFM (abajo).

Figura 6: Ensayos de antagonismo *in vitro* de *P. fluorescens* CFBP2392 contra diferentes aislamientos de *R. solani*.

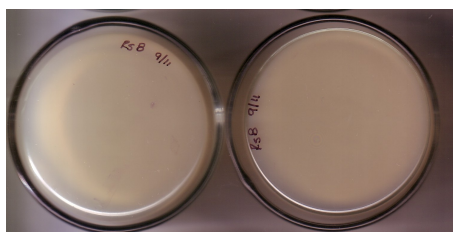
Tabla 2: Actividad antagonica de *P. fluorescens* CFBP2392 contra diferentes géneros bacterianos.

Bacteria	Inhibición
<i>Clavibacter Michiganesis</i> LEM	+
<i>Ralstonia solanacearum</i> Rs8	-
<i>Herbaspirillum seropidacae</i> Z69	-
<i>Clavibacter michiganesis</i> R33/2	+

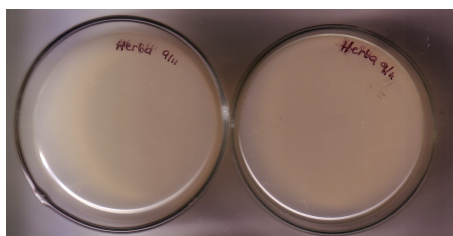
+ indica inhibición y - ausencia de inhibición



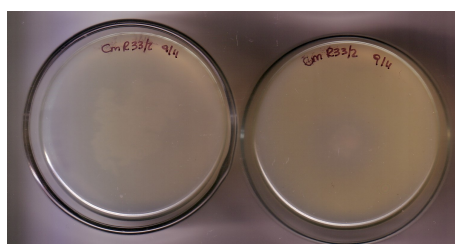
(a) *Clavibacter michiganensis* LEM.



(b) *Ralstonia solanacearum* Rs8.



(c) *Herbaspirillum seropedicae* Z69.



(d) *Clavibacter michiganensis* R33/2.

Figura 7: Ensayos de antagonismo *in vitro* de *P. fluorescens* CFBP2392 contra diferentes bacterias.

1.2. Selección del medio de cultivo

Antagonismo en medio sólido

Se realizaron ensayos de antagonismo *in vitro* de *Pseudomonas fluorescens* CFBP2392 contra *Rhizoctonia solani* en diferentes medios de cultivo. Se testeó la capacidad inhibitoria de la cepa evaluando el crecimiento del micelio en cada caso, los resultados se muestran en la tabla 2.

El medio mínimo para *Pseudomonas* (MMP) mostró tener la menor actividad inhibitoria, mientras que la mayor actividad se vio en el MMP con agregado de hierro, Mg^{2+} y cinco aminoácidos (valina, leucina, isoleucina, glutamina y triptófano) seguido del MMP con agregado de hierro, Mg^{2+} , digerido de cas aminoácidos y triptófano. Ambos casos muestran una actividad inhibitoria menor a la observada en el medio PSFM (figura 8).

Tabla 3: Inhibición de *R. solani* por *P. fluorescens* CFBP2392 en antagonismo *in vitro* diferentes medios de cultivo.

Medio de Cultivo	Inhibición
MMP	+
MMP + Mg*	++
MMP + Cas + Mg*	++
MMP + Cas + Trp + Mg*	+++
MMP + 5aa + Mg*	+++
PSFM	+++

+++ mayor inhibición, ++inhibición media, + menor inhibición

Producción del compuesto en medio líquido

Se testeó la capacidad inhibitoria del extracto de *P. fluorescens* CFBP2392 proveniente de cultivos líquidos de MMP, PSFM o MMP con magnesio, casamino ácidos y triptófano en bioensayos por difusión para comparar la producción de compuesto activo en cada medio. Se vio que para la misma concentración de extracto, hubo mayor inhibición del crecimiento del micelio de *R. solani* utilizando el extracto orgánico proveniente de medio líquido MMP + Mg + Cas + Trp (figura 9).

Tomando en cuenta estos resultados se seleccionó el MMP con agregado de casamino ácidos y triptófano para continuar con el trabajo en las etapas de purificación y caracterización funcional del compuesto.

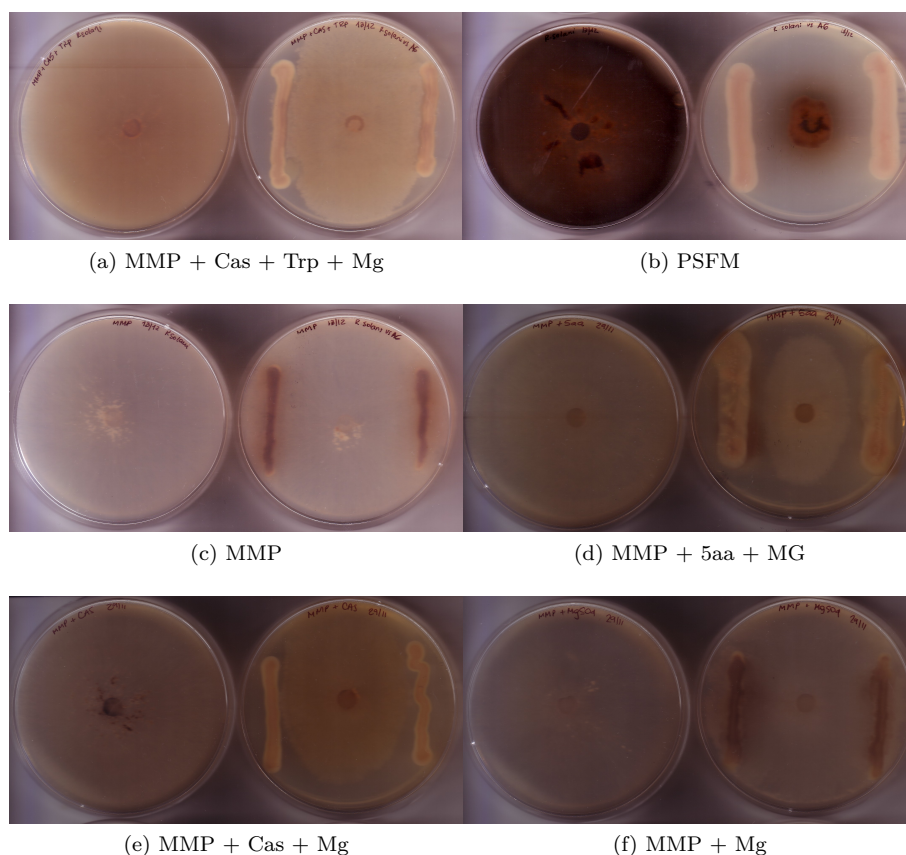


Figura 8: Ensayos de antagonismo *in vitro* de *P. fluorescens* CFBP2392 contra *R. solani* en diferentes medios de cultivo. En cada caso se observa la izquierda el control negativo.

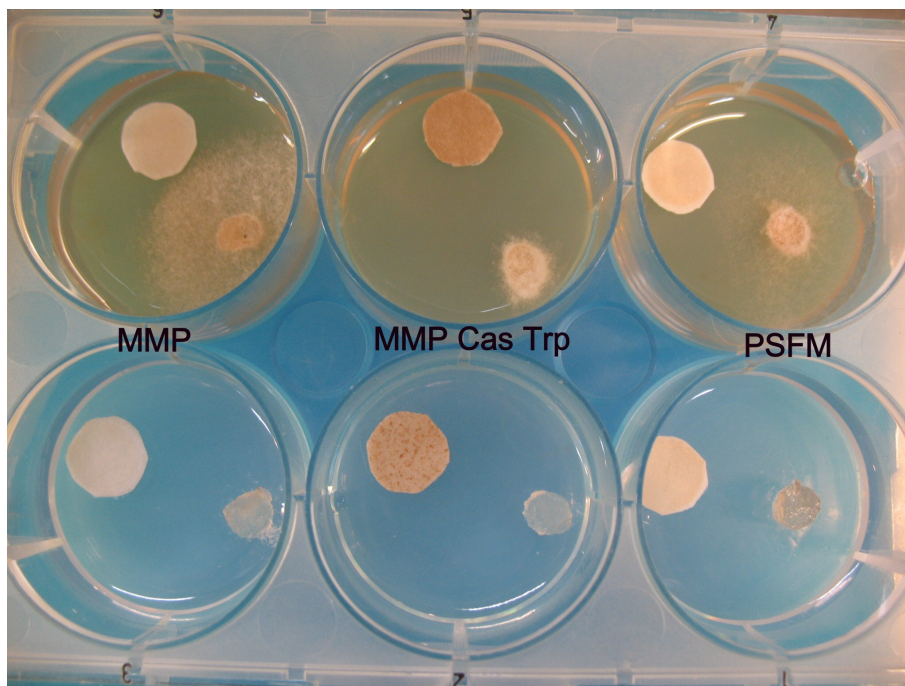


Figura 9: Bioensayo por difusión del extracto de *P. fluorescens* CFBP2392 crecida en PSFM, MMP o MMP + Cas + Mg + Trp contra *R. solani* en PDA (arriba) o Agar Agua (abajo).

1.3. Análisis de la Estabilidad

El análisis de la estabilidad del compuesto al calor y pH fue testeado mediante bioensayos de inclusión. Ninguna de las condiciones probadas mostró pérdida total de la actividad antifúngica contra *R. solani*.

Para los ensayos de estabilidad al calor se observó que tanto el extracto tratado durante 5 minutos a 100 °C como a 75 °C mostró crecimiento del micelio, aunque en menor cantidad que el control negativo (figura 11). El ensayo a 45 °C mostró que el compuesto mantiene su actividad antifúngica luego de 90 minutos a esa temperatura. En los tratamientos a 75 °C y 100 °C se observó un precipitado de color marrón que no se observó en los otros.

Con respecto a la estabilidad a diferentes valores de pH se observó que se mantuvo la actividad a valores ácidos de pH (4, 5 y 6). A pH neutro se vio disminuido el crecimiento del hongo en el control negativo y no hubo crecimiento a este pH con el extracto bacteriano, ver la figura 10. A pH 8, no hubo crecimiento del hongo en el control negativo, por lo que no podemos afirmar nada de la estabilidad del compuesto a valores de pH alcalinos.

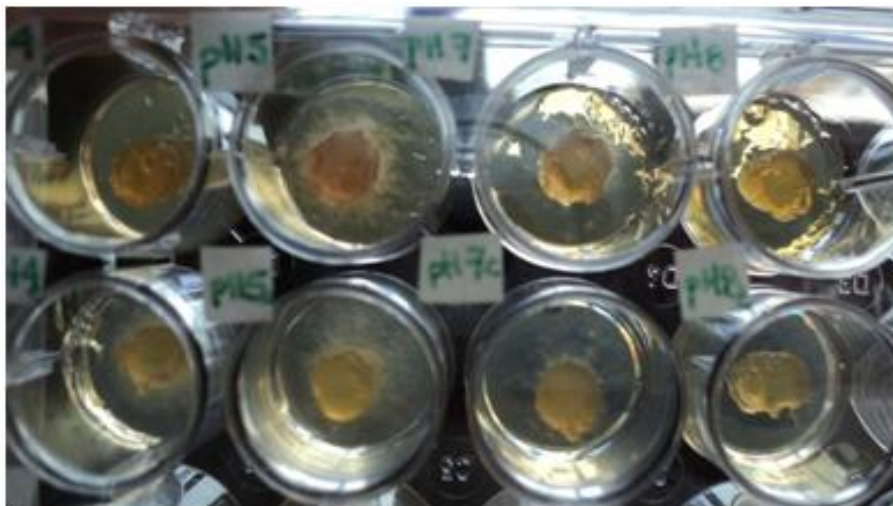


Figura 10: Bioensayos de inclusión del extracto bacteriano tratado a diferentes valores de pH. Abajo se muestran los controles negativos.

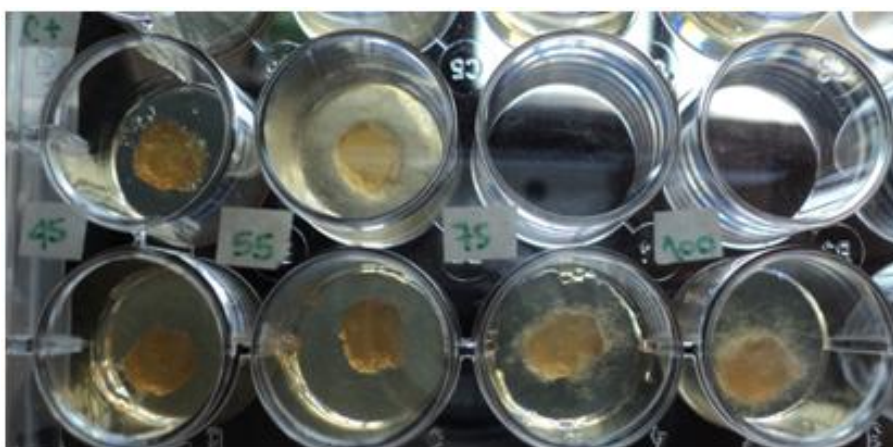


Figura 11: Bioensayos correspondientes al ensayo de estabilidad al calor. Arriba a la izquierda se ve el control positivo de inhibición y al lado el control negativo.

2. Purificación del compuesto

Se ensayaron tres protocolos diferentes para la purificación de este metabolito. En los tres casos se comenzó la purificación a partir del sobrenadante de un cultivo líquido de *P. fluorescens* CFBP2392. Para los dos primeros casos se continuó con la extracción orgánica y posteriormente se utilizaron cromatografías de TLC y HPLC. Para el tercer caso se evaluó una resina de adsorción. El diagrama de trabajo se muestra en la figura 12.

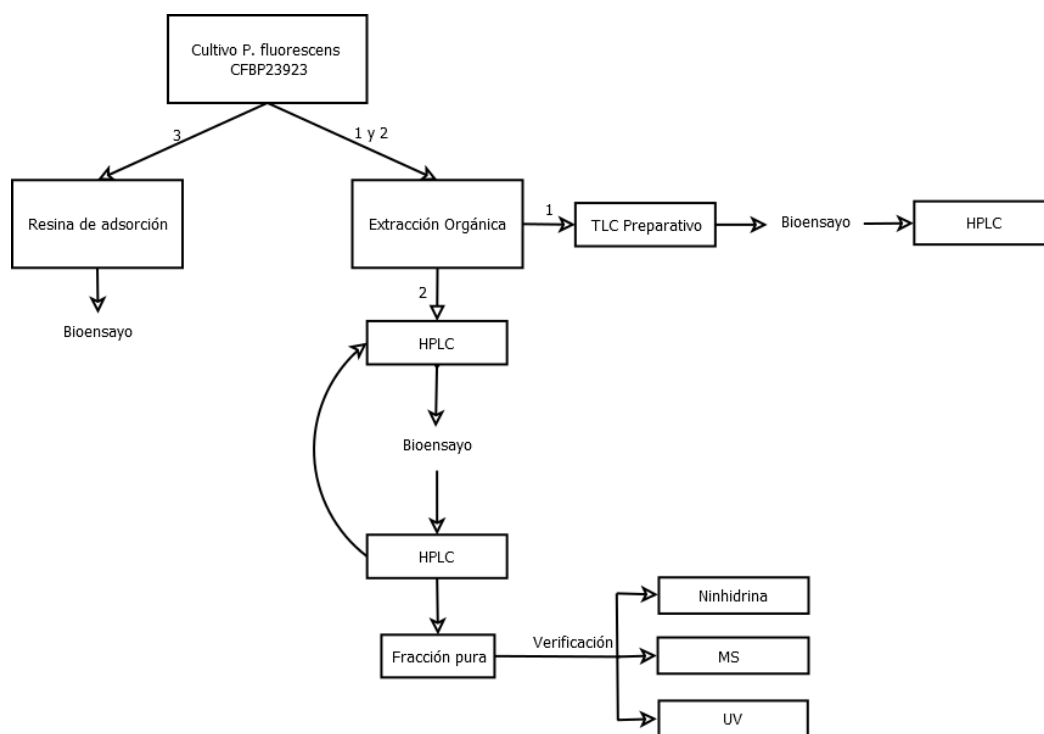
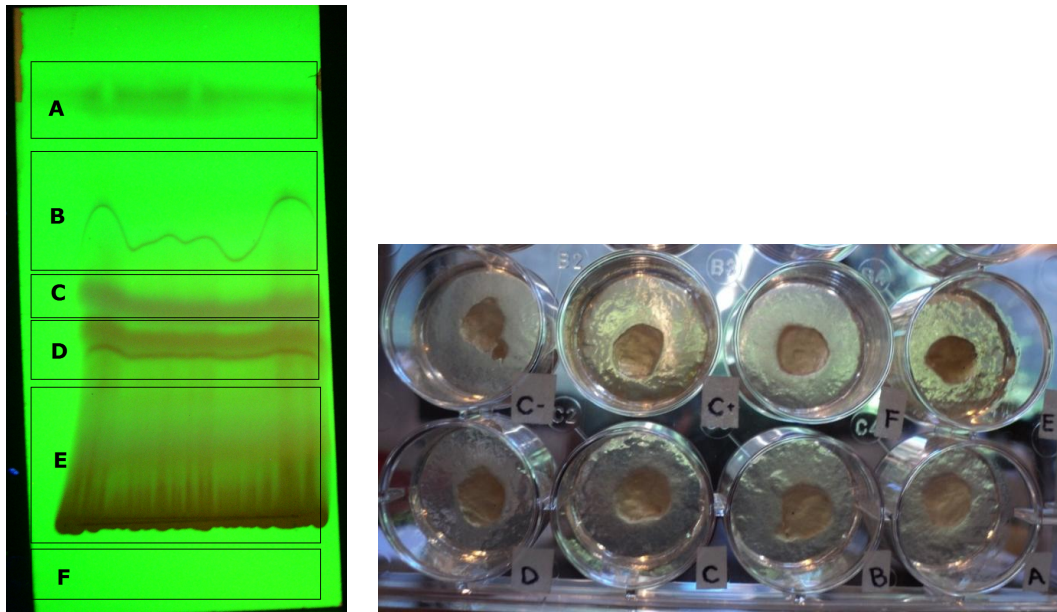


Figura 12: Diagrama de los protocolos de purificación .

2.1. Primer protocolo de purificación: TLC/HPLC

En el primer protocolo de purificación de este trabajo se realizó una extracción orgánica y una TLC preparativa a partir de extracto correspondiente a 5 mL de cultivo líquido. En la figura 13a se muestra una TLC revelada con UV a 254 nm de donde se recortaron las fracciones marcadas con un recuadro negro. Posteriormente se eluyeron estas fracciones y se probó su actividad mediante bioensayos de inclusión para verificar la presencia de metabolito con actividad. Este bioensayo se muestra en la figura 13b en el que se encontraron dos fracciones que mostraron actividad antifúngica. Las fracciones E y A muestran menor crecimiento del micelio de *R. solani* por lo que fueron elegidas para realizar la HPLC analítica.

En la figura 14 se pueden ver dos cromatogramas de las fracciones con actividad y los espectros de dos picos seleccionados. No se continuó con este protocolo ya que no se logró asociar ningún pico del HPLC con el compuesto identificado previamente como activo, en base a sus propiedades cromatográficas y espectro de absorción UV.



(a) TLC preparativa del extracto de sobrenadante de cultivo. Se muestran las fracciones eluidas. (b) Bioensayo de las fracciones eluidas de la TLC:C +, control positivo y C -, control negativo. A, B, C, D, y F muestran las fracciones eluidas de la TLC de la figura 13a.

Figura 13: Purificación mediante cromatografía en capa fina.

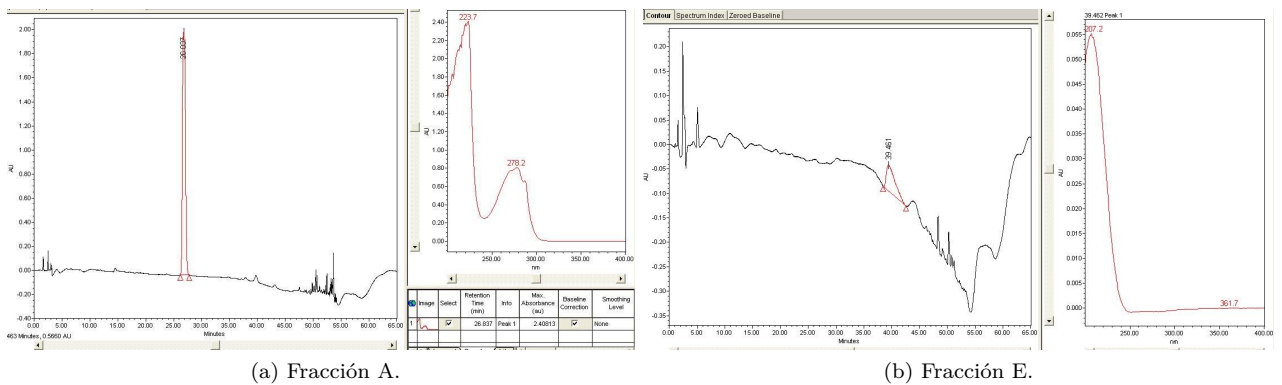


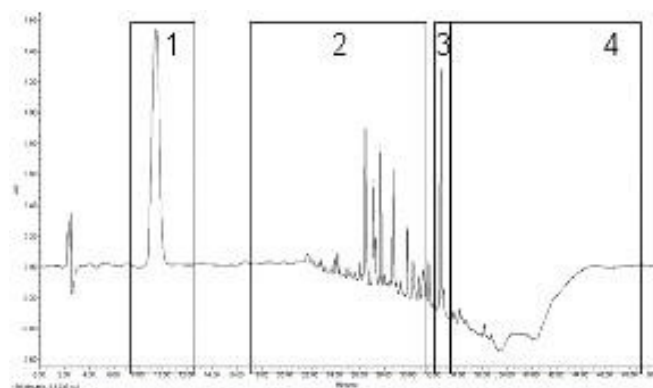
Figura 14: Cromatogramas correspondientes a las corridas de HPLC analítica de las fracciones de la TLC. En cada caso se ve el espectro del pico seleccionado en rojo.

2.2. Segundo protocolo de purificación: HPLC

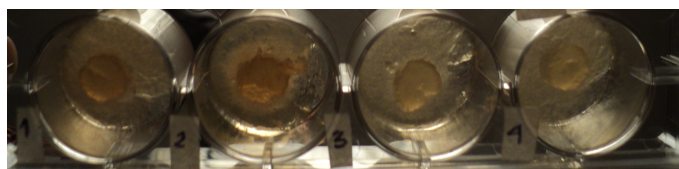
Este proceso consistió en purificar al compuesto con actividad mediante la técnica de cromatografía de alta resolución (HPLC) utilizando como partida el extracto bacteriano obtenido por extracción orgánica. Se purificó la fracción con actividad realizando sucesivas cromatografías de alta resolución (HPLC), mejorando las condiciones en cada paso para optimizar el proceso de separación.

En una primera instancia se realizó una corrida de HPLC preparativa del extracto correspondiente a 50 mL de cultivo bacteriano, luego se prosiguió a una purificación a mayor escala con el extracto correspondiente a 1000 mL de cultivo. La figura 15a muestra el cromatograma obtenido en el primer paso de purificación a pequeña escala. En esta corrida se definieron cuatro zonas para evaluar la actividad mediante bioensayo por inclusión. La fracción correspondiente a la zona 2 del cromatograma fue la que mostró actividad antifúngica (figura 11b).

Posteriormente se mejoró la resolución de la corrida de HPLC para esta zona enlenteciendo el gradiente en el porcentaje de acetonitrilo que eluye la muestra según las condiciones de la fracción 2. En esta corrida se tomaron fracciones cada tres minutos tratando de respetar la salida de los picos a medida que eluían de la columna. Se continuó con la identificación del compuesto activo mediante bioensayos *in vitro* contra *R. solani* en placas de 6 pocillos.



(a) Cromatograma correspondiente al HPLC del extracto total del sobrenadante de cultivo. Se muestran numeradas las cuatro zonas seleccionadas para buscar actividad en el bioensayo.



(b) Bioensayo de las cuatro fracciones correspondientes a las cuatro zonas del cromatograma (A)

Figura 15: Purificación mediante cromatografía de alta resolución.

Se realizó nuevamente una corrida de HPLC ajustando las condiciones para mejorar la resolución. Para ello se realizó una corrida isocrática a una concentración de acetonitrilo de un 20 % y se evaluó la actividad de las 16 fracciones. En la figura 17 se muestra el cromatograma obtenido y el bioensayo correspondiente y se marca con una flecha la fracción con mayor actividad, que eluye entre los minutos 36 y 42. A partir de estos resultados se prosiguió con la purificación a mayor escala.

La figura 16 corresponde al cromatograma al separar el extracto proveniente de 1000 mL de cultivo por HPLC. Dos fracciones fueron identificadas con actividad antifúngica, se verificó su pureza nuevamente mediante HPLC. La figura 18 muestra los cromatogramas correspondientes a estas dos fracciones. Se puede observar en esta figura que la fracción B corresponde mayoritariamente a un compuesto y la fracción F corresponde a dos compuestos.

Como resultado, luego de sucesivas corridas de HPLC se obtuvieron dos fracciones con actividad, una con 20 mg de un compuesto puro (fracción B) y la otra con 3 mg de una mezcla de dos compuestos (fracción F). Estas fracciones fueron estudiadas posteriormente como se detalla en el punto 2.5.

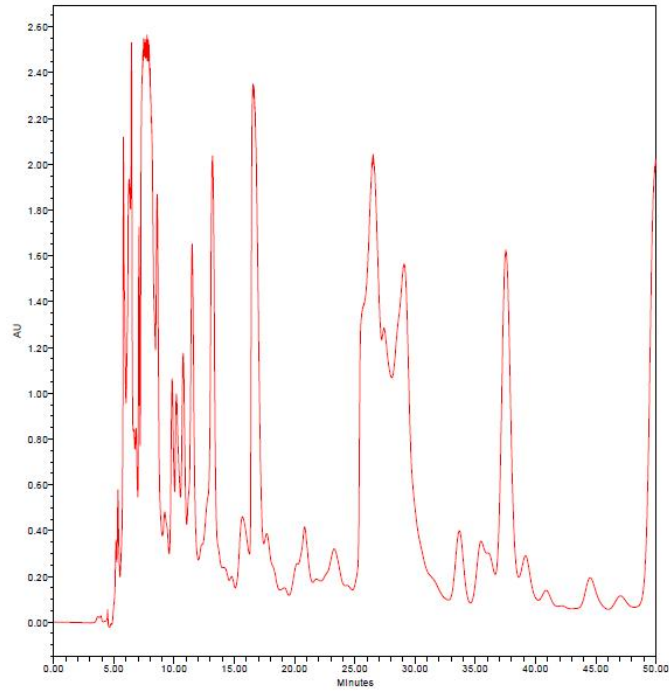
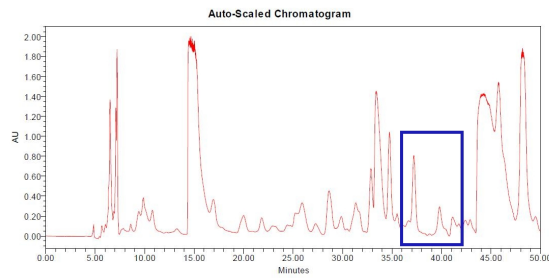
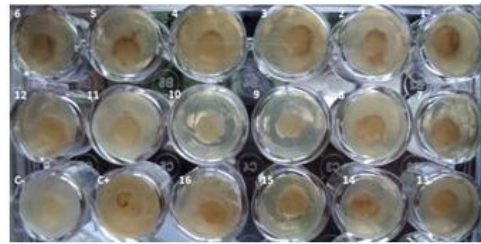


Figura 16: Cromatograma del extracto total a mayor escala de una corrida analítica de HPLC.

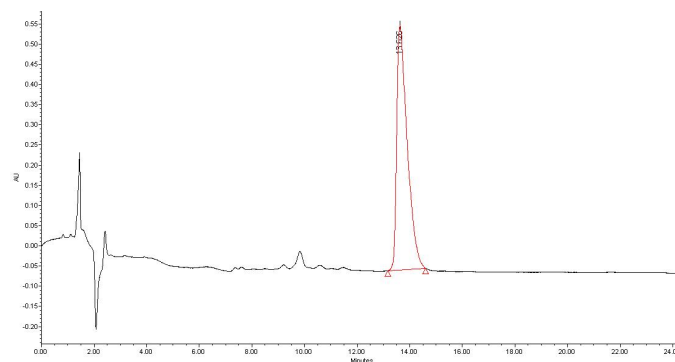


(a) Cromatograma correspondiente a una HPLC. El recuadro indica la fracción con actividad.

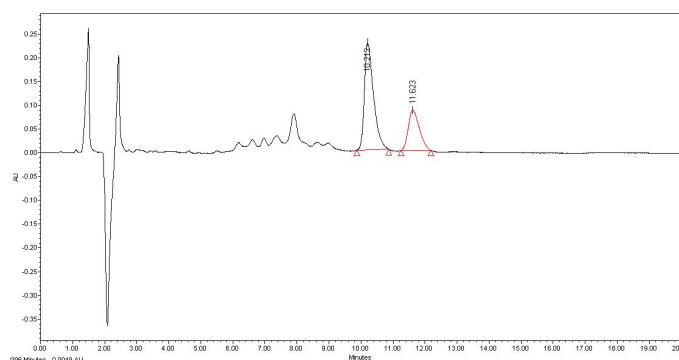


(b) Bioensayo con las fracciones de la HPLC. La fracción 10 corresponde a la zona marcada con el recuadro en el cromatograma.

Figura 17: Purificación a pequeña escala mediante cromatografía de alta resolución.



(a) Fracción B.



(b) Fracción F.

Figura 18: Cromatogramas de las fracciones con actividad purificadas.

2.3. Tercer protocolo de purificación: Purificación con AMBER-LITE

Con el fin de mejorar las condiciones de purificación se realizaron ensayos de separación previa al HPLC utilizando las matrices hidrofóbicas Amberlite XAD2 y XAD7. Se utilizaron dos cantidades de sobrenadante para la misma cantidad de Amberlite. Los bioensayos mostraron inhibición en todas las fracciones para ambas cantidades, tanto para XAD 2 como para XAD 7 con excepción de la fracción correspondiente a la segunda elución con metanol de XAD 7, donde hubo crecimiento fúngico.

2.4. Estudio de la naturaleza estructural de la fracción purificada

Las fracciones con actividad B y F obtenidas como se describe en el segundo protocolo de purificación fueron analizadas comenzar a caracterizar su estructura.

Ensayo de Ninhidrina

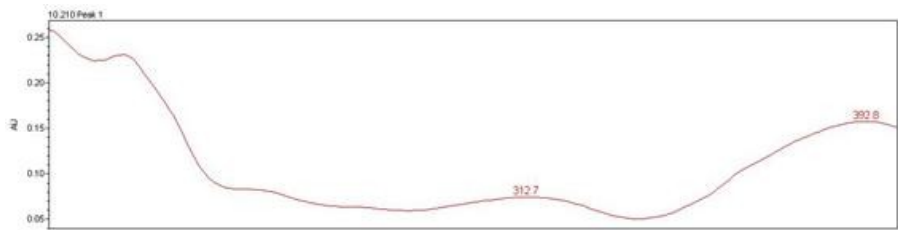
Se utilizó la reacción de ninhidrina para estudiar la naturaleza peptídica del compuesto. Se observó que no había cambio de color de la fracción purificada del compuesto al exponerse a ninhidrina durante 10 minutos en calor. Sin embargo, luego de ser tratado con ácido clorhídrico durante media hora y revelando con ninhidrina sí se observó un cambio en la coloración inicial del compuesto.


Espectrometría de masas

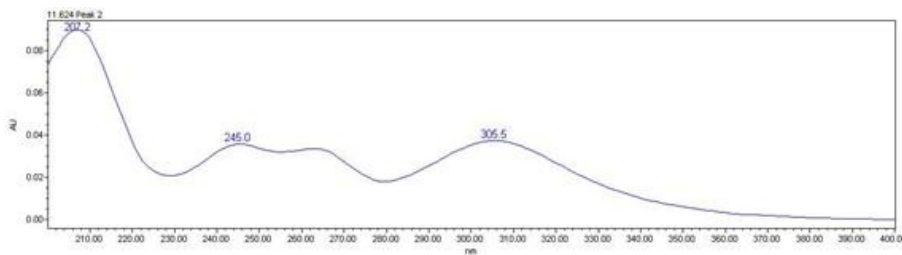
Las fracciones fueron analizadas utilizando el equipo MALDI-TOF-TOF y no se detectaron señales diferentes a las que presentaron las dos matrices probadas. En el LTQ tampoco se logró obtener información sobre la masa de las fracciones purificadas.

Espectroscopía de absorción UV

Se obtuvieron los espectros de absorción de los picos las fracciones purificados por HPLC. El espectro del pico presente en la fracción B presentó un máximo de absorción a 207nm que se corresponde con uno de los picos observados en la fracción F. Ésta contenía además otro compuesto cuyo espectro se muestra en la figura 19.



(a) Pico presente en la fracción  F.




(b) Pico presente en la fracción  B.

Figura 19: Espectros de absorción UV.

DISCUSIÓN

1. Caracterización funcional

1.1. Selección del organismo blanco

Actividad antifúngica

Se testeó la capacidad inhibitoria de *P. fluorescens* CFBP2392 contra *R. solani*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium debaryanum* y *Alternaria* sp. evaluando en cada caso el crecimiento del micelio frente a un control sin inóculo de bacterias. Se observó que había una mayor inhibición del crecimiento de *R. solani* que de las otras especies de hongos fitopatógenos. Esto indicaría que este es el hongo fitopatógeno más sensible frente al antibiótico entre los organismos probados, lo cual es consistente con la literatura donde se ha reportado alta inhibición del crecimiento fúngico para esta especie (Gamalero E. & Martinotti M. G. 2002, Bajsa N. 2003).

Por este motivo, se realizó un segundo ensayo de antagonismo testeando la capacidad inhibitoria de *P. fluorescens* CFBP2392 contra distintos aislamientos de *R. solani*. Se probaron cuatro aislamientos diferentes, pertenecientes a dos grupos de anastomosis (AG3 y AG4). Se observó que la mayor inhibición se presentaba con la cepa AG3 LEM. A partir de estos resultados se utilizó en todo momento *R. solani* AG3 para corroborar la producción del metabolito y la presencia o ausencia de este durante el proceso de purificación.

Existe una gran variedad de péptidos reportados con actividad antifúngica contra *R. solani*. Dentro de estos se encuentran los lipopéptidos y péptidos cíclicos producidos por bacterias y otros péptidos de mayor tamaño (hasta aproximadamente unos 50 aminoácidos) producidos por plantas como primer mecanismo de defensa. Los péptidos cíclicos son metabolitos secundarios que cuentan con L y D aminoácidos, tienen un anillo peptídico y pueden además contener una cola peptídica adicional. Algunos de estos pueden ser lipídicos cuando se encuentran unidos a una cola lipídica. Se ha visto actividad de estos péptidos contra bacterias Gram positivas como *Rhodococcus fascians* y diferentes hongos como *Rhizoctonia solani*, *Leptosphaeria maculans* y *Sclerotinia sclerotiorum* (Montesinos E. 2007).

Otros péptidos reportados en la literatura son los llamados “peptaboils” producidos por hongos, éstos son lineales con un alcohol en el extremo C terminal y un grupo acilo en el extremo N terminal. Son de síntesis no ribosomal y muchas veces pueden estar unidos a ácidos grasos. Dentro de estos compuestos está la “trichokonin” que tiene actividad antifúngica contra *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Bipolaris sorokiniana* y *Colletotrichum* spp. y también antimicrobiana contra bacterias gram positivas como *Clavibacter michiganensis* (Montesinos E. 2007).

La búsqueda de péptidos antifúngicos contra *R. solani* se ha hecho importante últimamente ya que la resistencia a estos compuestos no es tan común y pueden usarse en forma conjunta con otros péptidos ejerciendo actividades sinérgicas. Por este motivo se vuelve importante caracterizar nuevos compuestos y probar su efectividad. *R. solani* secreta enzimas proteolíticas al medio, por lo que es importante buscar péptidos resistentes a la digestión de estas enzimas para tener una mayor eficiencia de la actividad antifúngica (Oard S. *et al*, 2003).

Actividad antibacteriana

El ensayo de antagonismo *in vitro* contra bacterias tenía dos objetivos principales. En primer lugar evaluar la actividad antibacteriana contra diferentes bacterias para comprobar si alguna se podía usar para verificar la producción del metabolito durante la purificación y en segundo lugar estudiar el espectro de acción de éste.

Con respecto al primer objetivo se observó que existía inhibición contra bacterias, pero se eligió como organismo más sensible a *R. solani*.

En segundo lugar, se pudo estudiar el espectro de acción de la cepa. Se testeó la actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas pero sólo se observó actividad contra *Clavibacter michiganensis*, bacteria fitopatígena Gram positiva. También se observó que esta cepa no inhibió a la bacteria promotora del crecimiento vegetal *Herbaspirillum seropericae*, lo cual es importante si se piensa en las condiciones que debe cumplir una bacteria para que su uso sea conveniente como agente de biocontrol. Sin embargo, más estudios deberían hacerse para saber más sobre su interacción con otras bacterias, ya que la actividad frente a cuatro cepas no proporciona datos significativos.

En el trabajo de De La Fuente *et al* (2004) se reportó actividad de la cepa *P. fluorescens* UP61 *in vitro* contra bacterias. En este estudio se analizó la actividad contra 12 bacterias fitopatígenas y se detectó actividad contra *Agrobacterium tumefaciens*, *C. michiganensis* subespecie *michiganensis*, *Corynebacterium indiosum*, *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y *Xanthomonas Campestris* pv. *mavacearum*.

Se han reportado péptidos inhibitorios del crecimiento de *Clavibacter michiganensis*, como snakin-1, un péptido de 63 aminoácidos rico en residuos cisteína producido por tubérculos de papa (Segura A. *et al*, 1999).

En todos los casos se probó la capacidad inhibitoria de la cepa, no del antibiótico puro. Esto implica que la inhibición observada puede deberse también a otros compuestos activos producidos por la cepa. La mayoría de las bacterias dentro del género *Pseudomonas* tienen más de un mecanismo de inhibición (Haas D. & Défago G. 2005). Esta cepa en particular es capaz de producir pioverdina, ácido cianhídrico (HCN) y proteasas (Bajsa N. 2003). Se tomó en cuenta que la síntesis de pioverdina se ve inhibida en medios de cultivo ricos en hierro y que el ácido cianhídrico es muy volátil como para ser el responsable de la inhibición. Para todos los casos en este trabajo se utilizaron medios de cultivo con agregado de hierro.

1.2. Selección del medio de cultivo

Con el objetivo de obtener un medio de cultivo definido que optimizara la producción del metabolito por parte de la cepa *P. fluorescens* CFBP2392 se realizaron ensayos de antagonismo contra *R. solani* en diferentes condiciones. En los antecedentes se había probado la purificación en medio PSFM que se tomó como referencia de alta inhibición (Bajsa N. 2003).

Los estudios de Yung y Kemp (1984) muestran la importancia de estudiar la producción de antibióticos utilizando un medio químicamente definido ya que se evitan interacciones complejas con el metabolismo bacteriano y se simplifica el proceso de purificación. Un ejemplo de este fenómeno de interacciones complejas es que muchas fuentes de carbono favorables para el catabolismo bacteriano actúan inhibiendo la síntesis de antibióticos, como es el caso de la producción de cefabacina por *Lysobacter lactamensis* que se ve inhibida en medios ricos en glucosa (Roh J. W. *et al* 1992).

En este trabajo se buscó un medio definido para mejorar el proceso de purificación. Para ello se agregó **casamino ácidos**, **triptófano**, y dos minerales, **Mg²⁺** y **Fe³⁺**. Para todos los casos se utilizó **glicerol** como fuente de carbono.

El medio mínimo para *Pseudomonas* spp. fue el que mostró menor inhibición del hongo indicando que no es el mejor para la síntesis del metabolito por parte de la bacteria. Sin embargo, aquellos medios con agregados de aminoácidos como el medio mínimo para *Pseudomonas* spp. con **casamino ácidos** y triptófano y el que contenía cinco aminoácidos mostraron mayor inhibición que los otros medios definidos. Esto es consistente con los antecedentes que indican que el metabolito activo se trata de un compuesto de naturaleza peptídica (Bajsa N. 2003). En estas condiciones, se eligió el medio mínimo para *Pseudomonas* spp. con agregado de casamino ácidos y triptófano como medio óptimo para la síntesis del compuesto. Se descartó usar el agregado de cinco aminoácidos (Val, Ile, Leu, Glu y Trp) ya que es menos económica su preparación. La forma de obtención de casamino ácidos a partir de caseína produce una

mezcla de los 20 aminoácidos de síntesis proteica menos triptófano (Difco, 1985). Por este motivo, se decidió agregar triptófano adicionalmente al digerido de aminoácidos.

El bioensayo por difusión se realizó para corroborar que el medio seleccionado era realmente más eficiente para la producción del metabolito. A diferencia de los ensayos de antagonismo *in vitro*, este bioensayo testeaba la actividad de los compuestos del extracto obtenido a partir de un cultivo líquido de la bacteria en el medio seleccionado. Se observó mayor inhibición del crecimiento de *R. solani* en presencia del extracto proveniente del medio seleccionado que en medio mínimo para *Pseudomonas* spp. pero también en comparación con el medio PSFM. A partir de estos resultados se prosiguió utilizando MMP + magnesio + casamino ácidos + triptófano + hierro para la producción de compuesto de interés.

La composición del medio de cultivo puede actuar directamente sobre la represión o estimulación de la síntesis de antibióticos (Vasudeva R. S. *et al* 1958, Hanlon W. G. *et al* 1982, Young M. D. & Kemp L. L. 1984, Keel C. *et al* 1989, Roh J. W. *et al* 1992, Slininger P. J. & Jackson M. A. 1992, Ogata K. *et al* 1997, Duffy B. K. & Defago G. 1999, Chandrashekhara S. 2010). Esto se debe a que los componentes presentes en el medio pueden interactuar con el metabolismo bacteriano (Young M. D. & Kemp L. L. 1984). Ha sido probado que diferencias en las **fuentes de carbono** y los **minerales** presentes en el medio pueden tener un efecto directo en la producción de pirrolnitrina, 2,4 DAPG y ácido fenazin-1-carboxílico por *Pseudomonas fluorescens* (Duffy & Defago, 1999, Slininger P. J. & Jackson M. A. 1992).

El aumento de la concentración de Mg^{2+} al medio mínimo para *Pseudomonas* resultó en un aumento de la inhibición de *R. solani*. Se ha visto que el Mg^{2+} tiene un efecto en la producción de antibióticos en *Bacillus licheniformis* (Hanlon W. G. *et al* 1982), *Bacillus subtilis* (Vasudeva R. S. *et al* 1958), *Streptovorticillum* spp. (Ogata K. *et al* 1997), y en *Pseudomonas* spp. (Slininger P. J. & Jackson M. A. 1992, Duffy & Defago 1999). Los estudios realizados por Vasudeva R.S. *et al* (1958) mostraron que la bacteria *Bacillus subtilis* necesitaba una concentración de 2 ppm de este catión para sobrevivir pero requería de 6-8 ppm para la producción de un antibiótico antifúngico. Los estudios realizados por Hanlon W. G. *et al* (1982) encontraron a este mineral indispensable para la síntesis de bactericina por *Bacillus licheniformis*. Sus estudios sugieren que el Mg^{2+} puede ser necesario ya que es requerido para la síntesis proteica, por lo que en ausencia de éste la bacteria no podría sintetizar las enzimas para la biosíntesis del compuesto. Estos estudios son concordantes con los de Slininger P. J. y Jackson M. A. (1992) con *P. fluorescens* 2-79 que sugieren que el Mg^{2+} es indispensable para la síntesis de antibióticos por ser importante para el crecimiento de la bacteria, pero no actúan directamente en su producción.

Estudios realizados previamente sobre esta cepa muestran que si bien *P. fluorescens* CFBP2392 inhibe a *R. solani* en medios con y sin hierro, la bacteria presenta mayor poder de inhibición en un medio rico en este mineral. Este mineral es necesario para la síntesis de algunos metabolitos secundarios, como por ejemplo ácido cianhídrico por *P. fluorescens* CHA0 (Keel C. *et al* 1989).

1.3. Estabilidad del compuesto

La estabilidad del compuesto se testeó utilizando el extracto total y no la fracción purificada del mismo. Por lo que no al igual que en los ensayos de antagonismo no podemos afirmar que sea el único mecanismo de inhibición involucrado.

La estabilidad a diferentes valores de pH fue testeada utilizando en cada caso un control del crecimiento fúngico para ese valor de pH. Como *R. solani* no creció en pH 8 no se puede afirmar nada de la estabilidad del compuesto en condiciones alcalinas. En medio ácido y neutro se sostuvo total o parcialmente la inhibición del hongo. Se pudo ver que la actividad antifúngica es resistente a un amplio espectro de pH ácido y neutro, se necesitaría otro método para comprobar la estabilidad a pH alcalino.

Para los ensayos de estabilidad al calor se observó pérdida parcial en la actividad inhibitoria cuando el extracto era tratado durante 5 minutos a 100 °C y a 75 °C.

Aparentemente la fracción es resistente al calor (hasta 55 °C por 5 min.) y a condiciones ácidas de pH, pero nada se puede establecer de su estabilidad en condiciones alcalinas mediante el método utilizado.

Los estudios realizados por Harrison L. *et al* (1991) sobre las pseudomicinas (lipodepsipéptidos cíclicos) muestran que estos antibióticos producidos por *P. syringae* son extremadamente sensibles a condiciones alcalinas perdiendo la actividad a valores de pH mayores a 5.4. Por otro lado, fue probada la estabilidad al calor de estos compuestos y se observó una pérdida en la actividad cuando el compuesto era tratado por más de dos minutos a 100 °C.

2. Purificación del compuesto antifúngico

El proceso de purificación del compuesto se realizó utilizando diferentes técnicas como extracción orgánica, TLC, HPLC y resinas de intercambio poliméricas. Por un lado se probó purificar a pequeña escala el extracto orgánico del sobrenadante de cultivo mediante TLC y posteriormente HPLC. Para cantidades mayores de compuesto se utilizó extracción orgánica y HPLC reiteradas veces aumentando la resolución hasta llegar a una fracción pura. Las resinas poliméricas fueron probadas para agregar un paso de purificación previo a la HPLC.

2.1. Primer protocolo de purificación: TLC/HPLC

La cromatografía de capa fina del extracto bacteriano proveniente de una extracción orgánica de un cultivo líquido se realizó en una primera instancia utilizando acetato de etilo como fase móvil. A partir de las bandas obtenidas por este método en la placa de sílica, se eluyeron los compuestos en metanol y se evaluó su actividad. Se observó actividad antifúngica en dos de estas fracciones, la correspondiente a la región de la base de la cromatografía y la que correspondía al frente. Ambas fracciones con actividad fueron analizadas por HPLC, sin embargo ninguna de ellas se pudo asociar al compuesto identificado como activo en trabajos previos. Las cantidades obtenidas no eran suficientes para realizar un bioensayo para probar la actividad de cada pico, por lo que se prosiguió con un método con el que se pudiera conseguir más cantidad de cada fracción para poder probar su actividad.

2.2. Segundo protocolo de purificación: HPLC

Se realizaron corridas de HPLC a partir de extracto orgánico obtenido primero a pequeña escala (50 mL de cultivo) y luego a mayor escala (1 L de cultivo). La cromatografía de alta resolución permitió separar la fracción con actividad de entre muchos compuestos presentes en el extracto total. En sucesivas corridas cromatográficas se siguió al compuesto con actividad mediante bioensayos por inclusión, separando aquellas fracciones que mostraran mayor inhibición del hongo *R. solani in vitro*. Se fue reduciendo el número de compuestos candidatos a ser el metabolito activo y finalmente el pico correspondiente a la mayor actividad fue separado mediante HPLC isocrática en columna preparativa con un porcentaje de acetonitrilo del 20%. Esta fracción fue liofilizada posteriormente y el compuesto obtenido (20 mg) era soluble en agua y de color amarillo. Ese pico fue obtenido también en otra fracción de HPLC que contenía además otro compuesto, del cual se desconoce su actividad.

El proceso de separación de compuestos producidos por una bacteria es complejo. En algunos casos las bacterias producen estructuras análogas, cuyas diferencias fisicoquímicas no son lo suficientemente grandes como para que sea posible su separación por métodos cromatográficos. El grupo de Osawa *et al* (1999) trabajó en la purificación de hexapéptidos cíclicos, pneumocadinas, producidas por *Glarea lozoyensis*. Este grupo finalmente detectó que se trata

de por lo menos cuatro compuestos a los que llamaron pneumocadina A, B, C y D, posteriormente determinó que estos diferían únicamente en la sustitución de un residuo de prolina.

2.3. Tercer protocolo de purificación: resina AMBERLITE

Esta técnica se probó para contar con un paso una purificación previa a la HPLC. Para este objetivo se utilizaron dos tipos de resinas Amberlite. Hay tres parámetros que determinan la capacidad de unión de estas resinas a un material determinado: el momento dipolar, el diámetro del poro y el área de superficie. La resina XAD 2 tiene una naturaleza química hidrofóbica conformada por compuestos poliaromáticos (momento dipolar 0,3), usualmente se usa para separar compuestos de peso molecular hasta 20.000. La resina XAD 7, por otro lado, está conformada por ésteres acrílicos (momento dipolar 1,8) y es usada para separar compuestos de peso molecular hasta 60.000. Se probó la capacidad del sobrenadante de cultivo para unirse a XAD 2 y XAD 7, en dos cantidades diferentes. En el caso de XAD 2 se vio que tanto el primer lavado con agua, como las dos consiguientes eluciones con metanol tenían actividad antifúngica. Esto podría indicar que se superó la capacidad de la resina incluso con la menor cantidad de sobrenadante y por este motivo se observó actividad en todas las fracciones. Lo mismo sucedió para el caso de XAD 7 con una salvedad, cuando se testeó una cantidad de sobrenadante menor, se observó una menor actividad antifúngica para la segunda elución con metanol.

Como esta técnica no pudo ser optimizada no se utilizó en este trabajo como paso previo a la purificación por HPLC, siendo necesario ajustar la relación resina : sobrenadante.

2.4. Estudio de la naturaleza del compuesto purificado

Los resultados obtenidos mediante el ensayo de ninhidrina son coherentes con la hipótesis de que se trate de un péptido cíclico, ya que no se observó actividad del compuesto hasta no ser tratado previamente con ácido. Una dificultad al usar esta técnica es que el compuesto puro tiene una coloración amarilla, lo cual hace difícil la observación de los cambios de color esperados por la ninhidrina.

Los espectros de absorción del compuesto puro muestran un pico máximo a 207 nm el cual podría corresponderse con la presencia de enlaces peptídicos en la molécula.

Los estudios realizados por espectrometría de masa no proporcionaron información sobre este compuesto. Esto puede deberse a que las matrices, las condiciones o los equipos utilizadas no fueron apropiados para el análisis de la muestra.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La cepa *P. fluorescens* CFBP2392 tiene capacidad antagónica *in vitro* contra diferentes especies fúngicas y también contra una bacteria Gram positiva. Sin embargo, no presenta antagonismo contra las bacterias Gram negativas probadas en este trabajo. Para completar el estudio de su espectro de acción se podría estudiar su actividad contra otros microorganismos. Esta actividad antagónica está dada en parte por el hecho de que la bacteria tiene la capacidad de producir un antibiótico que aún no ha sido caracterizado. Sería interesante estudiar el espectro de acción del metabolito puro y analizar además si presenta otro tipo de actividad biológica.

A su vez, se estudió la estabilidad del compuesto a diferentes valores de pH y temperatura. Los resultados muestran que la actividad se mantiene en condiciones ácidas y neutras pero no se pudo estudiar en condiciones alcalinas. Una forma de hacer un análisis a pH básicos podría ser incubar previamente el extracto a pH 8 y evaluar la actividad a un pH que permita el crecimiento del hongo (aunque no serviría si la eventual pérdida de actividad fuera reversible).

Se logró ajustar un medio de cultivo que maximizara la producción de compuesto activo, esto permitió mejorar el proceso de purificación. Luego de evaluar diferentes protocolos, el antibiótico fue purificado a partir de un cultivo líquido bacteriano. El compuesto se caracterizó por espectroscopía y se estudió su naturaleza peptídica. No se lograron obtener datos sobre su masa y estructura por espectrometría de masas por lo que nuevas técnicas y equipos deberán ser utilizados para obtener más información sobre su estructura. Se realizarán análisis de resonancia magnética nuclear para obtener más información sobre su estructura.

Las características antagónicas estudiadas convierten a esta cepa en una candidata a ser utilizada como agente de biocontrol. Es importante el estudio de las mismas para poder utilizarla a nivel industrial para el mejoramiento de cultivos agrícolas.

BIBLIOGRAFÍA

Ackerley D., Lamont I. (2004) *Characterization and genetic manipulation of peptide synthetases in Pseudomonas aeruginosa PAO1 in order to generate novel pyoverdines*. Chemistry and Biology 11: 971-980.

Bajsa N. (2003) *Aislamiento de un antibiótico peptídico de Pseudomonas fluorescens y su efecto sobre la ultraestructura del hongo fitopatógeno Rhizoctonia solani*. Tesis de Maestría en ciencias Biológicas Opción Microbiología PEDECIBA UdelaR.

Bajsa N., Vaz P., De La Fuente L., Davyt D., Arnould C., Lemanceau P., Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V., Arias A. (2003) *New antifungal compounds isolated from biocontrol Pseudomonas fluorescens and their effects on Rhizoctonia solani at cytological level*. En: Plant Growth Promoting Rhizobacteria. Editores: Reddy M. S, Anandaraj M., Eapen S. J, Sarma Y. R, Klopper J. W. Indian Institute of Spices Research, Calicut, India (p. 460-462).

Baldani J. I., Baldani V. L. D., Seldin L., Döbereiner J. (1986) *Characterization of Herbaspirillum seropedicae gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium*. International Journal of Systematic Bacteriology 36: 86-9.

Bauer A. W., Kirby W. M. (1966) *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method*. American Journal of Clinical Pathology 45: 493-496.

Beiderbeck H., Taraz K., Meyer J. M. (1999) *Revised structures of the pyoverdins from Pseudomonas putida CFBP 2461 and from Pseudomonas fluorescens CFBP2392*. BioMetals 12: 331-338.

Becker J., Moore R., Moore B. (2003) *Cloning, sequencing and biochemical characterization of the nostocyclopeptide biosynthetic gene cluster: molecular basis for imine macrocyclation*. Gene 325: 35-42.

Berta G., Sampo S., Gamalero E. (2005) *Suppression of Rhizoctonia root-rot of tomato by Glomus mossae BEG12 and Pseudomonas fluorescens A6RI is associated with their effect on the pathogen growth and on the root morphogenesis*. European Journal of Plant Pathology 111:279-288.

Bettiol W. (2011) *Desarrollo y uso de agentes microbianos para control biológico de enfermedades. III Taller de Agentes Microbianos de Control Biológico*. En XXV Reunión Latinoamericana de Rizobiología I Congreso Nacional de Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal. Piriápolis, (p. 15).

Binz T. M., Maffioli S.I., Sosio M., Donadio S., Muller R. (2010) *Insights into an unusual NRPS biosynthesis: The Identification and characterization of the GE81112 biosynthetic gene cluster*. Journal of Biological Chemistry 285: 32710-32719.

Che Y., Swenson D. C., Gloer J. B., Koster B., Malloch D. (2001) *Pseudodestruxins A and B: new cyclic depsipeptides from the coprophilous fungus Nigrosabulum globosum*. Journal of Natural Products 64: 556-558

Compant S., Duffy B., Nowak J., Clément C. (2005) *Use of plant growth promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of actions and future prospects*. Applied and Environmental Microbiology 71: 4951-4959.

De Bruijn I., Maarte J. D (2007) *Genome-based discovery, structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in Pseudomonas species*. Molecular Microbiology 63 :427-428.

De La Fuente, L., Mavrodi O.V., Bajsa N., Mavrodi D.V. (2008) *Antibiotics produced by fluorescent Pseudomonas*. En: "Prospects and Applications for Plant-Associated Microbes. A Laboratory Manual Part A: Bacteria". Editores: S. Sorvari y A. M. Pirttilä, Karhukopio, Finlandia (p. 249-255).

De La Fuente, L., Thomashow L., Weller D., Bajsa N., Quagliotto L., Chernin L., Arias A. (2004) *Pseudomonas fluorescens UP61 isolated from birdsfoot trefoil rhizosphere produces*

multiple antibiotics and exerts a broad spectrum of biocontrol activity. European Journal of Plant Pathology 110: 671–681.

Difco (1985) *Difco Manual Dehydrated culture media and reagents for microbiology*. 10a Edición. USA, Difco Laboratories.

Duffy B. K., Défago G. (1999) *Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by pseudomonas fluorescens biocontrol strains.* Applied and Environmental Microbiology 65:2429-2438.

Fravel D.R. (2005) *Commercialization and implementation of biocontrol* Federation of European Microbiological Societies. Annual Review of Phytopathology 43:337–59.

Gamalero E., Glick B. R. (2011) *Mechanisms used by plant growth promoting rhizobacteria.* En: Bacteria in agrobiology: Plant nutrient management. Editor: Maheshwari D. K., India (p. 17-46).

Gamalero E., Martinotti M. G. (2002) *Morphogenetic modifications induced by Pseudomonas fluorescens CFBP2392RI and Glomus mosseae BEG12 in the root system of tomato differ according to plant growth conditions.* New Phytologist. 155:293-300

Geels F. P., Schippers B. (1983) *Selection of antagonistic fluorescent Pseudomonas spp. and their root colonization and persistence following treatment of seed potatoes.* Phytopathologische Zeitschrift 108:193-206.

Genevieve L. M., Morrissey J. P., O’Gara P. H & F. (2006) *Molecular-based strategies to exploit Pseudomonas biocontrol strains for environmental biotechnology applications.* FEMS Microbiology Ecology 56:167-177.

Ghedira K., Chemli R., Caron C., Nuzillard J., Zeches M., Men-Oliver L. (1994) *Four cyclopeptide alkaloids from Zizyphus lotus.* Phytochemistry 38: 767-772.

Haas D., Keel C. (1997) *Construction of Pseudomonas strains with improved biocontrol activity.* En *Plant growth promoting rhizobacteria: present status and future prospects.* Editores Ogoshi A., Kobayashi A., Homma Y., Kodama F., Kondo N. y Akino S.. Kakanishi printing Sapporo, Japón. (P. 82-86).

Haas D., Défago G (2005) *Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads.* Nature Reviews Microbiology 3:307-319.

Hanlon W. G., Hodgesn A., Russell A. D. (1982) *The influence of glucose, ammonium and magnesium availability on the production of protease and bacitracin by Bacillus licheniformis.* Journal of General Microbiology 128:845-851.

Hara H., Bangera M., Weller D.S., Thomashow L. (1994) *Effects of transfer and expression of antibiotic biosynthesis genes on biological control activity of fluorescent pseudomonads.* En *Improving plant productivity with rhizobacteria.* Editores Ryder M.H, Stephens P. M, Bowen G. D. CSIRO Division of Soils. Australia, (p247-249)

Harrison L., Teplow D. B., Rinaldi M., Strobel G. (1991) *Pseudomycins, a family of novel peptides from Pseudomonas syringae possessing broad-spectrum antifungal activity.* Journal of General Microbiology 137: 2857-2865.

Hofte M., Altier N. (2010) *Fluorescent pseudomonads as biocontrol agents for sustainable agricultural systems.* Research in Microbiology 161: 464-471.

Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T., Williams S. T. (1994) *Bergey’s Manual of determinative bacteriology*, 9th edition.

Howell C., Stipanovi R. (1978) *Control of Rhizoctonia solani on cotton seedlings with Pseudomonas fluorescens and with an antibiotic produced by the bacterium.* Phytopathology 69:480-482.

Jaki B., Zerbe O., Heilmann J., Sticher O. (2000) *Two novel cyclic peptides with antifungal activity from the cyanobacterium Tolypothrix pycnoidea (EAWAG 195).* Journal of Natural Products 64: 154-158.

Jayaswal R., Fernandez M. (1991) *Transposon Tn5-259 mutagenesis of Pseudomonas cepacia to isolate mutants deficient in antifungal activity.* Canadian Journal of Microbiology

38:309-312.

Jin J., Lee S., Lee J., Baek S., Kim J., Yun S., Park S., Kang S., Lee Y. (2010) *Functional characterization and manipulation of the apicidin biosynthetic pathway in Fusarium semitectum*. Molecular Microbiology 76: 456-466.

Keel C., Voisard C., Berling C. H., Khar G., Défago G. (1989) *Iron sufficiency a prerequisite for suppression of tobacco black root rot by Pseudomonas fluorescens CHA0 under gnotobiotic conditions*. Phytopathology 79: 584-589.

Lin H., Chen C., You B., Chen Liu K. C. S., Lee S. (2000) *Cyclopeptide alkaloids from Paliurus ramossissimus*. Journal of Natural Products 63: 1338-1343.

Loginov O. N., Chetverikov S. P., Gusakov V. N. (2003) *Triglyceridepeptides, a new group of antifungal metabolites of Pseudomonads (Pseudomonas)*. Doklady Biological Sciences 393: 562-564.

Loper, J. E. (1988) *Role of fluorescent siderophores production in biocontrol of Phytium ultimum by a Pseudomonas fluorescens strain*. Phytopathology 78: 166-172

Martin N. I., Hu H., Moake M. M., Churey J. J., Whittal R., Worobo R. W., Vederas J. C. (2003) *Isolation, structural characterization, and properties of Mattacin (polymyxin M), a cyclic peptide antibiotic produced by Paenibacillus kobensis M*. Journal of Biological Chemistry 11: 13124-13132

McSpadden Gardener B. B. (2007) *Diversity and ecology of biocontrol Pseudomonas spp. in agricultural systems*. Symposium. The nature and application of biocontrol microbes III: *Pseudomonas* spp. Phytopathology 97: 221-226

Michelsen C. F., Stougaard P. (2010) *A novel antifungal Pseudomonas fluorescens isolated from potato soils in greenland*. Current Microbiology 62: 2285-1192

Minowa Y., Araki M., Kanehisa M. (2007) *Comprehensive analysis of distinctive polyketide and nonribosomal peptide structural motifs encoded in microbial genomes*. Journal of Molecular Biology 368:1500-1517.

Mitova M., Popov S., De Rosa S. (2004) *Cyclic peptides from a Ruegeria strain of bacteria associated with the sponge Suberites domuncula*. Journal of Natural Products 67: 1178-1181.

Montesinos E. (2007) *Antimicrobial peptides and plant disease control*. FEMS Microbiological Letters 270: 1-11.

Nogle M., Gerwick W. (2002) *Isolation of four new cyclic depsipeptides, antanapeptins A-D, and dolastatin 16 from a Madagascan collection of Lyngbya majuscula*. Journal of Natural Products 65: 21-24

Oard S., Rush M. C., Oard J. H. (2004) *Characterization of antimicrobial peptides against a US strain of the rice pathogen Rhizoctonia solani*. Journal of Applied Microbiology 97:169-180.

Ogata K, Osawa H., Tani Y. (1977) *Production of an antibiotic by Streptomyces sp. A-60*. Journal of Fermentation Technology 55:285-289.

Osawa A. E., Sitrin R., Lee S. S. (1999) *Purification of pseudocandins by preparative silica-gel high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A. 831: 217-225.

Picard C., Bosco M. (2008) *Genotypic and phenotypic diversity in populations of plant-probiotic Pseudomonas spp. colonizing roots*. Naturwissenschaften 95:1-16.

Raaijmakers J. M., Vlami M., de Souza J. (2002) *Antibiotic production by biocontrol agents*. Antonie van Leeuwenhoek 81:537-547.

Ristaino A. M., Thomas W. (1997) *Agriculture, methyl bromide, and the ozone hole: can we fill the gaps?* Plant Disease 81:964-977

Roh J. W., Bang H. J., Nam D. H. (1992) *Nutritional requirements of Lysobacter latctagenus for the production of cephabacins*. Biotechnology letters 14: 455-460.

Rosales A. M., Thomashow L., Cook R. J., Mew T. W. (1995) *Isolation and identification of antifungal metabolites produced by rice-associated antagonistic Pseudomonas spp*. Phytopathology 85:1028-1032.

- Segura A., Moreno M., Madueño F., Antonio A., García-Olmedo F. (1999) *Snakin-1, a peptide from potato that is active against pathogens*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12:16-23.
- Slininger P. J., Jackson M. A. (1992) *Nutritional factors regulating growth and accumulation of phenazine 1-carboxylic acid by Pseudomonas fluorescens 2-79*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37:388-392.
- Strieker M., Tanovic A., Marahiel M. (2010) *Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics*. *Current Opinion in Structural Biology* 20:234-240.
- Thomashow L., Weller D. M., Bonsall R., Pierson L. (1990) *Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent Pseudomonas species in the rhizosphere of wheat*. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 908-912.
- Vasudeva R. S., Subbaiah T. V. , Sastry M. L. N., Rakgaswamy G. AND Iyengar M. R. S. (1958) *Bulbiformin, an antibiotic produced by Bacillus subtilis*. *Annals of Applied Biology* 46: 336-345.
- Walsh U. F., Morrissey J. P., O'Gara F. (2001) *Pseudomonas for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation*. *Current Opinion in Biotechnology* 12:289-295.
- Walton J. D. (2006) *HC-toxin*. *Phytochemistry* 67: 1406-1413
- Weller D. M. (2007) *Pseudomonas biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years*. Symposium. The nature and application of biocontrol microbes III: *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 97:250-256.
- Williams P. G., Yoshida W. Y., Moore R. E., Paul V. J. (2002) *Isolation and structure determination of obyanamide, a novel cytotoxic cyclic depsipeptide from the marine cyanobacterium Lyngbya confervoides*. *Journal of Natural Products* 65: 29-31.
- Yang L., Tan R., Huang W., Yin Y. (2002) *Antifungal cyclopeptides from Halobacillus litoralis YS3106 of marin origin*. *Tetrahedron Letters* 43: 6545-6548.
- Young M. D., Kemp L. L. (1984) *Effects of phosphate, glucose, and ammonium on cell growth and lincomycin production by Streptomyces Irncoensis in chemically defined media*. *Biotechnology and Bioengineering* 27: 327-333.
- Zhao P., Wang H., Li G., Li H., Liu J., Shen Y. (2007) *Secondary metabolites from endorhytic Streptomyces sp. Lz531*. *Chemistry and Biodiversity* 4:899-904.

ANEXO

1. Medios de cultivo

Agar-Agua: Agar 15 g, H_2O c.s.p. 1L.

King's B (King et al., 1954): Proteosa Peptona N° 3 20 g, K_2HPO_4 1.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5 g, Glicerol 10 mL, Agar 18 g, H_2O c.s.p. 1L.

NB (Caldo Nutritivo, CN; Difco®): Extracto de Carne 3g, Peptona 5g, H_2O c.s.p. 1L.

Agar Papa Dextrosa y Caldo Papa Dextrosa (PDA y PDB respectivamente; Difco®): Infusión de papa 200g, Dextrosa 20g, Agar 15g, H_2O c.s.p. 1L. PDB no contiene Agar.

Pseudomonas agar F modificado (PSFM) (modificación de Bacto *Pseudomonas* Agar F de Difco®): Triptona 10g, Proteosa Peptona 10g, K_2HPO_4 1.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5g, Glicerol 15ml, Agar 20g, $FeCl_3$ 50 μ M, H_2O c.s.p. 1L.

Medio Mínimo para *Pseudomonas* + Mg^{2+} + Fe^{3+} (modificado de Medio Mínimo para *Pseudomonas* MMP; Loper, 1988): K_2HPO_4 3 g, NaH_2PO_4 1 g, NH_4Cl 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,5 g, $FeCl_3$ 50 μ M, glicerol 15 g, H_2O c.s.p. 1L.

Medio Mínimo para *Pseudomonas* + Mg^{2+} + Fe^{3+} + Casamino ácidos + Trp (modificado de Medio Mínimo para *Pseudomonas* MMP; Loper, 1988): K_2HPO_4 3 g, NaH_2PO_4 1 g, NH_4Cl 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,5 g, $FeCl_3$ 50 μ M, glicerol 15 g, casamino ácidos 3 g/L, Trp 1 g/L, H_2O c.s.p. 1L.

Medio Mínimo para *Pseudomonas* + Mg^{2+} + Fe^{3+} + cinco aminoácidos (modificado de Medio Mínimo para *Pseudomonas* MMP; Loper, 1988): K_2HPO_4 3 g, NaH_2PO_4 1 g, NH_4Cl 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,5 g, $FeCl_3$ 50 μ M, glicerol 15 g, Glu 3 g/L, Trp 1 g/L, Val 2,34 g/l, Leu 2,6 g/L, Ile 2,6 g/L, H_2O c.s.p. 1L.

Medio Mínimo para *Pseudomonas* + Mg^{2+} + Fe^{3+} + Casamino ácidos (modificado de Medio Mínimo para *Pseudomonas* MMP; Loper, 1988): K_2HPO_4 3 g, NaH_2PO_4 1 g, NH_4Cl 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,5 g, $FeCl_3$ 50 μ M, glicerol 15 g, casamino ácidos 3 g/L, H_2O c.s.p. 1L.

2. Composición de los buffers

Buffer citrato-fosfato:

pH 4: 30,7 mL de ácido cítrico (como $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) 0,1 M, 19, 3 mL de fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4) 0,2 M, H_2O c.s.p. 100 mL

pH 5: 24,3 mL de ácido cítrico (como $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) 0,1 M, 25,7 mL de fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4) 0,2 M, H_2O c.s.p. 100 mL

Buffer fosfato:

pH 7: 39,0 mL de fosfato monosódico (NaH_2PO_4) 0,2 M, 61,0 mL de fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4) 0,2 M, H_2O c.s.p. 200 mL

pH 8: 5,3 mL de fosfato monosódico (NaH_2PO_4) 0,2 M, 94,0 mL de fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4) 0,2 M, H_2O c.s.p. 200 mL

3. Abreviaturas

2,4 DAPG, 2,4-diacetilfluoroglucinol

Cas, Casamino ácidos

CHCA, α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid

DHB, 2,5 dihydroxybenzoic acid

EPA, Environmental Protection Agency (United States)

Glu, Glutamato

HCN, Cianuro de hidrógeno

Hex, Hexano

HPLC, Cromatografía de alta resolución

HSTs, Host Specific Toxins

Ile, Isoleucina

ISR, Induced Systemic Resistance

Leu, Leucina

LC-MS, Liquid Chromatography Mass Spectrometer

LPC, lipopéptidos cíclicos

MALDI-TOF-TOF, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight

NRPS, Non Ribosomal Peptide Synthases

NRPs, Non Ribosomal Peptides

rpm, revoluciones por minuto

PGPR, Plant Growth Promoting Rhizobacteria

PDA, Potato Dextrose Agar

PDB, Potato Dextrose Broth

SAR, Systemic Acquired Resistance

TFA, Ácido Trifluoroacético

TLC, Cromatografía en capa fina

Trp, Triptófano

Val, Valina

Índice de figuras

1.	Interacciones entre agentes de control biológico, patógenos y plantas. Estos organismos interactúan entre si a través de diferentes señales (Haas D. & Défago G. 2005)	5
2.	Algunos compuestos con actividad antibiótica producidos por <i>Pseudomonas</i> fluorescentes relevantes para el biocontrol (Haas D. & Défago G. 2005).	9
3.	Estructura de la pioverdina producida por <i>P. fluorescens</i> CFBP2392 (Beiderbeck H. <i>et al</i> 1999).	11
4.	Diagrama de flujo del trabajo	16
5.	Ensayos de antagonismo <i>in vitro</i> de <i>P. fluorescens</i> CFBP2392 contra diferentes hongos fitopatógenos. En cada caso se puede ver el control negativo a la izquierda. . .	23
6.	Ensayos de antagonismo <i>in vitro</i> de <i>P. fluorescens</i> CFBP2392 contra diferentes aislamientos de <i>R. solani</i>	24
7.	Ensayos de antagonismo <i>in vitro</i> de <i>P. fluorescens</i> CFBP2392 contra diferentes bacterias.	25
8.	Ensayos de antagonismo <i>in vitro</i> de <i>P. fluorescens</i> CFBP2392 contra <i>R. solani</i> en diferentes medios de cultivo. En cada caso se observa la izquierda el control negativo. 26	26
9.	Bioensayo por difusión del extracto de <i>P. fluorescens</i> CFBP2392 crecida en PSFM, MMP o MMP + Cas + Mg + Trp contra <i>R. solani</i> en PDA (arriba) o Agar Agua (abajo).	27
10.	Bioensayos de inclusión del extracto bacteriano tratado a diferentes valores de pH. Abajo se muestran los controles negativos.	28
11.	Bioensayos correspondientes al ensayo de estabilidad al calor. Arriba a la izquierda se ve el control positivo de inhibición y al lado el control negativo.	28
12.	Diagrama de los protocolos de purificación	29
13.	Purificación mediante cromatografía en capa fina.	30
14.	Cromatogramas correspondientes a las corridas de HPLC analítica de las fracciones de la TLC. En cada caso se ve el espectro del pico seleccionado en rojo.	30
15.	Purificación mediante cromatografía de alta resolución.	31
16.	Cromatograma del extracto total a mayor escala de una corrida analítica de HPLC. 32	32
17.	Purificación a pequeña escala mediante cromatografía de alta resolución.	32
18.	Cromatogramas de las fracciones con actividad purificadas.	33
19.	Espectros de absorción UV.	34

Índice de tablas

1.	Microorganismos utilizados en este trabajo.	17
2.	Actividad antagónica de <i>P. fluorescens</i> CFBP2392 contra diferentes géneros bacterianos.	24
3.	Inhibición de <i>R. solani</i> por <i>P. fluorescens</i> CFBP2392 en antagonismo <i>in vitro</i> diferentes medios de cultivo.	26