

Universidad de Los Andes
Facultad de Ciencias
Centro de Ingeniería Genética
Maestría en Biología Celular
Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL)
“Prof. Guillermo López Corcuera”

Caracterización bioquímica, microbiológica, molecular y estudios fenotípicos de *Xanthomonas campestris* M2044, con fines biotecnológicos.

Autora: Lcda. Milibeth del R. Peña R.

Tutora: Dra. Elizabeth Pérez

Mérida, Julio 2017

DEDICATORIA

Primeramente a Dios por permitirme tener el regalo de la vida, en la que he experimentado la alegría de aprender, crecer y conocer una hermosa rama de la vida a través de la ciencia; y con cada lágrima, cada sonrisa y cada día de trabajo haber podido materializar una meta planteada.

A mis padres, que a través de su amor, comprensión y apoyo incondicional me han acompañado en este camino. Los consejos, bendiciones y la vida que me dieron, son los regalos más hermosos que he recibido. Este logro es de ustedes. Los amo infinitamente.

A mis hermanos, por estar en las buenas y en las malas, han sido un pilar importante en el alcance de esta meta, sin ustedes hubiese sido muy difícil lograrla, gracias por el apoyo, los amo.

Milibeth del Rosario Peña Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios Todopoderoso, por sus dones de la perseverancia y paciencia, por acompañarme en este camino, fortalecer el espíritu y levantarme en cada caída.

A mis padres y hermanos, por su apoyo incondicional, gracias por estar siempre conmigo y ser el motor que mueve mi motivación día a día.

A mi tutora y guía incondicional Elizabeth Pérez, por ser una persona muy sabia y brindarme la oportunidad de aprender de sus conocimientos, ha sido una bonita experiencia. Gracias infinitas.

A Maura Rojas, Miguel Sulbarán y María José Peña, por su paciencia, tiempo y conocimiento, siempre estaré agradecida de toda la enseñanza que me han brindado.

Al Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL) “Prof. Guillermo López Corcuera”, Facultad de Farmacia y Bioanálisis- ULA, por recibirme como tesista y permitirme desarrollar el trabajo de grado.

Al Laboratorio de Enzimoparasitología de la Escuela de Biología ULA, Laboratorio de Catálisis-Escuela de Química ULA, Laboratorio de Orgánica de docencia - Escuela de Química ULA, así como al Laboratorio de polímeros- Escuela de Química ULA, por colaborar con sus instalaciones, equipos y conocimiento en el eficiente desarrollo de las técnicas planteadas como objetivos de este trabajo.

A todos y cada uno de mis profesores del postgrado, que de una u otra manera han sembrado más que una enseñanza académica, una conciencia para el crecimiento personal, superación y dedicación por lo que se desea de corazón.

A mis familiares y amigos que han estado apoyándome en cada momento, cada aliento ha sido necesario para lograr esta meta.

A todos Muchas Gracias.

Milibeth del Rosario Peña Rodríguez

RESUMEN

Xanthomonas es un género de Proteobacterias, cuyos miembros representan una de las bacterias fitopatógenas de mayor importancia epidemiológica en zonas tropicales. Miembros de este género son productores de goma xantano, un exopolisacárido de amplios usos a nivel industrial. Debido a estas características, ha incrementado el interés en aislar cepas de *Xanthomonas* de ambientes naturales. En Venezuela, certificar la producción de xantano en cepas autóctonas de *Xanthomonas* permite aportar expectativas de interés comercial. Por ello, el trabajo se enfocó en caracterizar la cepa M2044 proveniente del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos - Universidad Central de Venezuela (aislado de *Brassica oleracea* a partir de cultivos comerciales de Venezuela), bioquímica, microbiológica, molecularmente y realizar estudios fenotípicos en la producción de goma xantano. Se realizaron estudios macro- micromorfológico, pruebas bioquímicas, galerías API20NE y comparación de la secuencia que amplifica para el ADN_r16S. Resultó la identificación de *Xanthomonas campestris* M2044, resistente a los antibióticos: amoxicilina/Ac. Clavulánico, amoxicilina, gentamicina, ceftazidima, cefotaxima, cloranfenicol, ampicilina, cefalotina, kanamicina, ceftriaxona, cefadroxilo, así como a los metales: sulfato de níquel II, cloruro de bario, sulfato de cobre II, acetato de cinc, hidróxido de litio y carbonato de manganeso. Las fuentes de carbono óptimas de crecimiento fueron: fructosa, lactosa, dextrosa. Las exoenzimas encontradas: proteasas, catalasas y β -galactosidasa. El estudio fenotípico de la goma xantano se realizó en un medio de inducción de producción del mismo, encontrándose un producto de 43 mg/100mL de medio, luego se sometió a espectrometría UV/visible, obteniéndose una huella dactilar muy similar a los publicados en otros estudios.

Palabras claves: *Xanthomonas campestris*, xantano, biopolímeros, biotecnología.

ABSTRACT

Xanthomonas is a Proteobacteria genus, whose members represent one of the most important epidemiological bacteria in the tropics. Members of this genus are producers of xanthan gum, an exopolysaccharide of wide industrial uses. Due to these characteristics, it has increased the interest in isolating *Xanthomonas* strains from natural environments. In Venezuela, certifying the production of xanthan in native strains of *Xanthomonas* allows to contribute expectations of commercial interest. Therefore, the work was focused on characterizing the strain M2044 from the Venezuelan Center of Collections of Microorganisms - Central University of Venezuela (isolated from *Brassica oleracea* from Venezuelan commercial crops), biochemical, microbiological, molecular and phenotypic studies in the production of xanthan gum. We performed macro-micromorphological studies, biochemical tests, galleries API20NE and comparison of the sequence that amplifies for the rDNA 16rS. Turned out the identification of *Xanthomonas campestris* M2044, resistant to antibiotics: amoxicillin / Ac. Clavulanic, amoxicillin, gentamicin, ceftazidime, cefotaxime, chloramphenicol, ampicillin, cephalothin, kanamycin, ceftriaxone, cefadroxil, as well as metals: nickel (II) sulphate, barium chloride, copper (II) sulphate, zinc acetate, lithium hydroxide and manganese carbonate. The optimal carbon sources of growth were fructose, lactose, dextrose. The exoenzymes found proteases, catalases and β -galactosidase. The phenotypic study of xanthan gum was carried out in an induction medium of the same, with a product of 43 mg / 100mL of medium, and then subjected to UV / visible spectrometry, obtaining a fingerprint very similar to those published in others studies.

Key words: *Xanthomonas campestris*, xanthan, biopolymers, biotechnology.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT.....	V
ÍNDICE GENERAL.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
INTRODUCCIÓN.....	1
I. Antecedentes y Planteamiento del problema.	
I.1 <i>Xanthomonas campestris</i>	2
I.2 Caracterización del género <i>Xanthomonas campestris</i>	4
I.3 La goma xantano.....	7
I.4 El operón <i>gum</i>	11
I.5 Regulación de la síntesis del xantano.....	17
II.HIPÓTESIS.....	18
III. OBJETIVOS	
III.1. Objetivo general.....	18
III.2. Objetivos específicos.....	18
IV. MÉTODOS	
IV.I Población y muestra.....	19
IV.2 Estudio macro y micromorfológico.....	19
IV.3 Caracterización bioquímica.....	20
IV.4 Identificación microbiológica (Pruebas API).....	21
IV.5 Identificación molecular: comparación de la secuencia del gen <i>ADNr 16s</i>	23
IV.6 Estudio preliminar de resistencia.....	25
IV.6.1 Resistencia de antibióticos.....	25
IV.6.2 Resistencia a metales pesados.....	25
IV.7 Estudio del crecimiento en diferentes fuentes de carbono.....	26

CONTINUACIÓN ÍNDICE GENERAL

IV.8 Estudio de exoproteínas.....	26
IV.8.1 Producción de proteasas.....	26
IV.8.2 Producción de amilasas.....	26
IV.8.3 Producción de β -galactosidasa.....	27
IV.8.4 Producción de catalasa.....	27
IV.9. Inducción de xantano.....	27
IV.9.1 Metodología del espectro infrarrojo.....	28
V. RESULTADOS	
V.1. Ubicación taxonómica preliminar de la cepa en estudio.....	28
V.2 Pruebas bioquímicas preliminares.....	30
V.3. Identificación microbiológica (Pruebas API20NE).....	30
V.4. Identificación por medio de PCR, mediante la comparación del gen <i>ANDr 16S</i> ...	31
V.5. Caracterización fisiológica de <i>Xanthomonas campestris M2044</i>	32
V.6. Inducción de la producción de xantano en <i>Xanthomonas campestris M2044</i>	36
VI. DISCUSIÓN	
VI.1 Identificación de la cepa M2044.....	38
VI.2 Caracterización fisiológica de la cepa M2044.....	42
VI.3 Inducción de la producción de xantano.....	54
CONCLUSIONES.....	57
RECOMENDACIONES.....	59
REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS.....	60
ANEXOS.....	70
Anexo 1: Medios de crecimiento utilizados en el desarrollo de la investigación.....	70
Anexo 2: Medios utilizados en el caracterización bioquímica preliminar.....	71
Anexo 3: Preparación de soluciones para el protocolo de inducción de xantano.....	75
Anexo 4: Presentación de resultados en jornada científica.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la goma xantano.....	8
Figura 2. Ruta propuesta para la síntesis de goma xantano.....	13
Figura 3. Mapa genético del operón <i>gum</i> de <i>Xanthomonas campestris</i> mostrando la organización de los genes.....	14
Figura 4. Amplificación por PCR y purificación por precipitación con sales de un fragmento del gen ADN _r 16S que codifica para ARN _r 16S de la cepa aislada M2044	31
Figura 5. Espectro infrarrojo del polímero obtenido en la inducción del xantano para <i>Xanthomonas campestris</i> 2044.....	37
Figura 6. Imágenes comparativas de los espectro infrarrojos.....	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lectura de resultados para batería de pruebas API.....	22
Tabla 2. Características micro y macromorfológicas de la cepa M2044 en medio MLB duro.....	29
Tabla 3. Resultados de pruebas bioquímicas preliminares.....	30
Tabla 4. Identificación microbiológica de cepa M2044 por medio de la galería API 20NE.....	31
Tabla 5. Análisis comparativo de la secuencia nucleotídica del gen <i>ADNr 16S</i> de <i>Xanthomonas campestris</i> M2044.....	32
Tabla 6. Resultados del estudio de la resistencia a antibióticos de la cepa M2044.....	33
Tabla 7. Evaluación de la resistencia a metales pesados de <i>X. campestris</i> M2044 en medio MLB.....	34
Tabla 8. Crecimiento de <i>X. campestris</i> M2044 en presencia de diferentes fuentes de carbono en medio YDC.....	35
Tabla 9. Producción de exoproteínas por parte de <i>X. campestris</i> M2044.....	38

INTRODUCCIÓN

Xanthomonas es un género de Proteobacterias, muchos de los cuales causan enfermedades en las plantas, y sus miembros representan una de las bacterias de mayor importancia epidemiológica en las zonas tropicales. Por ende, es remarcable por su fitopatogenicidad y su contrastante uniformidad fenotípica. Además, gracias a su importancia económica, el género ha sido sometido a una gran cantidad de estudios taxonómicos y numerosas discusiones acerca de la clasificación y nomenclatura de sus miembros (Schaad *et al.*, 2000).

Adicional a su gran interés como fitopatógenos, *Xanthomonas campestris* es muy utilizada a nivel biotecnológico debido a que se han descrito, en la mayoría de estas bacterias, un conjunto de genes denominado “operón *gum*”, cuya expresión está involucrada en la biosíntesis de un polisacárido extracelular llamado xantano (Vojnov *et al.*, 2001), utilizado a nivel comercial como agente homogeneizador, estabilizador, emulsificador y modificante del espesor de cualquier sustancia, mediante el control de sus propiedades reológicas (Azuaje *et al.*, 1999), bien sea por cambios en el pH, temperatura, entre otros. En Venezuela, según el Instituto Nacional de Estadísticas del Comercio Exterior (INE), para el año 2013 se importaron resinas y principalmente gomas (categoría de importación en la que se encuentra la goma xantano) por un valor total de 1.008.229.189\$, lo que representa un alto costo para cubrir la necesidad del país. Es por ello que es de suma importancia caracterizar cepas autóctonas de *X. campestris*, lo que permitiría un desarrollo biotecnológico a nivel de producción nacional de xantano, para que la inversión del estado se refleje en producción en lugar de importación.

En Venezuela, se encuentran cepas de *X. campestris* autóctonas, recuperadas y ubicadas en el CVCM, que representan un enorme potencial biotecnológico como modelo para estudios genéticos que permitan la sobreproducción del xantano en las mismas. Es por lo antes descrito que el propósito principal de este trabajo es estudiar la cepa M2044, identificada

inicialmente como *Xanthomonas*, a nivel bioquímico, microbiológico y genético, así como, evidenciar fenotípicamente la presencia del operón *gum* que podría estar presente en la cepa.

I. ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

I.1 *Xanthomonas campestris*.

Xanthomonas es un género de bacterias saprófitas facultativas, es decir, que se desarrollan principalmente como organismos parásitos en las plantas hospedadoras, y parcialmente en el suelo como saprófitos, por lo que los cambios ambientales pueden afectar directamente su sobrevivencia y provocar cambios genéticos permanentes. Las especies del género *Xanthomonas* son bastones rectos, con dimensiones de 0,4 a 1,0 μm de ancho y 1,2 a 3,0 μm de largo, que se desplazan por medio de un flagelo polar. Las colonias son mucoides y convexas, son de color amarillo cuando se desarrollan en un medio de agar no selectivo llamado YDC (por sus siglas en inglés *Yeast extract-dextrose*), gracias al pigmento xanthomonadina que contiene bromo, y la mayoría de ellas crecen muy lentamente. Todas las especies son fitopatógenas y se encuentran sólo en asociación con plantas o con órganos de éstas. En cuanto a las pruebas bioquímicas, los miembros del género *Xanthomonas* son Catalasa positivos, Oxidasa negativos, y crecen en un rango de temperatura entre 4 y 37 °C (Jiménez *et al.*, 2004). El género *Xanthomonas* ha sido objeto de numerosos estudios taxonómicos y filogenéticos, y fue descrito por primera vez como la bacteria *vesicatorium*, infectando pimienta y tomate en 1921 (Burger *et.al* 2003).

Las bacterias del género *Xanthomonas* spp. pueden causar cancrrosis, la cual está caracterizada por generar daños principalmente en los tallos, bloqueando la circulación de la savia y así posteriormente generando lesiones en hojas y frutas. Asimismo, son capaces de producir las manchas o tizón bacteriano, cuya infección suele comenzar en forma de pequeñas lesiones de color verde oscuro y con el paso del tiempo adquirir un color marrón o negro sobre la superficie o corteza vegetal. Las variedades patógenas de *X. campestris* producen el tizón común del frijol (pv. *phaseolí*), la mancha foliar angular del algodón (pv. *malvacearum*), el tizón foliar bacteriano del arroz (*X. oryzae*), el tizón bacteriano o raya de los cereales (pv. *translucens*), la raya foliar bacteriana del arroz (pv. *oryzicolá*), la mancha bacteriana de los

frutos de hueso (pv. *pruni*) y del tomate y chile (pv. *vesicatoria*), la mancha foliar de la begonia (pv. *begoniae*), el tizón foliar de la gladiola (pv. *gummisudans*), la mancha foliar y pudrición del tallo del geranio (pv. *pelargonii*) y el tizón del nogal (pv. *juglandis*) (Kimati *et al.*, 1995; Ryan *et al.*, 2011; Zhang *et al.* 2013; Cubero *et al.*, 2015; Guillén 2012).

Además, estas bacterias pueden producir marchitamientos vasculares, donde se distingue la pudrición negra o nervadura negra de las crucíferas (*X. pv. campestris*) y la gomosis de la caña de azúcar (*X. vasculorum*). Por último, pueden causar lo que se conoce como cancos bacterianos, siendo de especial interés el cancro bacteriano de los cítricos (*X. citri pv. citri*) (Ryan *et al.*, 2011).

Es importante mencionar que otra de las características importantes del género *Xanthomonas* radica en el hecho de que la mayoría de sus especies producen grandes cantidades de un exopolisacárido llamado goma xantana o xantano, el cual tiene una amplia gama de usos industriales, incluyendo industrias como la de los alimentos, textil, farmacéutica, agrícola, minera, petrolera, ambiental y cosmética. El xantano es utilizado a nivel comercial como agente modificante del espesor de cualquier sustancia, y sus propiedades reológicas permiten controlar el mismo a la conveniencia del producto a espesar, bien sea por cambios en el pH, temperatura, entre otros. Se ha usado para la fabricación de saborizantes, desodorantes, champú, cremas, lociones, maquillajes, pasta de dientes, antibióticos, espesante, herbicida, pesticida, tintas de impresión, entre otros. El xantano es producido por varios patovares de *X. campestris* y por otras especies de *Xanthomonas* (Borges *et al.*, 2007).

La especie *X. campestris* tiene dos rasgos comunes: pigmentación amarilla y producción de exopolisacáridos (goma xantano), lo que hace que las colonias tengan un aspecto amarillento y mucoide. Esta especie se compone de más de 123 patovares, que pueden diferenciarse en función de las plantas huésped que infectan. Por ejemplo, *X. campestris pv. campestris* es el patógeno que causa la pudrición negra en crucíferas, resultando en grandes pérdidas en la agricultura en todo el mundo (Tseng *et al.*, 1998). Muchos otros patovares de *X. campestris* producen el exopolisacárido de manera eficiente, incluyendo a *phaseoli*, *malvacearum*, *carotae*, *citrumelo*, *juglandis*, así como otros miembros del género

Xanthomonas (*X. fragariae*, *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. vesicatoria*) (Katzen *et al.*, 1998 , Becker *et al.*, 1998).

El mecanismo de la interacción patógeno-planta aún no está claro para esta especie, pero los componentes de superficie tales como lipopolisacáridos (LPS) y exopolisacáridos (EPS) se consideran factores determinantes en la interacción. No se ha logrado establecer un vínculo directo entre los EPS producidos por *X. campestris* y la patogenicidad en la planta. Además, debido a sus propiedades reológicas únicas tales como alta viscosidad y pseudoelasticidad, la goma xantano tiene una aplicación potencial en los procesos de producción industrial (Koplin *et al.*, 1992).

I.2 Caracterización del género *Xanthomonas*

Desde hace muchos años se ha estudiado el género *Xanthomonas*. Por ejemplo, Velásquez *et al.* (1988), observaron la presencia de un quemado del follaje en plantaciones de *Xanthosoma sagittifolium* conocida comúnmente como ocumo, en diferentes localidades del Estado Barinas, Venezuela, caracterizado por pequeños puntos cloróticos que con el tiempo se transforman en manchas necróticas que invaden la lámina foliar, provocando clorosis y flacidez de las hojas. Del tejido foliar con los síntomas señalados, se aisló una bacteria cuyas colonias siempre fueron de color amarillo y reprodujo los síntomas antes descritos en las pruebas de patogenicidad, con una concentración de 10^8 células/mL. La bacteria tenía forma de bastón y presentaba un solo flagelo polar. Además, resultó KOH positiva, desdobra con facilidad el almidón, gelatina positiva, catalasa positiva, produce H₂S, de reacción alcalina en agar dextrosa rojo fenol, oxidasa negativa, crece con facilidad en el medio D₅ de Kado y produce colonias translúcidas con un halo de varios milímetros en el medio SX de Shaad y White. Todo lo anterior coincide con lo señalado para el género *Xanthomonas*, específicamente para *X. sagittifolium*, siendo éste el primer reporte de una enfermedad bacteriana en ocumo en Venezuela.

Por otra parte, Guevara *et al.* (1999), tomaron muestras de plantas de arroz (*Oryza sativa*) provenientes de Calabozo, Estado Guárico (Venezuela), con síntomas de estrías de

color amarillento en las puntas de las hojas, que luego se extendían a toda la lámina foliar tomando aspecto de quemado. De los aislamientos realizados, tanto de hojas como de semillas, obtuvieron una bacteria que formó colonias bacterianas de color amarillo claro, la cual reprodujo los síntomas en las pruebas de patogenicidad. Para la identificación de la bacteria observaron sus características, además, realizaron una serie de pruebas bioquímicas y fisiológicas con el fin de caracterizarla. La bacteria tuvo un crecimiento mucoso en el medio YDC, al examen directo presentó forma de bastón corto y con un solo flagelo polar. Resultó también ser Gram negativa, estrictamente aeróbica, oxidasa negativa, producción de H₂S positiva, indol negativo, catalasa positiva, lecitinasa negativa, sin reducción de nitratos, el crecimiento fue inhibido por cloruro de tetrazolio al 0,1 %; la hidrólisis de almidón fue negativa, licuefacción de gelatina variable, producción de ureasa negativa, utilización de citrato positivo y la hidrólisis de esculina positiva. La bacteria produjo ácido a partir de: glucosa, galactosa, sacarosa, trealosa, celobiosa, arabinosa, sorbitol, adonitol, maltosa y lactosa, pero no a partir de rafinosa y manitol, y no utilizó al sodio- propionato como fuente de carbono. Con base en los resultados obtenidos en las pruebas de patogenicidad, a las características de la bacteria en estudio y a los resultados de las pruebas bioquímicas y fisiológicas, se determinó que la bacteria causante del quemado del arroz en Venezuela es *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

Por otra parte, Hernández *et al.* (2000), colectaron muestras foliares de *Zinnia elegans*, conocida comúnmente como planta de cuarentona, provenientes de algunas localidades del estado Aragua (Venezuela), cuyas hojas presentaban manchas necróticas abundantes de 1-20 mm de diámetro o más, con un margen clorótico sobre la mayor parte del follaje. De las hojas con los síntomas descritos aislaron consistentemente una bacteria que produjo colonias de color amarillo, las cuales resultaron patogénicas al ser inoculadas en *Zinnia elegans* sanas. La bacteria fue Gram negativa, aeróbica y con forma de bastón. De acuerdo a estas y otras características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, se identificó a la bacteria como *Xanthomonas campestris* pv. *zinniae*, siendo el primer reporte de este patógeno para Venezuela.

Rodríguez *et al.* (2002), tomaron muestras de raíces de zanahoria presentando algunas áreas podridas, en diferentes comercios de frutas y hortalizas de los Estados Aragua y Miranda de Venezuela. A partir de esas muestras se aislaron en medio YDC diversas bacterias, las cuales fueron inoculadas en raíces de zanahoria frescas y sanas, reproduciéndose los síntomas iniciales y comprobándose su patogenicidad. La identificación de las bacterias patogénicas se realizó mediante características culturales, morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Los problemas diagnosticados fueron: pudrición blanda y oscura causada por *Pectobacterium carotovorum* y *Erwinia* sp, pudrición blanda clara causada por *Xanthomonas*, pudrición blanda parda causada por *Pseudomonas* sp, y mancha seca hundida causada por *Erwinia* sp. Para el aislado identificado como *Xanthomonas* sp, la colonia fue de color amarillo, mucoide, brillante, levantada y de bordes redondeados; creció bien a 36 °C durante 48 h en medio agar nutritivo (AN), medio levadura- dextrosa-carbonato de calcio agar (YCDA), entre otros ; la bacteria exhibió forma de bastón (1,62-2,15 x 0,51-0,66 µm) con un flagelo polar. En cuanto a las características fisiológicas y bioquímicas resultó ser aerobia estricta, productora de H₂S, catalasa positiva, y fue capaz de producir gas usando como fuentes de carbono arabinosa, glucosa, manosa, sacarosa y dextrosa.

Alvez *et al.* (2011) llevaron a cabo el diagnóstico de la bacteria *Xanthomonas albilineans* (ashby) dowson, causante de la escaldadura foliar (EF) en *Saccharum officinarum* o caña de azúcar, a partir de plantas sintomáticas de Venezuela, empleando pruebas microbiológicas, bioquímicas y moleculares. Los aislados fueron sometidos a análisis fenotípicos y bioquímicos, así como a ensayos de PCR con iniciadores específicos y las secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias (siglas en inglés ERIC-PCR). De los 50 aislados originales, 14 se seleccionaron por pruebas microbiológicas y bioquímicas, y de éstos, sólo tres cepas fueron identificadas como *X. albilineans*. Este resultado se corroboró al obtener por PCR la banda esperada de 360 pb con los iniciadores específicos sólo en estos tres aislados. Finalmente, con la técnica de genotipificación ERIC-PCR se obtuvieron patrones de bandas para las bacterias identificadas como *X. albilineans* que no son similares a los descritos por otros autores en otras regiones del mundo. Este trabajo representó la primera genotipificación de aislados de *X. albilineans* en Venezuela.

Por otra parte, Kassim (2011) aisló y caracterizó una cepa de *X. campestris* obtenida de hojas de repollo (*Brassica oleracea*) que presentaba lesiones necróticas amarillas características de *X. campestris*, en la ciudad de Mosul (Iraq). Las hojas infectadas fueron cortadas en pequeños trozos, lavadas en 5 mL de agua estéril y sembradas en agar malta-levadura (MY). Se aislaron colonias con la morfología típica de *Xanthomonas* spp, es decir colonias amarillas, convexas y mucoides, las cuales fueron confirmadas por medio de las pruebas microbiológicas y bioquímicas estándar. Además, el autor evaluó la capacidad de producción de xantano de este aislado, alcanzando los más altos valores de crecimiento y de cantidad de xantano después de 1 y 8 días de incubación, respectivamente. La sacarosa mostró ser la mejor fuente de carbono para la producción de xantano. Cuando el xantano producido fue examinado por cromatografía en capa fina (TLC), mostró estar compuesto por glucosa, manosa y ácido glucourónico, en adición a ácido pirúvico y acético.

I.3 La goma xantano

El xantano es un expolisacárido, cuya estructura primaria es un esqueleto lineal de β -D-glucosas unidas por enlaces glucosídicos (1 \rightarrow 4) (como en la celulosa), con una cadena lateral de trisacárido en la posición C3 de cada glucosa, conteniendo un residuo de ácido glucurónico unido por un enlace glucosídico (1 \rightarrow 4) a una unidad terminal de manosa, y con un enlace glucosídico (1 \rightarrow 2) a una segunda unidad de manosa que se conecta con el esqueleto (Figura 1). (Lachke, 2004).

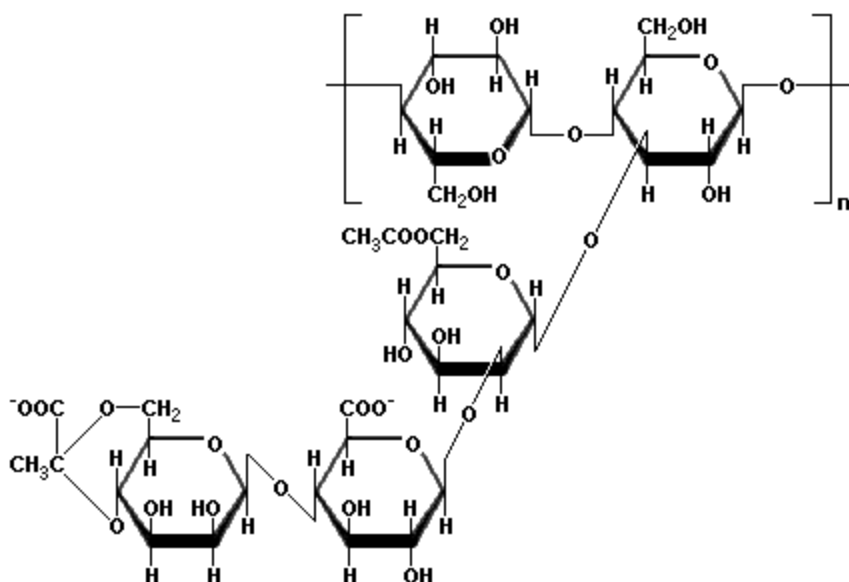


Figura 1. Estructura de la goma xantano. El número de subunidades es variable, y algunas de las manosas externas contienen un segundo sustituyente O-acetilo (Becker *et al.*, 1998).

Desde los años 90, se ha sugerido que las enzimas extracelulares y el xantano son colectivamente esenciales para la patogenicidad de *X. campestris*, relación establecida debido a la generación de una serie de mutaciones cuyo resultado fue la disminución o incapacidad de la cepa de producir xantano (Barber *et al.*, 1997; Chou *et al.*, 1997). De esta forma se ha relacionado el xantano como el causante de daños vasculares en las plantas, cuyos mecanismos consisten en el bloqueo de la fluidez del agua y el xilema (Denny 1995; Chan *et.al* 1999).

Estudios más recientes han demostrado que la contribución del xantano a la virulencia también depende de la planta hospedera y las condiciones ambientales (Dunger *et al.*, 2007; Rigano *et al.*, 2007). La producción de biopelículas y otras proteínas, presumiblemente proveen la protección contra antibióticos en respuesta a la supervivencia después de su colonización en plantas (Stoodley *et al.*, 2002). Sin embargo, el rol de las biopelículas en la virulencia de la planta no ha sido estudiado más extensivamente (Büttner *et al.*, 2010).

Los xantanos son biopolímeros que poseen propiedades reológicas como viscosidad, efecto elástico y solubilidad. Debido a su estructura, estos biopolímeros son solubles en altas

concentraciones de sales, y su viscosidad no depende tanto de su temperatura ni del pH. Al tener un comportamiento pseudoplástico, son resistentes a los procesos de congelación y descongelación, así como a la degradación enzimática, y toleran el choque térmico. Pueden ser sintetizados por medio de monómeros naturales, los cuales pueden ser renovables, más ecológicos y rentables. El xantano se caracteriza por ser un polvo de color crema, el cual puede disolverse fácilmente en agua, logrando así obtener soluciones viscosas (Lachke, 2004).

Borges *et al.* (2007), analizaron 30 cepas de *Xanthomonas campestris* pv *pruni*, logrando determinar que el xantano sintetizado presentó un comportamiento pseudoplástico relacionado a su viscosidad. Además, en la composición química determinaron que contenía glucosa, rannosa, y ácido glucorónico, diferentes del xantano comercial que no posee la rannosa. Respecto a la viscosidad, también se observaron diferencias entre la cepa en estudio y la comercial. Concluyeron que el rendimiento del xantano obtenido no es apropiado para la producción industrial de acuerdo a la literatura, sin embargo, la viscosidad de la solución del xantano sintetizado en 16 cepas fue más alta en comparación al industrial.

La goma xantano tiene ciertas características que la hacen un producto espesante único, como por ejemplo (Lachke, 2004):

- Efectiva en todo tipo de fluidos de perforación de base agua, desde sistemas de bajo contenido de sólidos hasta los de alta densidad.
- Compatible y estable en presencia de alta concentración de sales.
- Se utiliza en lodos de agua dulce, agua de mar, sistemas saturados con sal y en sistemas KCl.
- La alta capacidad de la goma xantano produce una óptima limpieza del hueco perforado, en zonas de bajas velocidades anulares. Se logran máximas tasas de penetración al reducir al mínimo las pérdidas de presión para maximizar la potencia hidráulica y el adelgazamiento, lográndose una viscosidad mínima en la broca o mecha.
- Es compatible con todos los aditivos normalmente utilizados y suspenderá adecuadamente los materiales densificantes. Los contaminantes como yeso, la

anhidrita, el CO₂, el H₂S y las sales no tienen efecto sobre la viscosidad producida por el producto. Además, ésta no se afecta por los lignosulfonatos.

Un ejemplo importante del uso del xantano se ha encontrado en la industria textil, ya que se ha demostrado que estos biopolímeros remueven significativamente los colorantes empleados en la industria textil de la solución acuosa, siendo necesario investigar acerca de que grupos funcionales participan en el proceso de bioadsorción, para entender mejor la formación del complejo biopolímero-colorante (Nigam, *et al.* 2001).

Otro uso del xantano es en la extracción de petróleo, donde los exopolisacáridos microbianos se emplean en el llenado y en el proceso de recuperación del petróleo, actuando como viscosificantes. Se requiere el empleo de un fluido con comportamiento pseudoplástico, donde la viscosidad disminuye al aumentar la velocidad de cizalla. Durante la operación de perforación, las soluciones deben ser lo suficientemente fluidas para facilitar el bombeo de la mezcla, y cuando la operación se detiene, la viscosidad debe aumentar para que los sólidos se mantengan en suspensión y poder ser estables bajo condiciones extremas de temperatura y pH. Tanto la goma xantano como el succinoglucano, se emplean como aditivos en muchas etapas del proceso de perforación, producción, transporte y procesamiento de crudo (Sutherland, 1990). Es importante destacar que a pesar de que Venezuela es un país con una economía dependiente principalmente de la renta petrolera, no se produce xantano, y todo el que es usado es importado ocasionando grandes costos de producción.

Debido a sus múltiples usos, la goma xantano es uno de los mayores biopolímeros comercialmente producidos, con una capacidad anual de producción de 30.000 toneladas, lo que se traduce en ganancias de 408 millones de dólares, a pesar de que en sus procesos de producción se encuentren o utilicen diferentes sustratos. (Kalogiannis *et al.*, 2003). Actualmente los mayores productores de xantano son Merck y Pfizer en Estados Unidos, Rhône Poulenc y Sanofi-Elf en Francia, y Jungbunzlauer en Austria (Ripoll, 2009).

La producción de xantano es un proceso estrictamente aeróbico y se realiza en medios líquidos o semi-sólidos. Son muchos los estudios de producción industrial y condiciones óptimas que se han realizado para la goma xantano. Se ha encontrado que los niveles en la

producción de xantano están relacionados: la sensibilidad de la bacteria a ciertos antibióticos (Torrestiana *et al.*, 1990); que depende de las condiciones óptimas de crecimiento celular, composición del medio de cultivo y factores ambientales tales como pH y temperatura (Azuaje, 1999); que deben controlarse los entornos de aireación y agitación para estabilizar las condiciones de aerobiósisis (Borges *et al.*, 2007); y que se pueden emplear medios de cultivos alternativos, por ejemplo, suplementados con melaza, para la producción industrial de xantano por parte de *Xanthomonas campestris* PTCC 1473 (Gilani *et al.*, 2011).

Las aplicaciones de la goma xantano pueden expandirse a medida que se van estudiando más a fondo sus propiedades, un ejemplo de ello es el estudio de Pinto *et al.* (2011) quienes realizaron una deacetilación química del xantano natural, con la finalidad de medir la eficiencia de propiedades reológicas, tales como, la viscosidad del xantano post-modificación del mismo. Los autores concluyeron que el xantano desacetilado y dializado mostró una viscosidad más alta en relación con las muestras sólo dializadas, lo que demostró que la desacetilación bajo ciertas condiciones puede aumentar la viscosidad del xantano, resultado muy importante para identificar nuevas aplicaciones del biopolímero .

El aislamiento y caracterización de cepas de *Xanthomonas* de ambientes naturales sigue siendo el método más eficiente para identificar cepas productoras de altas cantidades de xantano de alta calidad reológica. Otros criterios considerados son la morfología de la colonia y la virulencia. La mayoría de la literatura referente a la producción de xantano está basada en cepas obtenidas de colecciones de cultivos, principalmente *Xanthomonas campestris* NRRL.B-1459, y sus derivados. Son pocos los reportes acerca de la caracterización de cepas nativas de *Xanthomonas* con respecto a la producción de goma xantana, por lo que se hace necesario realizar una exhaustiva caracterización de cepas nativas de *Xanthomonas* en cuanto a su fisiología, características bioquímicas, identificación molecular, resistencia a antibióticos, metales pesado y capacidad de producción de goma xantano.

I.4 El operón *gum*

La goma xantano se construye a partir de los nucleótidos de azúcar citoplasmáticos, acetil- CoA y fosfoenolpiruvato con un poli-isoprenol fosfato de membrana interna que actúa como aceptor (Ielpi *et al.*, 1993). La elucidación de su ruta biosintética se ha realizado en gran

medida gracias al uso de células de *X. campestris* que se congelaron y descongelaron varias veces en presencia de EDTA. La ruta escalonada del pentasacárido repetitivo y el proceso de polimerización se resolvieron mediante la incubación de estas células permeabilizadas con combinaciones de UDP-glucosa, GDP-manosa y UDP-ácido glucurónico. La síntesis de la unidad repetitiva se inicia con la transferencia de glucosilo 1-fosfato a partir de UDP-glucosa al poli-isoprenol fosfato, seguido por la transferencia secuencial de otros residuos de azúcar, para formar la unidad de repetición completa. Los residuos acetil y piruvil son añadidos al lípido ligado al nivel del pentasacárido, donados por el acetil-CoA y el fosfoenolpiruvato, respectivamente. El estudio detallado del proceso de polimerización indicó que las cadenas de xantano crecen en el extremo reductor (Ielpi *et al.*, 1993); mientras que el mecanismo de exportación del polisacárido permanece sin determinar, pero se piensa que podría estar asociado con el evento de polimerización (Figura 2) (Wibberg *et al.*, 2015).

Gracias a que la mayoría de los métodos genéticos utilizados para estudiar *Escherichia coli* se puede utilizar en *X. campestris* pv. *campestris*, incluyendo conjugación, electroporación, mutagénesis química y por transposones, y mutagénesis *in situ*, se han logrado importantes adelantos en el estudio de los genes relacionados con la síntesis de goma xantano. De este modo, se ha generado una colección de mutantes no mucoides defectivos en la producción de xantano, desarrollados por mutagénesis química y por el uso de transposones, revelando varios loci genéticos implicados en la biosíntesis de xantano. Estos estudios se complementan con técnicas más modernas como la expresión del operón *gum* de *X. campestris* en plantas, mediante el uso de la expresión de un reportero unido a una fracción del gen en estudio, en este caso sobre *gumB*.

Las regiones denominadas *xpsIII*, *xpsIV* y *xpsVI* (Harding *et al.*, 1993), así como un grupo de genes de 35,3 kb (Hötte *et al.*, 1990) contienen varios genes necesarios para la biosíntesis de los nucleótidos necesarios para el xantano y los lipopolisacáridos. El grupo de genes de 35,3 kb comprende dos regiones separadas, una de las cuales se solapa con la región *xpsIII*. La secuencia de ADN del fragmento solapado en común de estas secuencias reveló dos genes, designados como *xanA* y *xanB* (Koplin *et al.*, 1992). Mientras que el gen *xanA* codifica una enzima con actividad fosfoglucomutasa y fosfomanomutasa, el gen *xanB* codifica para

una enzima bifuncional con actividades fosofmanosa isomerasa y GDP manosa-pirofosforilasa (Figura 2). Por lo tanto, una parte de esta región codifica dos enzimas, una de los cuales se requiere para la síntesis de los tres nucleótidos precursores del xantano, y la otra es requerida para la síntesis de la GDP manosa (Vojnov *et al.*, 2001).

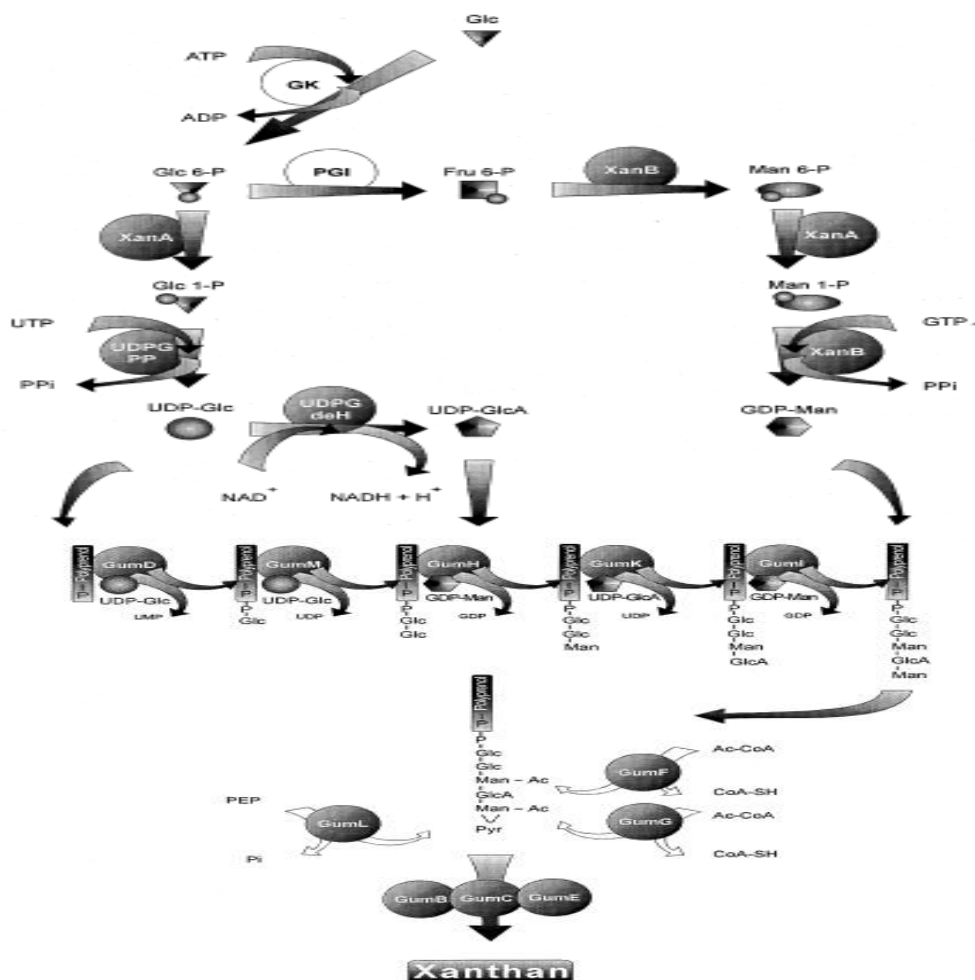


Figura 2. Ruta propuesta para la biosíntesis de goma xantano. Las funciones de los genes se han determinado por medio de análisis funcionales In Vivo e In Vitro. Glc, glucosa; Fru, fructosa; Man, manosa; GlcA, ácido glucurónico; Ac, acetilo; Pyr, piruvilo; PPI, pirofosfato; GK, glucocinasa; PGI, fosfoglucosa isomerasa; UDPG-PP, UDP-glucosa pirofosforilasa; UDPG-deH, UDP-glucose deshidrogenasa. Las esferas vacías representan enzimas codificadas por genes que aún no han sido descritos. Las flechas vacías indican que las unidades repetidas son variables. *gumJ* podría no estar asociada con algún paso de la ruta biosintética en particular, aunque no se descarta la posibilidad de su participación previa o posterior al proceso de polimerización (Becker *et al.*, 1998).

Los análisis genéticos y bioquímicos mostraron que las mutaciones en la región *xpsIV* afectan la actividad de la enzima UDP-glucosa-pirofosforilasa, mientras que las mutaciones en *xpsVI* dejan abolida por completo la actividad de la UDP-glucosa deshidrogenasa (Harding *et al.*, 1993) (Figura 2). Los mutantes mapeados en todas estas regiones exhiben el mismo fenotipo: no producen xantano In Vivo, pero producen el poliisoprenil difosfato en la forma pentasacárido y polímero cuando son añadidos los nucleótidos de azúcares en el sistema *in vitro* (Harding *et al.*, 1993; Vojnov *et al.*, 2001).

Los genes necesarios para el ensamblaje del intermediario ligado a lípidos, polimerización y secreción han sido aislados y secuenciados (Nam *et al.*, 2013). Estos genes se agrupan en una región de 16 kb, denominada *xpsI* o *gum* (Figura 3). A diferencia de otros sistemas biosintéticos de exopolisacáridos, esta región se desvincula de las necesarias para la síntesis de precursores de nucleótidos de azúcar (Becker *et al.*, 1997). El análisis de nucleótidos de esta secuencia predice la presencia de 12 marcos abiertos de lectura (ORF, del inglés *open reading frames*) (*gumB* a *gumM*) (Figura 3) (GenBank número de acceso U22511) (Becker *et al.*, 1995). La organización transcripcional de la región *gum* fue analizada a través de fusiones transcripcionales *gum-lacZ* y ensayos de primera extensión (Katzen *et al.*, 1996). Estos análisis indicaron que la región *gum* se expresa como un solo operón a partir de un promotor localizado aguas arriba del primer gen, *gumB*; mientras que se ubicó un segundo promotor aguas arriba de *gumK*.

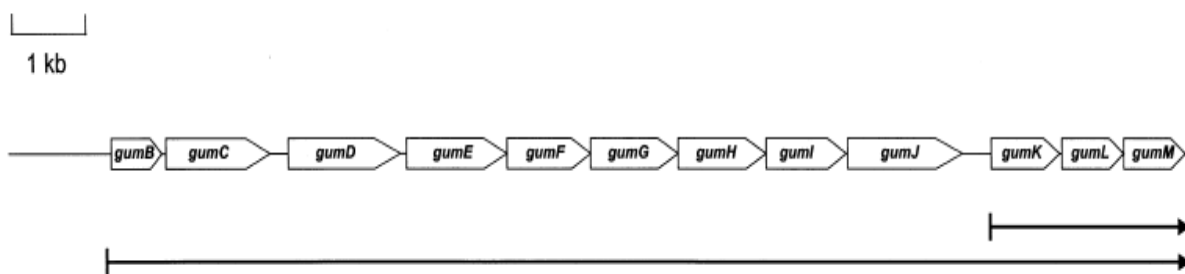


Figura 3. Mapa genético del operón *gum* de *Xanthomonas campestris* mostrando la organización de los genes. La localización y nombres de los genes se indican en los recuadros. Las flechas negras indican el tamaño y la dirección de los transcritos (Becker *et al.*, 1998).

Las funciones bioquímicas de los productos de los genes *gum* se han asignado analizando la formación In Vitro de intermediarios biosintéticos ligados a lípidos y polímeros, empleando células permeabilizadas de cepas mutantes en *gum*. Gran parte de esta información ha sido publicada como patentes, resúmenes de simposios, comunicaciones personales, o capítulos de libros, pero no como resultados verificables en la literatura científica, salvo algunas excepciones. Sin embargo, Katzen *et al.* (1998) obtuvieron un conjunto de mutantes en cada uno de los genes *gum*, y las analizaron utilizando el sistema *in vitro*, resumiéndose en la Figura 2 las funciones propuestas para cada uno de los genes *gum*. GumB es una proteína exportadora de polisacáridos de la membrana externa, de configuración tetramérica en solución. Por su parte, GumC es una proteína co-polimerasa de polisacáridos, cuyas formas nativas y recombinantes se presentan en conformación oligomérica consistente de dos dímeros y oligómeros de orden superior. Los segmentos transmembrana de GumC son requeridos para expresión y/o estabilidad de la GumC. A pesar de conocer la conformación de GumB y GumC, no se ha dilucidado su papel en los procesos de polimerización y exportación del xantano (Bianco *et al.*, 2014).

Por otra parte, la proteína GumD cataliza la adición de glucosa 1-fosfato para el portador de fosfato poli-isoprenol. Esta reacción reversible es el primer paso en la biosíntesis de los intermediarios ligados a lípidos implicados en la síntesis de xantano (Kim *et al.*, 2009).

GumM cataliza la adición de una β -1,4-Glucosa, seguida por la adición de una α -1,3-manosa interna por GumH, un ácido β -1,2-ácido glucurónico GumK, y la β -1,4-manosa terminal por GumI (Salinas *et al.*, 2011). GumI es categorizada como una proteína de membrana monotópica, con actividad β -manosiltransferasa que usa GDP-manosa como sustrato donador y β -1,2-manosa- α -1,3-glucosa- β -1,4-glucosa-PP-poliisoprenil ácido glucurónico como aceptor, que presenta un dominio conservado de glicosiltransferasa de la superfamilia GT-B y proteínas homólogas en varios organismos procariontes (Salinas *et al.*, 2011).

Por su parte, GumL es una proteína que incorpora residuos piruvil a la β -manosa externa, mientras que los residuos de acetilo se incorporan a la α -manosa por GumF, y a la β -manosa externa por GumG. De igual manera, GumK (beta-1,2-glucuronosiltransferasa) pertenece a la superfamilia GT-B y cataliza la transferencia de un residuo de ácido

glucorónico (GlcA) desde la uridina difosfato (UDP)-GlcA (UDP-GlcA) a un trisacárido ligado a lípido embebido en la membrana de la bacteria (Salinas *et al.*, 2016). Es una proteína de 44 kDa asociada a la membrana, miembro de la familia glicosiltransferasa 70. Se han identificado en GumK un número de residuos importantes para su actividad catalítica, incluida la Asp157, la cual sirve como base general en la reacción de transferencia. Los residuos Met231, Met273, Glu272, Tyr292, Met306, Lys307, y Gln310 interactúan con la UDP, y mutaciones en estos residuos afectan la actividad de la proteína *in vitro* e *in vivo* (Barreras *et al.*, 2008).

La mayoría de los genes de *gum* podrían ser mutados dentro de la cepa de tipo salvaje. Sin embargo, *gumB*, *gumC*, *gumE*, *gumM* y *gumJ* sólo podrían ser mutados mediante el uso de una cepa defectiva en la producción de UDP-glucosa, ya que su inactivación en el tipo silvestre son letales (Katzen *et al.*, 1996, 1998). Inesperadamente, el primer paso en el ensamblaje del intermediario ligado a lípido se afectaba severamente en estos dobles mutantes, pero podía recuperarse por la introducción de un plásmido que llevara la región para el dominio C-terminal de *gumD*, aparentemente responsable de la actividad glucosil-1-fosfato transferasa, sugiriendo que *gumD* tiene un posible papel regulador en la biosíntesis del xantano, o que se requiere una expresión balanceada de la proteína GumD para una expresión adecuada de su actividad, lo que tiene una particular significancia si GumD interactúa con otra proteína.

De igual manera, los mutantes defectivos en *gumB*, *gumC* y *gumE* son capaces de acumular subunidades de xantano completas *In Vitro* y son incapaces de sintetizar polímeros, por los que los productos de estos genes pueden ser necesarios para la polimerización o exportación de polímero funcional. Aunque la función del producto *gumJ* no puede ser asociado con un paso particular en la biosíntesis del xantano, se piensa que podría ser necesario para prevenir la acumulación de un producto nocivo o para el reciclaje de sustratos esenciales. (Katzen *et al.*, 1996, 1998).

Adicional a esto, también se han realizado estudios en especies diferentes a *X. campestris*, indicando que la presencia de estos genes está ampliamente distribuida en el género. En este sentido, Ki-Hoon *et al.* (2007) llevaron a cabo el análisis transcripcional del grupo de genes *gum* en *X. oryzae* pv. *oryzae*, a través de la técnica de RT-PCR, realizando un

análisis de los genes *gum*, tanto en cepas silvestres como en mutantes. Los hallazgos revelados describían que los ORF (desde *gumB* hasta *gumM*, y la posible presencia de un *gumN*) fueron transcritos como un ARNm policistrónico, localizando además un segundo promotor aguas arriba de *gumG*. Los autores concluyeron que el grupo de genes constituyen la expresión de un operón, debido a la evidencia de sobreposición de las transcripciones.

I.5 Regulación de la síntesis de xantano

La mayor parte de lo que se sabe acerca de la regulación de la síntesis de xantano se deriva de estudios de fitopatogenicidad. Se demostró que en un mutante de *X. campestris* pv. *campestris* defectivo en el gen *clp* (proteína similar a *cap*), que presentó patogenicidad reducida, disminuyó su capacidad de producción de goma xantano y otras enzimas extracelulares (Crécy-LaGard *et al.*, 1990). La síntesis de xantano y otras enzimas extracelulares es activada por un grupo de al menos cinco genes, designados como *rpf* (regulación de factores de patogenicidad) (Tang *et al.* 1991). La secuencia de uno de estos genes, *rpfC*, mostró homología con miembros del sistema de regulación de dos componentes. Estos factores se encuentran balanceados por un gen que regula negativamente la síntesis de xantano y enzimas extracelulares.

A pesar de que la goma xantano no es esencial para la virulencia de la planta, las etapas iniciales de su biosíntesis parecen estar reguladas por un *regulón de patogenicidad* (Coplin *et.al* 1990). Es necesario ahondar en la regulación de la producción de xantano, ya que la mayoría de los patovares se caracterizan por poseer pocos promotores en el operón *gum*. En este sentido, Nam *et al.* (2013) evaluaron el efecto de una mutación en el gen *wxoD* de *X. oryzae* pv. *oryzae*, que codifica para una O-acetilasa putativa, en la producción de xantano así como en la quimiotaxis. La mutación incrementó la producción de xantano en un 52%, siendo el mutante resultante no móvil en placa de medio semi-sólido. Adicionalmente, se disminuyó la expresión de varios genes involucrados en la quimiotaxis, incluidos *cheW*, *cheV*, *cheR*, y *cheD*. En resumen, la mutación en el gen *wxoD* afecta la producción de xantano, así como la quimiotaxis bacteriana. Sin embargo, el gen *wxoD* no es esencial para la virulencia de *X. oryzae*.

Se ha propuesto que la disponibilidad de glucosa-6-fosfato es un factor limitante en la producción de goma xantano, y podría ser posible incrementar la producción de xantano por medio de la modulación de las actividades de las enzimas involucradas en el metabolismo central del carbono. En este sentido, Kim *et al.* (2010) inactivaron dos genes relacionados con el metabolismo central del carbono para modular la glucosa-6-fosfato intracelular y evaluar su efecto en la producción de xantano, en una cepa salvaje de *X. oryzae* pv. *oryzae*. Al inactivar el gen *edd* (que codifica para una fosfogluconato deshidratasa) se incrementaron los niveles intracelulares de la glucosa 6-fosfato desde 0,05 a 1,17 mmol/g (peso seco). Esto estuvo acompañado de un incremento en la producción de goma xantano, alcanzando niveles de 2,55 g/L (medio de cultivo). En contraste, la inactivación del gen *gndA* (que codifica para la 6-fosfogluconato deshidrogenasa) no tuvo influencia alguna en los niveles intracelulares de glucosa-6-fosfato o en la producción de goma xantano.

II. HIPÓTESIS

La cepa M2044 pertenece al género de *Xanthomonas*, especie *campestris* y es productora de goma xantano.

III. OBJETIVOS

III.1 Objetivo General

Caracterizar bioquímica, microbiológica, molecularmente y realizar estudios fenotípicos de la goma xantano a la cepa *Xanthomonas campestris* M2044, aislada a partir de cultivos comerciales de Venezuela.

III.2 Objetivos Específicos:

- Determinar las características macro y micromorfológicas de la cepa M2044.

- Realizar estudios bioquímicos e identificación microbiológica (pruebas API) de la cepa M2044.
- Identificar molecularmente, por medio de PCR del ADN_r 16S, la cepa M2044 de *Xanthomonas*.
- Realizar la caracterización preliminar de la resistencia a antibióticos de *X. campestris* M2044.
- Evaluar la resistencia a metales pesados de las cepas de *X. campestris* M2044.
- Evaluar el crecimiento de *X. campestris* M2044 en diversas fuentes de carbono.
- Evaluar la capacidad de producción de exoproteínas por parte de *X. campestris* M2044.
- Inducir la producción de goma xantano por parte de *X. campestris* M2044.
- Evaluar mediante espectrometría UV/Visible el producto obtenido del medio de inducción de goma xantano y comparar con otros resultados ya publicados.

IV. Métodos

IV.1 Población y muestra

La muestra estuvo constituida por un aislado bacteriano obtenido del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM), del Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV). El CVCM informa que la cepa proviene del Laboratorio de Micología (antiguo Laboratorio de Micología y Fermentación) del IVIC, y fue aislada a partir de *Brassica oleracea* (repollo).

IV.2 Estudio micro y macromorfológico

El estudio micromorfológico consistió en:

1. Evaluación de motilidad y forma de las células (observación en el microscopio óptico), para lo que se depositó una gota de solución salina fisiológica sobre un portaobjetos, posteriormente con la ayuda de un asa previamente flameada y enfriada se realizó la

suspensión de la colonia a estudiar. Sobre el mismo, se colocó un cubreobjetos y se observó al microscopio con el objetivo de 40X (Ramírez *et al.*, 2006).

2. Conocimiento de la naturaleza bioquímica de la pared bacteriana (Tinción de Gram): se fijó la muestra al portaobjetos, se añadió el colorante primario cristal violeta y se dejó actuar por 1 minuto, se aplicó el mordiente representado por el lugol en un intervalo de tiempo de un minuto. Se añadió el decolorante alcohol – acetona y se dejó por 10 segundos. Finalmente, se agregó el colorante secundario Safranina por 30 segundos; se realizó el lavado con agua corriente en los intervalos de tiempo de cada paso de la coloración. Se secó al aire libre y se observó al microscópico con objetivo de 100X (Ramírez *et al.*, 2006).

El estudio macromorfológico consistió en la observación de las características macroscópicas de las colonias, tales como color, forma, textura y aspecto, así como la producción de pigmentos. Los aislados se cultivaron en agar BHI (Anexo 1) y sus características macromorfológicas se observaron al cabo de 24 horas de incubación a 30 °C (Koneman *et al.* 1999).

IV.3 Caracterización bioquímica

Con el fin de identificar a los aislados en estudio y lograr una ubicación taxonómica preliminar a nivel de grupo o familia, se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas (la composición de los medios de cultivo se describen en el Anexo 2):

- Prueba de la Oxidasa: de gran utilidad para la diferenciación de las enterobacterias. Para ellos se colocó una gota de reactivo de oxidasa en el papel de filtro que reposaba sobre un portaobjeto. Seguidamente, con un palillo de madera estéril, se colocó una colonia del microorganismo y se dejó unos segundos para observar la reacción mediante un cambio de color.
- Prueba KIA: cuyo propósito es la determinación de la fermentación de carbohidratos (glucosa y lactosa), así como la determinación de ácido sulfhídrico. La cuña es aeróbica, pues está expuesta al oxígeno atmosférico, mientras que el taco es en buena

medida anaeróbico. En esta porción se lee la fermentación de la glucosa mientras que en la cuña o bisel se lee la fermentación de la lactosa. Los indicadores de este medio son: rojo fenol para fermentación de carbohidratos y tiosulfato de sodio junto a una sal ferrica para la determinación del ácido sulfhídrico.

- Prueba LIA: posee la ventaja que permite determinar la desaminación de la lisina. El LIA al igual que KIA tiene dos cámaras de reacción: el bisel, en el cual se lee la desaminación de la lisina y el taco en el cual se mide la descarboxilación del aminoácido. Los indicadores de este medio son: el púrpura de bromocresol, tiosulfato de sodio y una sal férrica.
- Citrato de Simons: da a conocer si la bacteria utiliza el citrato como fuente de carbono, lo que generaría la producción de amoníaco, la alcalinización del medio mediante la conversión de amoníaco en hidróxido de amonio, permite el viraje de color a través del indicador azul de bromotimol.
- Prueba MIO (Motilidad, Indol, Ornitina): que aportó la observación de la descarboxilación de la ornitina, la motilidad y la producción de indol. Se llevó a cabo mediante la inoculación de la cepa en estudio por punción con asa de aguja del medio MIO. Posteriormente se incubó a 37 °C de 18-24 horas. La reacción del indol se observó al añadir reactivo de Kovac.
- Hidrolisis de la Urea: Permite la diferenciación de especies de *Proteus* de otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, se utilizó para medir la presencia o ausencia de la enzima ureasa, la cual en presencia genera un compuesto en el medio denominado amoníaco y en cuya reacción química genera el viraje de color debido al indicador rojo fenol. (Koneman *et al.*, 1999; Holt *et al.*, 2000, Ramírez *et al.*, 2006).

IV.4 Identificación microbiológica: Pruebas API

Posterior al aislamiento y ejecución de todo el proceso de caracterización bioquímica, se procedió a realizar la identificación microbiológica con la aplicación de las Pruebas API. Básicamente, la galería API consta de 21 test bioquímicos estandarizados y miniaturizados, adjunta a una base de datos. Este sistema utiliza micro volúmenes de las muestras lo que hace

que sea rápido, eficaz y permite realizar numerosas pruebas a la vez. La tira de API contiene 20 microtubos o pocillos con distintos sustratos deshidratados. Cada uno es una prueba bioquímica distinta. La prueba número 21, la oxidasa, se hace de forma independiente a la tira (Salazar *et al.*, 2008). Las pruebas de que consta la galería se reflejan en la Tabla 1.

Tabla 1. Lectura de resultados para batería de pruebas API.

Prueba	Reacción / Enzimas	Negativo	Positivo
VP	Producción de acetoina (Voges-Proskauer)	Sin color	rosa-rojo
GEL	Gelatinasa	Sin difusión	difusión de pigmento
GLU	Fermentación/oxidación de glucosa	Azul o verde	Amarillo
MAN	Fermentación/oxidación de manitol	Azul o verde	Amarillo
INO	Fermentación/oxidación de inositol	Azul o verde	Amarillo
SOR	Fermentación/oxidación de sorbitol	Azul o verde	Amarillo
RHA	Fermentación/oxidación de ramnosa	Azul o verde	Amarillo
SAC	Fermentación/oxidación de sacarosa	Azul o verde	Amarillo
MEL	Fermentación/oxidación de melobiosa	Azul o verde	Amarillo
AMY	Fermentación/oxidación de amigdalina	Azul o verde	Amarillo
ARA	Fermentación/oxidación de arabinosa	Azul o verde	Amarillo
OX	Citocromo oxidasa	Sin color	Sin color
ONPG	Beta-galactosidasa	Sin color	Sin color
ADH	Arginina deshidrolasa	Amarillo	Rojo-naranja
LDC	Lisina descarboxilasa	Amarillo	Rojo-naranja
ODC	Ornitina descarboxilasa	Amarillo	Rojo-naranja
CIT	Utilización del citrato	Verde	Azul oscuro o turquesa
H ₂ S	Producción de H ₂ S	Sin precipitado negro	Precipitado negro
URE	Ureasa	Amarillo	Rojo-naranja
TDA	Triptófano desaminasa	Amarillo	Marrón-rojo
IND	Producción de indol	Amarillo	Color rosa o anillo rosa-rojo.

Para la realización de estas pruebas se utilizó una colonia aislada del microorganismo. Se preparó una suspensión en 5 mL de solución salina (1 % de NaCl) o 5 mL de agua estéril, luego se agregó la suspensión de bacterias llenando los tubos, no la cúpula de todos los pocillos (cada pocillo tenía un tubo y una cúpula, parte aerobia). Se llenó la cúpula de los pocillos CIT, VP, GEL con la suspensión de bacterias y se cubrió con parafina las cúpulas de

los pocillos ADH, LDC, ODC, URE y H₂S, para obtener anaerobiosis. La tira se colocó en su propia cámara húmeda de incubación; previamente se agregó agua en los alvéolos de la cámara para proporcionar una atmósfera húmeda durante la incubación. Se procedió a incubar a 37 °C durante 18-24 horas, y tras la incubación se registraron los resultados inmediatos, es decir, los que no requieren ser revelados.

La lectura de los resultados se llevó a cabo comparando los colores de cada pocillo con los de las tablas de lectura, registrando el resultado como positivo o negativo (Tabla 1). Del conjunto de reacciones y resultados se obtuvo un perfil numérico de 7 cifras. Los pocillos estaban separados en grupos de tres: en total habían 7 grupos de tres tubos o triplete, el test número 21 correspondía al test de la oxidasa (Salazar *et al.*, 2008). Para obtener el perfil numérico de 7 cifras, a cada pocillo se le dio el valor 0, 1, 2 ó 4 de acuerdo a los siguientes criterios:

- Si la reacción era negativa se colocó 0.
- Si la reacción era positiva se colocó: 1 si era el primer pocillo de un triplete, 2 si era el segundo pocillo, 4 si era el tercer pocillo.
- Se sumaron los valores de cada triplete, con las sumas de los siete tripletes se obtuvo un código de 7 cifras.

Una vez obtenido el código, se buscó en la tabla de identificación la especie por medio de programas informáticos.

IV.5 Identificación molecular: comparación de la secuencia del gen *ADNr 16S*

La cepa en estudio se sembró en medio Luria Bertani Duro (MLD) (Anexo 1), para tener cepas frescas para las pruebas de PCR. La identificación molecular consistió en la amplificación del gen *ADNr 16S* por medio de PCR, utilizando los cebadores bacterianos universales 27F (5`AGAGTTTGATC CTGGCTCAG3`) (Lane 1991) y 1492R (5`GGTTACCTTGTTACGACTT3`) (Dekio *et al.*, 2005).

Las reacciones de amplificación fueron preparadas para un volumen total de 10 μ L, conteniendo: 5 μ L de GoTaq® Green Master mix (Promega), 2 μ L (0,1 μ g/ μ L) de cada cebador y 4,6 μ L de H₂O destilada estéril. Las amplificaciones por PCR se realizaron en un Termociclador Applied Biosystems 2720 con el programa siguiente: lisis bacteriana y desnaturalización a 95 °C por 10 min, seguida por 30 ciclos de 94 °C por 45 s, 51 °C por 45 seg y 72°C por 1.5 min por ciclo, y un paso de extensión final por 10 min a 72 °C (Dekio *et al.*, 2005, Batisson *et al.*, 2009).

Posteriormente, se llevó a cabo la purificación con sales de los productos de la amplificación, según el protocolo descrito por Sambrook y Russell (2012), realizándose las siguientes modificaciones: al producto de PCR restante, luego de emplear 3 μ L para su visualización en el gel de agarosa, se le agregó H₂O destilada estéril hasta completar un volumen de 100 μ L. A continuación, se le adicionó un volumen de acetato de amonio 10M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto (100 % v/v). Esta mezcla se dejó precipitar por 10 min, y se descartó el sobrenadante. La pastilla de ADN se llevó a 1mL de etanol al 70 % v/v dos veces, centrifugando por 10 min y 5 min a 13,4 rcf, respectivamente. Luego se procedió a secar el sedimento (pellet) a temperatura ambiente, y se resuspendió en 11 μ L de H₂O destilada estéril. Para la verificación de la presencia y la calidad del ADN luego de la purificación, se procedió a visualizar el producto precipitado ya resuspendido en un gel horizontal de agarosa al 0,8 %, con 50 ng/mL de bromuro de etidio, cargando 1 μ L del producto purificado luego de combinarlo con 1 μ L de buffer de carga 6X, y 4 μ L de H₂O destilada estéril.

Los productos purificados se enviaron a secuenciar usando el cebador *forward* (27F), en Macrogen Inc. (Korea). Posteriormente, con las secuencias obtenidas se generaron *contigs* en el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Hall, 1999). Luego se realizó un análisis de similitud entre las secuencias donde se compararon dichos contigs, usando la herramienta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Zhang *et al.*, 2010), con las secuencias publicadas en las bases de datos del *GenBank* (el programa *Nucleotide Blast* en <http://blast.ncbi.nlm.gov/Blast.cgi> (Johnson *et al.*, 2008). La identidad bacteriana fue asignada tomando en cuenta los resultados obtenidos de la comparación de las secuencias con la base de datos, usando como parámetro de identidad “max ident” \geq 85 % (Stackebrandt *et.al* 2006) y

una cobertura en el alineamiento de secuencias (“query coverage”) ≥ 98 % en el BLAST (Nucleotide Blast) con *Nucleotide collection* dentro del GenBank (NCBI).

VI.6 Estudios preliminares de resistencia

VI.6.1 Resistencia de antibióticos

Una vez concluida la identificación microbiológica y molecular, se procedió a estudiar de manera preliminar la resistencia a los antibióticos. Para ello se prepararon 14 placas del medio MLD (Sambrook *et al.*, 1989) con antibióticos comprados comercialmente (adquiridos en la farmacia), los cuales se diluyeron hasta obtener una concentración stock de 100 mg/mL. Los antibióticos seleccionados en presentación de comprimidos fueron: Claritromicina 500 mg, Levofloxacin 500 mg, Amoxicilina 500 mg, Cefalotina 1 gr, Ceftazidima 1 g, Gentamicina 80 mg, Amoxicilina/Ac. Clavulánico 500 mg, Cefadroxilo 500 mg, Ciprofloxacina 500 mg, Ampicilina 500 mg y Kanamicina 500 mg, Cloranfenicol 500 mg; mientras que los de presentación intravenosa serán Ceftriaxona 1 gr y Cefotaxima 1 gr.

A partir de estas soluciones stock, se prepararon placas de medio MLD (Luria Bertani Duro) (25 mL) con las siguientes concentraciones de cada uno de los antibióticos: 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C para el control de contaminación. Luego se sembró la cepa por medio de palillos, y se incubaron a 37 °C, tomando la lectura a las 24 y 48 h de incubación.

IV.6.2 Resistencia a metales pesados

Se evaluó la capacidad de crecimiento de la cepa en estudio en medio MLD suplementado con concentraciones de 1 a 5 mM de sulfato de níquel, cloruro de mercurio, sulfato de cobre, cloruro de estaño, nitrato de plata, cloruro de hierro, cloruro de bario, acetato de zinc, hidróxido de litio, carbonato de manganeso para observar la extensión del crecimiento

en los diferentes cuadrantes de la placa de Petri. Luego, se sembraron 100 uL de la suspensión bacteriana (previamente preparada en medio MLD) y se incubaron a 37 °C, tomando la lectura a las 24 y 48 h de incubación.

IV.7 Crecimiento en diferentes fuentes de carbono

Se evaluó la capacidad de crecimiento de la cepa en estudio en medio YDC (Anexo 1) suplementado con diferentes fuentes de carbono, observando la extensión del crecimiento en los diferentes cuadrantes de la placa de Petri. Los azúcares se colocaron a una concentración final de 0,2 g/mL, y se ensayaron las siguientes: glucosa, galactosa, sacarosa, arabinosa, xilosa, fructosa, lactosa, maltosa y dextrosa. Una vez sembrada la cepa, la misma se incubó a 37 °C por 24 horas.

IV.8 Producción de exoproteínas

IV.8.1 Producción de proteasas

En un recipiente con 150 mL de agua destilada se diluyeron 5 gr de agar bacteriológico y 2,5 g de extracto de levadura. Se esterilizó la preparación a 15 psi por 15min. En otro recipiente con 100 mL de agua destilada se diluyeron 2,5 gr de leche descremada, y se esterilizó a 10 psi por 10min. Finalmente, luego de esterilizado y en condiciones estériles, se mezcló la leche descremada con el agar fundido y se vertió en placas de petri estériles. Una vez preparadas las placas, se inocularon 10 µL de la suspensión bacteriana a evaluar en el medio, y se incubó por 24 horas a 30 °C (Ramírez *et al.*, 1996).

IV.8.2 Producción de amilasas

La detección de Amilasas se realizó incubando 10 µL de una suspensión bacteriana en medio M LD que contenía 2,5 g/L de almidón, después de incubar se cubrió la superficie de

las placas con lugol que al reaccionar con el almidón intacto formó un complejo púrpura. En las zonas que rodean los aislados que excretan amilasas se formó un halo que pudo distinguirse fácilmente debido al contraste con el color púrpura del resto de la placa.

IV.8.3 Producción de β -galactosidasa

Se ensayó incubando 10 μ L de una suspensión bacteriana en medio MLD que contenía 40 μ g/mL 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal) como fuente de carbono, este sustrato cromogénico similar a la galactosa al ser degradado por la enzima en cuestión, se torna de color azul.

IV.8.4 Producción de catalasa

Se sembró el aislado en placas de medio MLD. Después de incubar durante 24 horas a 30 °C, se agregaron sobre las colonias unas gotas de H₂O₂ al 20 %. La efervescencia del oxígeno indicaba la presencia de catalasa.

IV.9 Inducción de la producción de Xantano

Se sembró la cepa en una placa con medio 1 (Anexo 3), y se dejó crecer entre 18 – 20 horas. Una vez obtenido crecimiento, se colocó una colonia a partir del medio 1 en una fiola con 10 mL de caldo YM o medio 2 (Anexo 3), dejándose crecer de 5 a 7 horas. Posteriormente, se transfirió de 5 a 10 % del volumen de un cultivo de 100 mL de medio de inducción o medio 3 (Anexo 3), en una fiola de 250 mL. Se dejó crecer a 28 °C con agitación de 180 rpm por 48 horas. Posteriormente, se centrifugó el cultivo a 12000 rpm por 30 minutos a 4 °C. Al sobrenadante se le adicionó etanol en una relación 1:4 (v/v) y se dejó toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se centrifugó la mezcla a 10.000 rpm por 30 minutos a 4 °C para recuperar el precipitado. Al mismo, se le realizó un lavado con 100 mL de agua y se calentó a 60°C por 30 minutos. Seguidamente, se agregó etanol en la misma relación 1:4 y se volvió a centrifugar. Finalmente se recuperó el precipitado y se dejó secar en la estufa a 40-45 °C toda

la noche (Borges, *et al.* 2007) El precipitado obtenido se estudiò a traves de espectro infrarrojo.

IV.10. Metodología del espectro infrarrojo

El Espectro infrarrojo se llevó a cabo siguiendo el protocolo de la Universidad Central de Venezuela (2003), en equipo de IR-TF perkin- Elmer RX1. Se mezcló la muestra sólida con bromuros de potasio puro (KBr) en un mortero hasta obtener un polvo fino. Una pequeña porción del polvo obtenido, se colocó en un portador de muestra para preparar pastillas empleando para ello una prensa. La pastilla, que debe ser homogénea, se colocó en una placa para muestras, evitando en lo posible la contaminación de la muestra.

Una vez que la muestra se preparó y se colocó apropiadamente en su porta muestras, se insertó en el espectrómetro. El espectro de la muestra se corrió bajo diferentes condiciones hasta la obtención del mejor espectro, en lo posible con bandas finas e intensas. Una vez obtenido el espectro óptimo para la muestra fue necesario calibrar la escala del espectro en el papel (número de onda).

Para calibrar la escala del espectro, se retiró la muestra del espectrómetro y se colocó en su lugar la lámina de poliestireno, sobre el mismo papel en donde se obtuvo el espectro óptimo de la muestra y bajo las mismas condiciones instrumentales; seguidamente se corrió el espectro correspondiente del poliestireno. Esta operación se realizó para cada espectro final por muestra analizada.

V. RESULTADOS

V.1 Ubicación taxonómica de la cepa en estudio

La ubicación taxonómica preliminar se realizó con el fin de escoger una batería bioquímica que condujera hacia la identificación de la cepa en estudio.

En primer lugar, el estudio micromorfológico se llevó a cabo mediante la observación directa al microscopio, en donde se evaluó la forma de la célula y su motilidad. De igual manera se aplicó la técnica de coloración del Gram, con el objetivo de conocer la naturaleza química de la pared celular, encontrándose que la cepa M2044 tiene forma de bacilo, de motilidad positiva y tinción de Gram negativa (Tabla 2).

Por otro lado, se realizó el análisis macromorfológico de la cepa en estudio, sembrada en medio BHI. Se determinaron las características de las colonias, resultando en una colonia de extensión abundante, forma puntiforme, 1 mm de tamaño, elevada, de bordes enteros, densidad opaca, consistencia viscosa y color amarillo claro (Tabla 2).

Tabla 2. Características micro y macromorfológicas de la cepa M2044 en medio MLD.

Característica	M2044
Estudio Micromorfológico	
Forma	Bacilo
Motilidad	Positiva
Tinción de gram	Negativa
Estudio Macromorfológico	
Extensión	Abundante
Forma	Puntiforme
Tamaño	1mm
Elevación	Elevada
Bordes	Enteros
Densidad	Opaca
Consistencia	Viscosa
Color	Amarillo claro

V.2 Pruebas bioquímicas preliminares

La cepa M2044 se sometió a una batería de pruebas bioquímicas (oxidasa, KIA, LIA, citrato, MIO, Indol-Motilidad y úrea) con el objetivo de realizar una ubicación taxonómica preliminar, permitiendo además determinar el tipo de galería API que se debía utilizar para la identificación taxonómica por medio de técnicas microbiológicas. Los resultados se resumen en la Tabla 3. La cepa M2044 resultó ser negativa para todas las pruebas preliminares ensayadas.

Tabla 3. Resultado de pruebas bioquímicas preliminares.

Cepa	Oxidasa	KIA	LIA	Citrato	M	I	O	I/M	Urea
M2044	Negativo	K/K/-/-	K/K/-/-	Negativo	-	-	-	-/-	-

V.3 Identificación microbiológica (Pruebas API20NE)

Luego de realizar una ubicación taxonómica preliminar, se procedió a escoger la galería API para bacilos Gram negativos no pertenecientes a la familia *Enterobacteraceae*, es decir Galería API 20NE, la cual permitió realizar la identificación a nivel de género y especie. De acuerdo a los resultados obtenidos con la galería API 20NE, la cepa M2044 logró ser identificada como *Xanthomonas campestris*, con un alto porcentaje de confiabilidad de 90,4 % (Tabla 4).

Tabla 4. Identificación microbiológica de la cepa M2044 por medio de la Galería API 20NE.

Muestra	Código API	Identificación bacteriana	Porcentaje de confiabilidad	Concordancia con el manual de Berguey`s
M2044	2671205	<i>Xanthomonas campestris</i>	90,4%	24/26

V.4 Identificación por medio de PCR, mediante la comparación del gen *ADNr 16S*

La identificación molecular fue realizada mediante la comparación de las secuencias de ADN que codifica para el ARNr16S de la cepa M2044 obtenida por medio de amplificación por PCR utilizando los cebadores universales 27F y 1492R, con las secuencias pertenecientes a las bases de datos del GeneBank, utilizando el programa bioinformático BLASTn. La calidad y tamaño de la muestra amplificada se visualizó a través del uso de geles de agarosa al 1 %, con buffer TBE 0,5X a 100V. En la Figura 3 se puede observar el amplificado de 1500 pb correspondiente a un fragmento del gen *ADNr 16S* de la cepa M2044, así como su calidad y purificación mediante la observación de una única banda obtenida en la muestra.

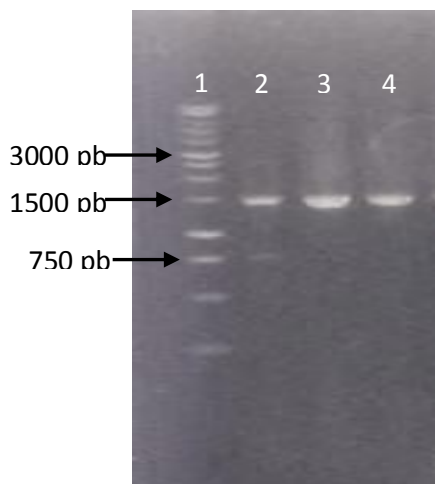


Figura 4. Amplificación por PCR y purificación por precipitación con sales de un fragmento del gen *ADNr 16S* que codifica para ARNr 16S de la cepa aislada M2044. 1. 1 Kb DNA Ladder (Promega); 2. Control positivo; 3. Cepa M2044; 4. Cepa M2059.

Una vez obtenido y purificado el amplificado, se realizó la secuenciación del mismo, y dichos resultados se utilizaron para realizar un análisis comparativo de las secuencias de nucleótidos del gen que codifica para el *ARNr 16S*. Estos resultados se pueden apreciar en la Tabla 5, en la cual se resume el porcentaje de identidad con respecto a las especies más cercanas filogenéticamente para la cepa M2044. Se puede observar que la cepa estudiada M2044 fue identificada como *Xanthomonas campestris*, con un porcentaje de identidad del 95 %, existiendo una excelente concordancia con la identificación microbiológica realizada previamente.

Tabla 5. Análisis comparativo de la secuencia nucleotídica del gen *ADNr 16S* de *Xanthomonas campestris* M2044.

Cepa	Longitud del amplificado	Especies más cercanas filogenéticamente		
		Especie (cepa)	Nº de acceso	Porcentaje de identidad
M2044	1000 pb	<i>Xanthomonas campestris</i> cepa IR-Isfahan (B)	KF964554	95%

V.5 Caracterización fisiológica de *Xanthomonas campestris* M2044

V.5.1 Estudio preliminar de la resistencia de antibióticos

Se llevó a cabo un estudio preliminar de la resistencia a antibióticos, usando antibióticos comerciales preparados a diferentes concentraciones. Los resultados se presentan en la Tabla 6. Los resultados de este ensayo demuestran que la cepa *X. campestris* 2044 presenta resistencia a 11 antibióticos, algunos en una concentración mínima de 50 µg/mL. Se puede observar que para los antibióticos amoxicilina, cloranfenicol, ampicilina, cefalotina, kanamicina y ceftriaxona se presentó resistencia a todas las concentraciones ensayadas en este trabajo (6 antibióticos). Mientras que para los antibióticos amoxicilina/Ac. Clavulánico,

gentamicina, ceftazidima, cefotaxima y cefadroxilo (5 antibióticos) se necesitan concentraciones superiores a 50 µg/mL para inhibir el crecimiento de la bacteria. Por otro lado, la cepa M2044 resultó ser sensible a los antibióticos ciprofloxacina, levofloxacina y claritromicina (Tabla 6). En líneas generales, se observa un comportamiento resistente de la bacteria frente a 11 de los antibióticos estudiados.

Tabla 6. Resultados del estudio de la resistencia a antibióticos de la cepa M2044.

Antibióticos	Concentración ug/mL	<i>X. campestris M2044</i>	Antibiótico	Concentración ug/mL	<i>X. campestris M2044</i>
Amoxicilina/Ac. Clavulánico	25	R	Ampicilina	25	R
	50	R		50	R
	100	R		100	R
	200	S		200	R
Amoxicilina	25	R	Cefalotina	25	R
	50	R		50	R
	100	R		100	R
	200	R		200	R
Gentamicina	25	R	Kanamicina	25	R
	50	R		50	R
	100	R		100	R
	200	S		200	R
Ceftazidima	25	R	Ceftriaxona	25	R
	50	R		50	R
	100	S		100	R
	200	S		200	R
Ciprofloxacina	25	S	Levofloxacina	25	S
	50	S		50	S
	100	S		100	S
	200	S		200	S
Cefotaxima	25	R	Claritromicina	25	S
	50	R		50	S
	100	S		100	S
	200	S		200	S
Cloranfenicol	25	R	Cefadroxilo	25	R
	50	R		50	R
	100	R		100	R
	200	R		200	S

R: resistente S: susceptible

V.5.2 Resistencia a diferentes concentraciones de metales pesados

Se determinó la capacidad de crecimiento de *X. campestris* M2044 en medio MLD suplementado con diferentes metales pesados, estudiando la extensión y crecimiento de la cepa en los diferentes cuadrantes de la placa de Petri. En los resultados que se muestran en la Tabla 7, se puede evidenciar que la cepa *X. campestris* M2044 presentó resistencia a 5 metales en al menos una concentración mínima de 4 mM (níquel, cobre, bario, cinc y litio); mientras que fue sensible a 1 mM de manganeso, pero resistente a las demás concentraciones ensayadas de este metal. Por otra parte, se encontró sensibilidad a todas las concentraciones ensayadas en 4 de los metales estudiados (cloruro de mercurio, cloruro de estaño, nitrato de plata y cloruro de hierro). Interesantemente, la cepa *X. campestris* M2044 es resistente a metales asociados a toxicidad y componentes principales de los plaguicidas, como lo son el litio y el bario, respectivamente.

Tabla 7. Evaluación de la resistencia a metales pesados de *X. campestris* M2044 en medio MLD.

Metal	Concentración (mM)	Cepa M2044	Metal	Concentración (mM)	Cepa M2044
Sulfato de Níquel II	1	R	Cloruro de hierro III	1	S
	2	R		2	S
	3	R		3	S
	4	R		4	S
	5	R		5	S
Cloruro de Mercurio II	1	S	Cloruro de bario	1	R
	2	S		2	R
	3	S		3	R
	4	S		4	R
	5	S		5	R
Sulfato de cobre II	1	R	Acetato de cinc	1	R
	2	R		2	R
	3	R		3	R
	4	R		4	R
	5	S		5	R
Cloruro de estaño II	1	S	Hidróxido de litio	1	R
	2	S		2	R
	3	S		3	R
	4	S		4	R
	5	S		5	R
Nitrato de plata	1	S	Carbonato de manganeso II	1	R
	2	S		2	S
	3	S		3	S
	4	S		4	S
	5	S		5	S

V.5.3 Crecimiento en diferentes fuentes de carbono

Se evaluó la capacidad de crecimiento de *X. campestris* 2044 en medio YDC suplementado con diferentes fuentes de carbono, observándose su crecimiento y extensión en todos los cuadrantes de las placas de Petri preparadas para el ensayo. Los resultados se muestran en la Tabla 8. Se observa que la lactosa, dextrosa y fructosa son azúcares que favorecen mayormente el crecimiento de *X. campestris* M2044. En menor medida, se observó que la glucosa, galactosa, sacarosa, xilosa y maltosa pueden representar fuentes de carbono óptimas para el crecimiento de esta cepa. La arabinosa fue el azúcar que presentó el menor crecimiento de esta cepa (Tabla 8).

Tabla 8. Crecimiento de *X. campestris* M2044 en presencia de diferentes fuentes de carbono en medio YDC.

Fuente de carbono (0,2 gr/mL)	<i>X. campestris</i> M2044
Glucosa	++
Galactosa	++
Sacarosa	++
Arabinosa	+
Xilosa	++
Fructosa	+++
Lactosa	++++
Maltosa	++
Dextrosa	++++

Crecimiento: Escaso: + Moderado: ++ Abundante: +++ y ++++

V.5.4 Producción de exoproteínas por parte de *X. campestris* M2044

Con la finalidad de evaluar la producción y excreción de enzimas al medio, se determinó la presencia de proteasas, amilasas, β -galactosidasa y catalasa por parte de la cepa

en estudio; los resultados se presentan en la Tabla 9. La cepa M2044 de *X. campestris* es productora de proteasas, β -galactosidasa y catalasa, más no de amilasa, lo que le confiere un gran potencial desde el punto de vista biotecnológico.

Tabla 9. Producción de exoproteínas por parte de *X. campestris* M2044.

Cepas	Proteasas	Amilasas	B- galactosidasa	Catalasa
<i>X. Campestris 2044</i>	++	-	+	+

Producción: Escaso: + Moderado: ++ Abundante: +++ y ++++

V.6 Inducción de la producción de xantano en *Xanthomonas campestris* M2044

La producción de xantano se indujo por medio del crecimiento de la cepa en el Medio 1 (Anexo 3), con un rendimiento de 43 mg por cada 100 mL de cultivo. El polvo amarillento obtenido por los medios de inducción de xantano fue evaluado por medio de espectroscopia infrarroja, a fin de determinar la presencia o no de xantano producido por *X. campestris* M2044, debido a que esta técnica tiene su aplicación más inmediata en el análisis cualitativo para la detección de las moléculas presentes en cualquier material. La técnica del espectro infrarrojo permite la absorción de bandas características de ciertos grupos funcionales.

La sustancia obtenida en el método de inducción de xantano fue sometida a espectroscopia infrarroja, obteniéndose el resultado mostrado en la Figura 4, en la que se observa un espectro infrarrojo medio, con bandas a longitudes de onda alrededor de 3400 y 2900 nm, correspondientes a grupos hidroxilo y grupos metileno (-CH₂), respectivamente. De igual manera se observaron bandas de aproximadamente 1700 y 1200 nm, en cuyas zonas de absorción se aprecian los grupos carboxilos y los grupos carbonilos. Finalmente, se observan bandas de absorción entre 600 a 800 nm, las cuales corresponden a la llamada zona de huella dactilar específica de la materia, siendo reconocida en el xantano particularmente un valor característico la absorción a 891 nm, correspondiente a grupos glucopiranósicos con enlaces de tipo β (Aguilar *et al.*, 2005).

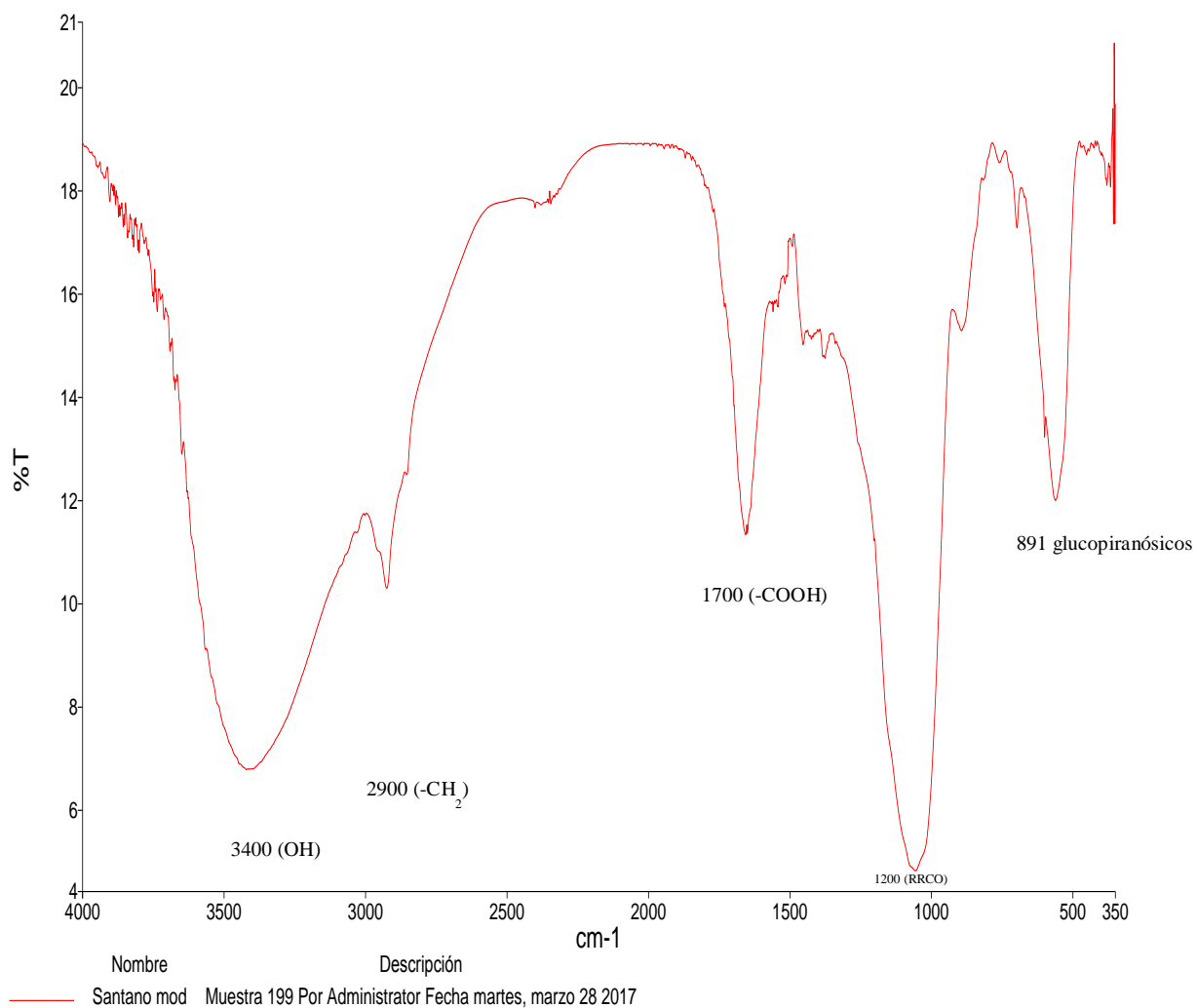


Figura 5. Espectro infrarrojo del polímero obtenido en la inducción del xantano para *Xanthomonas campestris* M2044.

VI. DISCUSIÓN

VI.1 Identificación de la cepa M2044

La cepa estudiada formó parte de un aislado obtenido del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM), del Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV). El CVCM informó que la cepa provenía del Laboratorio de Micología (antiguo Laboratorio de Micología y Fermentación) del IVIC, y fue aislada a partir de *Brassica oleracea*. El desarrollo de nuestros objetivos principales se basó en la caracterización de una bacteria de la especie *Xanthomonas campestris* y la producción de biopolímeros como el xantano en la misma, con la visión del desarrollo biotecnológico y económico del país.

El estudio de caracterización comenzó con un estudio macromorfológico, en el cual se evidenció que la cepa M2044 posee forma puntiforme, tamaño de 1 mm, elevaciones convexas, bordes enteros, densidad opaca, consistencia viscosa y color amarillo claro (Tabla 2). Seguido a ello, se realizó un análisis microscópico que permitió observar la forma, movilidad y naturaleza de la pared celular. En el mismo se pudo determinar a través de la observación directa al microscopio, que es una bacteria móvil, en forma de bacilo y tinción de Gram negativa.

Estos resultados llevaron a realizar una caracterización bioquímica preliminar que permitiera una identificación del grupo Gram negativo al cual pertenecía la cepa bacteriana. Para ello se seleccionaron un conjunto de pruebas para la identificación de microorganismos (Holt *et al.*, 2000). Estos resultados se observan en la Tabla 3, en la cual se indica, en principio, que la bacteria M2044 es oxidasa negativo, es decir, que no posee la enzima citocromo oxidasa, por lo tanto no puede utilizar el oxígeno en la cadena de transporte de electrones. El agar Kligler se empleó con la finalidad de determinar la capacidad de la cepa M2044 de fermentar la glucosa y lactosa, producción de gas y producción de H₂S, resultando ser una bacteria no fermentadora de ninguno de estos dos hidratos de carbono, así como

también presenta incapacidad para producir gas y H₂S. Asimismo, el medio Lisina-Hierro-Agar permitió estudiar la desaminación-descarboxilación de la lisina, la producción de gas y H₂S, resultando ser una bacteria que no lleva a cabo la desaminación pero si la descarboxilación, sin producción de gas y H₂S, coincidiendo la prueba anterior. De igual manera, con la finalidad de reconocer si las bacterias son poseedoras de la enzima citrato permeasa, y evaluar la capacidad de utilizar el citrato como única fuente de carbono, se llevó a cabo la prueba de Citrato de Simmons, en la cual se observó que la cepa en estudio no utiliza el citrato como fuente de carbono. Por otro lado, en el medio MIO se evidenciaron resultados negativos en las capacidades evaluadas para la cepa M2044, de acuerdo a motilidad, producción de indol y descarboxilación de la ornitina. En este medio se observó que la cepa analizada no posee la enzima triptofanasa, por lo tanto no es capaz de degradar el triptófano hasta indol, reflejando esta prueba como negativa, además se obtuvo que la bacteria no posee la enzima ornitina decarboxilasa. Con respecto a la motilidad, el resultado fue negativo para la misma en este medio. Finalmente, mediante la prueba de la hidrólisis de la urea, se pudo determinar que la bacteria M2044 no posee la enzima ureasa.

Los resultados preliminares observados con la cepa M2044 coinciden en otros estudios, tal como el realizado por Guevara y Maselli (1999) quienes tomaron muestras de plantas de arroz (*Oryza sativa*) provenientes de Calabozo, Estado Guárico (Venezuela). Obtuvieron una bacteria que formó colonias bacterianas de color amarillo claro, crecimiento mucoide en el medio YDC, forma de bastón, Gram negativa, estrictamente aeróbica, oxidasa negativa e indol negativo. Mediante estas y otro grupo de pruebas bioquímicas y fisiológicas, determinaron que la bacteria pertenecía a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. De igual manera, Rodríguez *et al.* (2002), tomaron muestras de raíces de zanahoria presentando algunas áreas podridas, en diferentes comercios de frutas y hortalizas de los Estados Aragua y Miranda de Venezuela, logrando identificar una bacteria cuyas colonias eran de color amarillo, mucoide, brillante, elevada y de bordes redondeados; en la observación al microscopio la bacteria exhibió forma de bastón (1,62-2,15 x 0,51-0,66 µm) con un flagelo polar. En cuanto a las características fisiológicas y bioquímicas, resultó ser aerobica estricta, catalasa positiva, y fue capaz de producir gas usando como fuentes de carbono arabinosa, glucosa, manosa, sacarosa y

dextrosa. Su identificación final consistió en ser una bacteria perteneciente al género *Xanthomonas*.

Cada uno de los resultados obtenidos para las pruebas bioquímicas de la cepa M2044 permitió deducir que la bacteria no pertenece a la familia *Enterobacteraceae*, sino a la familia *Xanthomonadaceae*, resultado que se confirma con la comparación de los resultados obtenidos en este trabajo con lo reportado en el Manual de Bergey's (Holt *et al.*, 2000). Según lo antes expuesto, la prueba API correspondiente para su exhaustiva identificación microbiológica fue la API20NE, la cual permitiría la determinación de la especie. De acuerdo a los resultados obtenidos con esta galería, la cepa M2044 logró ser identificada como *Xanthomonas campestris*, con un porcentaje de confiabilidad de 90,4 %, verificando todos los hallazgos encontrados anteriormente (Tabla 4).

Los métodos de identificación fenotípica pueden indicar con un elevado porcentaje, cuál es el género y/o especie a la que la bacteria en estudio tiene mayor probabilidad de pertenecer. Es primordial la identificación fenotípica en la caracterización de una cepa, sin embargo, dado las desventajas inherentes que presentan estos sistemas (no todas las cepas de una misma especie muestran características homogéneas, una cepa puede generar diferentes patrones en ensayos repetidos y también las limitaciones en las bases de datos, entre otros), los métodos moleculares han emergido como procedimientos complementarios y definitivos o incluso de referencia de los fenotípicos (Fernández, *et al.* 2010). Es por ello que se incrementa la importancia de realizar una identificación molecular, que permita complementar genotípicamente el estudio de la cepa bacteriana. Mediante la comparación de la secuencia del gen que codifica para el ADNr 16S, se logró determinar que la cepa M2044 fue identificada como *Xanthomonas campestris*, con un porcentaje de identidad del 95 % (Tabla5), existiendo una excelente concordancia con la identificación bioquímica preliminar (Tablas 2 y 3) y microbiológica realizadas previamente (Tabla 4).

Se han utilizado estudios de las secuencias del ADN ribosómico para inferir la historia filogenética, desde estudios entre los linajes de la vida hasta relaciones estrechas entre especies y poblaciones. Las razones de la versatilidad sistémica del ADNr incluyen las numerosas tasas de evolución en las diferentes regiones del ADNr, la presencia de muchas

copias de secuencias de ADNr en el genoma, y el patrón de evolución que ocurre entre copias repetidas. Estas características facilitan el análisis de ADNr directo por secuenciación del ARN, secuenciación del ADN (bien sea por clonación o por amplificación) y metodologías con enzimas de restricción. El *ADNr 16S* ha sido alineado y comparado en un gran número de organismos vivos, y este enfoque ha brindado una extensa riqueza de información filogenética. Las razones de la versatilidad sistemática del ADNr incluyen las numerosas tasas de evolución entre diferentes regiones del mismo (Hillis *et al.* 1991). El ARNr Es un polirribonucleótido codificado por el gen *ADN ribosomal 16S* incluido en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. Además, actúa como un cronómetro molecular al presentar un alto grado de conservación. Aunque el ARNr 16S constituye la diana de acción para algunos antimicrobianos, produciéndose mutaciones que conducen a la resistencia fenotípica, no se invalida la utilización del ARNr 16S para la identificación bacteriana o la asignación de género y especie. La secuencia del gen que codifica para el ARNr 16S presenta una forma aproximada de 1.500 pb. Este tamaño proporciona suficiente polimorfismo inter-específico para diferenciar y establecer medidas estadísticas válidas (Boua *et al.* 2011).

Cubero *et al.* (2002), estudiaron la relación genética mediante la comparación del ADNr 16S entre varias cepas distribuidas a los largo del mundo de *Xanthomonas*, causantes de la enfermedad del cancro en las plantas, diseñando una serie de nuevos cebadores para su identificación por PCR. En el grupo de estudio se encontraban tres *X. axonopodis pv. citri* (una cepa perteneciente a cada uno de los tres genotipos actualmente encontrados en Florida [cepas LW, MI y MA]); dos cepas de *X. axonopodis pv. aurantifolii* (una cepa del tipo B de Argentina [cepa X84] y una cepa del tipo C de Brasil [cepa X341]); y una cepa de *X. axonopodis pv. citrumelo* aislada en la Florida (cepa F1). Posteriormente, se alinearon y se compararon las secuencias con aquellas disponibles en la base de datos GenBank para *X. axonopodis pv. vesicatoria*, *Xanthomonas campestris pv. campestris*, y *Xanthomonas gardneri*. Los resultados del análisis de secuencias parciales de ADNr revelaron altos niveles de similitud entre las cepas de *Xanthomonas* estudiadas, siendo el nivel medio de similitud de secuencia de 99,3 %.

Asimismo, el trabajo realizado por Moya *et al.* (2015) utilizó como sujeto de estudio la bacteria *Xanthomonas campestris pv. campestris*, causante de manchas foliares del filodendro (*Philodendron scandens* subsp. *oxycardium*). Este estudio consistió en el aislamiento

de la cepa a partir de tejido enfermo de la planta, del cual se obtuvieron colonias de color amarillo, Gram negativas, aeróbicas y de consistencia mucoide. La identificación la llevaron a cabo mediante pruebas fisiológicas, bioquímicas y por la secuenciación del fragmento del gen *ADNr 16S*, de esta manera el agente causal de la necrosis foliar del filodendro fue identificado como *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* con 99,6% de identidad en la comparación de las secuencias del *ADNr 16S*.

VI.2. Caracterización fisiológica de la cepa M2044

VI.2.1 Estudios de resistencia

Una parte importante de la fisiología de la bacteria es la capacidad de presentar resistencia a algunos componentes, sobre todo si son de ambientes libres. En este trabajo se realizó una caracterización a nivel de resistencia a antibióticos (Tabla 6) y a metales pesados (Tabla 7) de la cepa M2044 de *Xanthomonas campestris*.

VI.2.1.1 Resistencia de antibióticos

En lo que se refiere a la resistencia a antibióticos, se encontró que *X. campestris* M2044, fue resistente a 11 de los 14 antibióticos ensayados en este estudio, lo que representa un 78.6 % de efectividad. Sin embargo, la cepa presentó sensibilidad a levofloxacin, claritromicina y ciprofloxacina en un 100% en todas las concentraciones ensayadas (1-5 mM), lo que permitiría usar estos antibióticos como mecanismo de control de patógenos de plantas para esta especie. Es importante destacar que es la primera vez que se reporta este tipo de resistencia en *X. campestris*, y resulta muy interesante que una cepa aislada de un ambiente natural presente resistencia a tantos antibióticos al mismo tiempo. Algunos investigadores se han enfocado en esta característica de algunas cepas bacterianas, y han surgido trabajos que explican el por qué existe una resistencia tan marcada de antibióticos, en especial en bacterias ambientales.

Los antibióticos son componentes muy valiosos para combatir las enfermedades en los humanos, pero desafortunadamente las bacterias patógenas han evolucionado hacia la resistencia. Algunos aspectos significativos y con frecuencia olvidados de los antibióticos y sus genes de resistencia, es que se desarrollaron en entornos no clínicos (naturales) antes de su uso por los seres humanos. Dado que la biósfera está formada principalmente por microorganismos, aprendieron el papel funcional de la resistencia, lo que tiene implicaciones directas en la salud humana y en el ecosistema natural. Algunos trabajos han sugerido que los antibióticos en los ambientes naturales ejercen su efecto probablemente en bajas concentraciones, así algunos genes de resistencia fueron originalmente seleccionados en su hospedador para metabolismos específicos, no solo en la inhibición del crecimiento bacteriano, sino también como moléculas de señalización en el ecosistema natural y señales de tráfico de metabolismo enzimático. Sin embargo, las altas concentraciones de antibióticos liberadas en diversos hábitats (por ejemplo, lugares clínicos) pudieron cambiar aquellos roles funcionales iniciales (Martínez, 2009; Martínez *et al.* 2009).

La resistencia a antibióticos puede ser desarrollada por mutación o adquirida de determinantes de resistencia por medio de la transferencia horizontal de genes. La contaminación de los ecosistemas naturales por los antibióticos, puede tener consecuencias para la evolución de la microbiósfera, generando cambios en la comunidad microbiana a través de transferencia de estos genes, teniendo consecuencias en la salud y en el ambiente de las microbiotas que tanto ha sido ignorado (Martínez, 2009; Martínez *et al.* 2009).

El origen de los genes asociados a esta resistencia es de importancia significativa para la comprensión de la evolución, sin embargo, el papel del uso antropogénico de antibióticos en la aparición de estos genes es controversial. Bhullar *et al.* (2011) aislaron microbiomas de la Cueva Lechuguilla- Nuevo México, ubicada en una región que tiene aislada más de 4 millones de años. Los investigadores informaron que estas bacterias eran altamente resistentes a antibióticos, algunas cepas fueron resistentes a 14 antibióticos diferentes comercialmente disponibles y fue detectada en una gama de antibióticos estructuralmente diferentes, incluyendo daptomicina, utilizado como último recurso en el tratamiento de patógenos Gram-positivos resistentes. Además, la secuenciación del genoma de una de las

bacterias resistentes identificó un gen que codifica para una macrólido-quinasa, y la caracterización de su producto reveló que se relaciona con una familia conocida de quinazinas que circulan en modernos patógenos resistentes a los fármacos. Las implicaciones de este estudio fueron muy significativas ya que estos hallazgos apoyan una creciente comprensión de que la resistencia a los antibióticos es natural, antigua y del pangenoma microbiano.

La mayoría de los antimicrobianos actualmente en uso son producidos por microorganismos medioambientales o son derivados de antibióticos naturales. Antes del uso de antibióticos por los seres humanos, varios elementos que pueden conferir resistencia han evolucionado durante millones de años en los genomas de los microorganismos. La función original de esos genes, es netamente diferente a la que cumplen en sus nuevos hospedadores, ya que después del uso de los antibióticos, algunos genes han sido transferidos a nuevos nichos hasta convertirse en patógenos humanos en los cuales su único y totalitario papel es conferir resistencia a antibióticos. Además, la fuerte selección de antibióticos ejercida sobre estos genes de resistencia adquiridos probablemente ha impulsado su diversificación (Martínez, *et al.* 2014).

La necesidad de entender los mecanismos de resistencia de los microorganismos en los ambientes naturales, radica en comprender la evolución de estos mecanismos en actuales patógenos clínicos y los posibles cambios de un hospedador ambiental a uno humano, pues la adquisición de resistencia por parte de estos últimos, pueden comprometer no sólo el tratamiento de enfermedades infecciosas sino también la salud de toda la sociedad. Además, el conocimiento de estos mecanismos permitiría la implementación de varias prácticas clínicas que provean buenos agentes antimicrobianos.

Xanthomonas campestris M2044, cuya característica principal de su género es ser fitopatógeno, mostró una significativa resistencia a antibióticos, la misma fue aislada de *Brassica oleracea*, que representa una fuente de alimentos para el humano, considerando esta característica, es posible tomar en consideración que un cambio de hospedador por cualquier circunstancia sería un daño a la salud pública. Tal como ha sucedido con bacterias como *Escherichia coli*, quien representa uno de los ejemplos de cómo una cepa de ambiente natural

puede llegar a colonizar otro hospedador y propagar su patogenicidad a nuevas especies en nuevos ambientes.

E. coli se encuentra en diversas formas en la naturaleza, va desde cepas comensales hasta patogénicas en hospedadores humanos o animales. La especie está dividida de acuerdo a información genómica en 6 diferentes grupos filogenéticos, denominados: A, B1, B2, C, D y E. Los fenotipos en las diferentes formas de *E. coli* han sido estudiados en sus diferencias genómicas y en el patrón de expresión de genes (adherencia / colonización, invasión, secreción de compuestos tóxicos y transporte, así como la producción de sideróforos). Sin embargo, las islas genéticas parecen ser una clave para definir los diferentes tipos de comportamientos de la bacteria. Recientes estudios de secuenciación del genoma de esta bacteria han mostrado que la transferencia horizontal de genes es la responsable de la propagación de las islas genómicas, teniendo un gran impacto sobre la plasticidad de estas cepas. *E. coli* entra en el estómago humano/animal con los alimentos ingeridos y se enfrenta a un pH bajo, un caso diferente se puede observar en las condiciones de un ambiente abierto. Sin embargo, a pesar de las fluctuaciones en cuanto a concentración de las fuentes de carbono disponibles, fuentes de energía, temperaturas, variabilidad de osmolaridad, entre otros, *E. coli* conserva adaptaciones evolutivas particulares que son claves en su genoma (sistemas de importación, sideróforos, captación hierro- azufre, Transportador para absorción de aminoácidos y azúcares). Esto indica que la bacteria tiene una alta capacidad de obtener diversos nutrientes, lo que le ayuda en su supervivencia en ambientes abiertos (Van Elsas *et al.* 2011).

Fuera de su capacidad de adquirir nutrientes, algunas cepas de *E. coli* producen estructuras filamentosas que permiten su adherencia a las superficies, razón por la cual las cepas procedentes de la tierra, estiércol, agua o semillas contaminadas pueden colonizar diferentes tipos de plantas, incluidas aquellas consumibles por el ser humano, como la lechuga y el rábano. Específicamente, *E. coli* puede acceder a las raíces o a las superficies foliares durante la lluvia o el riego, colonizando compartimientos que son difíciles para lavar o desinfectar; así, a partir de estos productos consumibles, estos microorganismos pueden propagarse y difundirse en las cadenas de productos de alimentación, tomando en cuenta que

la difusión de cepas patógenas representan un riesgo muy alto para la salud pública (Van Elsas *et al.* 2011).

Otros estudios también han mostrado algunos mecanismos evolutivos por medio de los cuales se ejerce la resistencia a los antibióticos, especialmente en cepas del género *Xanthomonas*, cuyo interés fitopatogénico y biotecnológico es de gran importancia. Es así como Hashimi *et al.* (2007) demostraron que una cepa de *Xanthomonas albilineans* produce péptidos policéticos denominados Albicidinas. Esta potencial fitotoxina resultó ser un inhibidor de la replicación del ADN procariota. En este trabajo los autores demostraron específicamente cómo se inhibe potencialmente la actividad de superenrollamiento en el ADN bacteriano, así como la inhibición del ADN girasa, con una concentración mínima inhibitoria de 40 a 50 nM, que representan el 50 % menos de la concentración necesaria de muchas cumarinas y quinolonas. La albicidina bloquea la replicación del ADN bacteriano mediante el corte de ADN intermediario durante la secuencia catalítica de la ADN girasa. La relajación en la actividad de superenrollamiento inhibe las enzimas girasa y topoisomerasa IV. Además de estos hallazgos, los autores diseñaron una proteína llamada AlbG, proveniente de la biosíntesis de albicilina. La misma fue unida al ADN girasa de *E.coli* y el resultado fue el aumento de seis veces la resistencia al antibiótico. Este estudio fue muy importante ya que evidenció primeramente la capacidad de autoprotección de la bacteria estudiada mediante la codificación de una proteína antialbicidina, así como la demostración de que la ADN girasa es una etiqueta molecular de la albicidina. Estas características de interacción albicidin-girasa indican un potencial para el desarrollo de nuevas drogas antibacterianas.

De igual manera, García *et al.* (1991) evaluaron la susceptibilidad de 42 cepas de *Xanthomonas maltophilia* a 37 antibióticos (principalmente β -lactamasas, aminoglucósidos y quinolonas fluoradas). *X. maltophilia* fue resistente a la mayoría de los β -lactámicos, siendo la ceftazidima, entre otras, una de las más activas. Observaron que los aminoglucósidos tuvieron una actividad muy modesta, las quinolonas mostraron sólo actividad moderada contra esta especie y el trimetoprim/sulfametoxazol fue eficaz contra todas las cepas ensayadas. También probaron la sinergia de varios inhibidores de β -lactamasa contra *X. maltophilia*, en donde encontraron que sólo el aztreonam/ácido clavulánico tuvo actividad sinérgica.

Por otro lado, la resistencia se ha estudiado en otros aspectos, tales como lo demuestra el trabajo realizado por Rodríguez *et al.* (1997), en el cual se enfocaron en las influencias que podía tener la resistencia a algunos antibióticos sobre la producción del xantano. Para su desarrollo, obtuvieron mutantes resistentes a diferentes antibióticos (estreptomicina, tetraciclina, ampicilina, y penicilina) de diferentes cepas de *Xanthomonas campestris*, y posteriormente evaluaron la producción de xantano. Los autores observaron que la mayoría de los mutantes presentaron alteraciones en la producción de polisacáridos ya sea aumentando, disminuyendo o perdiendo por completo su capacidad de producción del polímero. Asimismo, encontraron diferencias en los patrones de las proteínas de membrana externa de los mutantes que fueron alteradas tanto en resistencia a antibióticos como en producción de xantano, en comparación con las cepas silvestres. Estos autores concluyeron que esos hallazgos sugerían la existencia de mecanismos de relación genética entre la resistencia a los antibióticos y la producción del biopolímero. Además, algunos mutantes obtenidos mostraron incrementos significativos en la viscosidad del inóculo y en la concentración de xantano, permitiendo a estos investigadores sugerir que la resistencia al menos a estreptomicina y ampicilina puede ser utilizada para el mejoramiento de cepas en ensayos de selección de placas para diferentes fines.

La mayoría de los antibióticos con gran eficacia In Vitro no muestran necesariamente efectos satisfactorios en el campo real. Sin embargo se ha encontrado en este estudio resistencia por parte de *Xanthomonas campestris* M2044 a un gran número de antibióticos, todos de usos comunes, lo que permitió enfatizar la importancia del desarrollo de bactericidas efectivos y un uso adecuado mediante el conocimiento de las dosis apropiadas, de esta manera será más beneficioso para el control biológico.

VI.2.1.2 Resistencia a metales pesados

En un segundo caso, se estudió la resistencia de la cepa M2044 a metales pesados, pudiéndose evidenciar que la misma presentó resistencia a níquel, cobre, bario, cinc y litio a

una concentración mínima de 4 mM; resistente a 1 mM de manganeso, sensible al resto de las concentraciones de este metal; y sensible a todas las concentraciones ensayadas de mercurio, estaño, plata e hierro. Es importante resaltar que en este trabajo se estudió por primera vez la resistencia por parte de *X. campestris* a los metales litio y bario, presentándose hacia ambos una significativa resistencia por parte de la bacteria.

Los aerosoles, en especial los que son a base de cobre, han sido utilizados extensamente para el control de especies como las pertenecientes al género *Xanthomonas*, como medidas contra enfermedades en las plantas. Behaul *et al.* (2011) exponen que el uso a largo plazo de estos bactericidas ha llevado al desarrollo de la resistencia de las bacterias hacia el cobre, en el caso de su estudio en particular sobre *X. citri*, lo que resulta una deficiencia del control de enfermedades.

Teixeira *et al.* (2008) investigaron la resistencia al cobre y su mecanismo celular en *X. axonopodis*. Pudieron determinar mediante anotaciones del genoma de la bacteria en estudio la presencia de los genes *copA* y *copB*, los cuales codificaban proteínas homólogas que inducen la resistencia al metal. Mediante un ensayo de expresión génica pudieron encontrar que estos dos genes se expresan como un operón, cuya transcripción es específicamente inducida por el cobre. Estos hallazgos son importantes ya que refuerzan el papel central que representan estos dos genes para la resistencia a este metal en bacterias del género *Xanthomonas*, además el mejor conocimiento de estos mecanismos celulares que podrán permitir nuevos blancos terapéuticos en contra de patógenos bacterianos.

Estudios en otros metales, tales como los realizados por Banjerdkij *et al.* (2003), demuestran otros comportamientos interesantes en lo que se refiere al tema de la resistencia a metales. Los investigadores se enfocaron en indagar la resistencia adaptativa del cinc inducida por el cadmio en cepas de *Xanthomonas campestris*. Siendo el cadmio y el cinc contaminantes ambientales que afectan tanto al suelo como al agua, se enfocaron en investigar la toxicidad resultante de la exposición de *X. campestris*, una bacteria del suelo y patógeno vegetal, a estos metales. El ensayo consistió en someter a *X. campestris* a un pre-tratamiento con concentraciones sub-letales de cadmio y cinc de forma separada. Los resultados de este ensayo demostraron que se indujo una protección adaptativa contra la exposición posterior a dosis letales de cadmio. Además, las células inducidas por cadmio también mostraron una

resistencia cruzada a las concentraciones letales de zinc. Inesperadamente, las células inducidas sólo por cinc, no exhibieron protección adaptativa contra las concentraciones letales de cinc o cadmio. Estos resultados fueron de gran importancia para los autores ya que sugirieron que el aumento de la resistencia a dosis letales de cadmio y cinc probablemente implicaban otros mecanismos de protección, además del flujo iónico.

Los determinantes genéticos que codifican las proteínas involucradas en los mecanismos de resistencia a metales, se encuentran generalmente localizados en el cromosoma bacteriano, en elementos móviles como plásmidos o transposones, o en ambos. En cuanto a los determinantes plasmídicos, confieren resistencia a metales y poseen una gran especificidad y constituye un sistema inducible en la mayoría de los casos. Se han descrito genes de resistencia a plata, arsénico, cadmio, cobre, mercurio, níquel, plomo, cinc, entre otros, localizados en plásmidos y en algunos casos estos se encuentran presentes en forma de megaplásmidos. Este hallazgo es muy importante ya que los plásmidos generalmente confieren resistencia a altas concentraciones del metal y pueden moverse fácilmente de una célula a otra por transferencia horizontal, de modo que contribuyen considerablemente a la adaptación de las comunidades microbianas en ambientes contaminados (Marrero *et al.* 2010).

En lo que se refiere a la resistencia a cobre en el género *Xanthomonas*, los genes de resistencia se han encontrado tanto en plásmidos como en el cromosoma. Por ejemplo, Basim *et al.* (2005) caracterizaron los genes de resistencia a cobre en la cepa XvP26 de *X. campestris* pv. *vesicatoria* aislada originalmente a partir de plantas de pimentón de Taiwan, localizados en la región de 7.652 pb del cromosoma bacteriano. Mientras que Voloudakis *et al.* (2005), identificaron la presencia de genes de resistencia a cobre en *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, presentes en plásmidos y relacionados con los operones *cop* y *pco* de *Pseudomonas syringae* y *Escherichia coli*, respectivamente. Además, Behlau *et al.* (2011), compararon los genes de resistencia a cobre de *X. citri* subsp. *citri* de Argentina y *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* de Florida, con 12 especies de *Xanthomonas* de diferentes ubicaciones geográficas, llegando a la conclusión de que los plásmidos que portan los genes de resistencia a cobre han sido transferidos horizontalmente, sufriendo mutaciones dependientes de la presión selectiva propia de cada ubicación geográfica. Aunque la alta homología existente en los genes de resistencia a cobre (CuR) entre las especies de *Xanthomonas* podría sugerir un origen común, las pequeñas

diferencias en las secuencias de nucleótidos indican que los genes CuR han sido intercambiados independientemente entre especies de *Xanthomonas* a los largo del mundo.

Dado a que *Xanthomonas campestris* se encuentra en ambientes naturales, posiblemente en suelos contaminados y en exposición frecuente a aerosoles con bases de algunos metales pesados, es posible que esto haya permitido desarrollar mecanismos de resistencia que hasta ahora en esta cepa en estudio eran desconocidos.

VI.2.2. Crecimiento en diferentes fuentes de carbono

Se pudo observar que la lactosa, dextrosa y fructosa fueron los azúcares que favorecieron mayormente el crecimiento de *X. campestris* M2044. En menor medida, se observa que la glucosa, galactosa, sacarosa, xilosa y maltosa pueden representar fuentes de carbono óptimas para el crecimiento de esta cepa. La arabinosa es el azúcar en que se observa el menor crecimiento de esta cepa (Tabla 8).

Janas *et al.* (2007), realizaron un estudio de la influencia de las diferentes fuentes de carbono y nitrógeno en la producción de goma xantano y enzimas extracelulares en *Xanthomonas campestris*. Esta investigación aportó que las mejores fuentes de carbono para la producción de xantano fueron maltodextrina, sucrosa, glucosa, maltosa e inulina. De igual manera lo mencionan Souw *et al.* (1979), en el estudio nutricional de *Xanthomonas campestris* NRRL B1459 en la producción de xantano, logrando determinar que con un 4 % de sacarosa o glucosa en el medio se obtienen altos títulos de producción de xantano.

Asimismo, Bhatia *et al.* en el 2015, de cuatro fuentes de carbono comercialmente disponibles para la producción de goma de xantano, encontraron que la maltosa demostró ser la mejor fuente para la generación del producto. En cuanto a la glucosa, la cepa de *Xanthomonas* mostró una buena producción de biomasa en comparación con la maltosa, pero la producción de goma de xantano fue baja. Para complementar el estudio, los autores, tomando de base que el almidón es la segunda fuente de carbono más abundante en la naturaleza y puede ser esterificado en maltosa mediante la fermentación bacteriana, usaron a

Bacillus sp. y *Xanthomonas sp.* separadamente para la sacarificación del extracto de almidón de patata y así liberar el azúcar reductor. Pudieron obtener que *Bacillus sp.* liberó 30,2 g /L de azúcar reductor en 48 h, mientras que *Xanthomonas sp.* liberó 14,5 g/L después de 72 h. Este trabajo mostró la importancia del proceso escalonado para la producción de goma de xantano, ya que el almidón es una fuente de carbono de bajo costo, y la sacarificación es un método que facilitaría el acceso a la misma.

Por otra parte, Zhang *et al.* (2010), basaron su trabajo en la características estructurales del xantano producido por *X. campestris* con fuentes de carbono mixtas de glucosa/xilosa. Los autores determinaron que la glucosa es la fuente preferencial de carbono entre ambas, y es quien permite la mayor producción de xantano, caso contrario a lo observado con sólo xilosa, que aunque fue consumida después de agotarse la glucosa, no fue eficiente la producción de xantano.

Para *Xanthomonas campestris M2044*, haber tenido un crecimiento óptimo en algunas de las fuentes de carbono mencionadas en los trabajos anteriores y que están relacionadas con una mejor producción de goma xantano, le da características comerciales importantes que pueden ser relevantes en el ámbito biotecnológico.

VI.2.3. Producción de exoproteínas

Durante el proceso de caracterización fisiológica, se determinaron algunas exoproteínas en la cepa M2044 de *X. campestris*, cuyos resultados arrojaron que la misma es productora de proteasas, β -galactosidasa y catalasa, más no de amilasa. La biotecnología experimentó grandes avances y paralelamente sus aplicaciones industriales en la obtención de productos químicos, en la industria alimentaria y farmacéutica, entre otras. Hoy en día, los procesos catalizados por enzimas en la industria son más numerosos, ya que presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos, tales como: gran actividad catalítica; muestran una gran especificidad de sustrato; son muy activos a temperatura ambiente y presión atmosférica (Arroyo, 1998). Con estas claras ventajas, la

presencia de enzimas que son representativas de procesos biotecnológicos como la β -galactosidasa, proteasas y catalasa, le confieren a la *X. campestris* M2044 un gran potencial desde el punto de vista biotecnológico.

Las proteasas son de gran interés ya que pueden ser explotadas en una gran diversidad de procesos biotecnológicos como, por ejemplo, en la industria alimentaria, donde estas enzimas junto con las lipasas pueden acelerar la maduración de quesos o incluso pueden ser utilizadas para ablandar carnes; de igual forma, estas enzimas puede ser empleadas en la biorremediación, ya que exhiben una amplia gama de sustratos (Joshi *et al.*, 2013). Sin embargo en *X. campestris* la patogenicidad y virulencia tienen un rol muy importante en la presencia de las proteasas. Así lo expresan Kay *et al.* (2009), quienes demuestran cómo *X. campestris* *pv. vesicatoria* y otras bacterias Gram negativas, dependen de un sistema conservado de secreción tipo III (T3S). Diversos estudios en estos sistemas han revelado efectos importantes en la interacción planta- *Xanthomonas*, además que en las mismas se expresa una única clase de efectores tipo III como otras posibles estrategias. La mayoría de los efectores Tipo III son traslocados directamente a la célula de la planta, pero se desconoce la función.

La proteasa SUMO (small ubiquitin-like modifier), es una proteína que corresponde a *X. campestris* *pv. vesicatoria*. Se conoce como un efector que promueve el crecimiento bacteriano en tomate y retrasa la necrosis de los tejidos presumiblemente para poder crecer en la planta. Esta proteasa se une covalentemente a proteínas eucariotas y las estabiliza. En las plantas está presente y, de forma natural, regula procesos de estrés, defensa contra patógenos e inducción de floración. Además, esta proteasa contiene un dominio N-terminal hélice-loop-hélice para unirse al ADN, y dos motivos de represión anfifílicos, quienes están implicados en la represión génica y el remodelado de la cromatina. Estudios de mutantes para la proteasa SUMO, revelaron que contribuye en la virulencia. También se ha propuesto la función para esta familia, tanto en patógenos de plantas como de mamíferos, que la proteína codificada contiene una triada catalítica putativa (histidina, ácido glutámico y cisteína) que es reconocida por parte de los genes de resistencia (Kay *et al.*, 2009).

El principal uso de la catalasa en la industria textil es descomponer en oxígeno y agua el peróxido de hidrogeno residual del proceso de blanqueamiento de las fibras. El peróxido de

hidrógeno debe ser removido para que después las fibras puedan ser teñidas. Esta enzima está presente en organismos vivos y su empleo disminuye consumo de energía, agua y de otros productos químicos. Sin embargo, en cepas de *Xanthomonas*, la catalasa tiene un efecto protector contra concentraciones letales de electrolitos. Así lo demuestra el trabajo realizado por Vattanaviboon *et al.* (2001), quienes probaron la resistencia de *X. campestris* pv. *phaseoli* contra los electrófilos N-etilmaleimida (NEM) y metilglioxal (MG), encontrando que la protección inducida contra estos agentes químico dependía de un vector de expresión que portaba un gen de la catalasa que era más de 100 veces más resistente al MG y la muerte de NEM. Los altos niveles de expresión de genes para otras enzimas protectoras de peróxido, tales como las de hidropéroxido reductasa de alquilo (ahpC y ahpF) y ohr, fallaron en proteger contra la muerte electrofílica. Este hallazgo sugiere que en *X. campestris* pv. *phaseoli* la toxicidad por NEM y MG puede implicar acumulación y/o aumento de la producción de H₂O₂. Esta idea fue apoyada por la observación de que la adición de piruvato de sodio 10 mM, un compuesto que puede reaccionar químicamente con peróxido o eliminadores del radical hidroxilo (DMSO y glicerol), protege a *Xanthomonas* de la muerte por electrófilo.

Por último, la β-galactosidasa es de gran importancia en la industria porque se usa para fermentar los azúcares de la lactosa. La producción de yogur y queso, por ejemplo, necesita bacterias que expresen esta enzima. Además, es usada para adicionarla a los productos lácteos con el fin de eliminar los residuos de lactosa y hacer productos deslactosados. Otra función crucial consta de identificar si las bacterias presentes en el agua potable son coliformes. La presencia de estas bacterias se puede identificar porque la galactosidasa está presente en bacterias como *E. coli*, común en la materia fecal (Sathya *et.al* 2014). El género *Xanthomonas* posee un bajo nivel de expresión génica de β-galactosidasa y, por tanto, es incapaz de producir goma de xantano en medios basados en lactosa. Sin embargo, se han encontrado variedades ambientales capaces de usar lactosa como única fuente de carbono, tal es el caso del trabajo realizado por Ramezani *et al.* (2014) donde informan de la aparición de algunas cepas de campo natural de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) capaces de usar lactosa como única fuente de carbono para producir goma de xantano, a concentraciones de 14,62 g/L de goma de xantano en condiciones experimentales de laboratorio. Este es el caso de la cepa M2044 de *X. campestris* evaluada en el presente trabajo, cepa cuyo crecimiento es inducido en gran medida por la presencia de lactosa (Tabla 8).

También se ha buscado incrementar la producción de goma xantano por medio de un incremento en la producción de β -galactosidasa. Así lo reportan Yang *et al.* (2002) quienes buscaban aislar una cepa de *X. campestris* (Xc17) que puede usar lactosa directamente para la producción de goma de xantano. Para ello detectaron la presencia de un gen de β -galactosidasa nativa en el tipo salvaje Xc17 por medio de PCR y Southern blot. El tratamiento de Xc17 con ácido nitroso dio como resultado el aislamiento de Xc17L, con una elevación de 3,5 veces de la actividad de β -galactosidasa capaz de crecer en medio basado en lactosa. Xc17L es estable durante al menos 100 generaciones en términos de expresión de β -galactosidasa. Las cantidades de xantano producidas por Xc17L en medio a base de lactosa fueron comparables a las del medio a base de glucosa. Esto hace posible que Xc17L sea potencialmente útil para la producción de xantano a partir de suero, un residuo que contiene lactosa, esto sin la incorporación de ningún gen exótico de resistencia a ADN o antibióticos y, por lo tanto, se evita la preocupación por un organismo modificado por un gen y el temor a la propagación de un gen resistente a antibióticos.

VI.3. Inducción de la producción de Xantano

La goma xantano es un exopolisacárido, que fue descubierto en el Northern Regional Research Laboratory (NRRL) del Departamento de Agricultura de USA, cuando se buscaban sustitutos a las gomas de origen vegetal. Este polisacárido se reportó por primera vez en 1961, como un producto de fermentación de la bacteria *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 y se le denominó xantano (Azuaje *et al.*, 1999).

La inducción del xantano fue realizada con el objetivo de determinar si la bacteria en estudio tenía la capacidad de producir este importante producto biotecnológico, en virtud de la conocida capacidad que tienen las cepas de *X. campestris* de generar un producto de gran impacto industrial como la goma xantano. Esta cepa autóctona ha presentado características de producción del exopolisacárido, el cual se llevó a cabo como se especificó en la sección de metodología (Capítulo III.3.9), obteniéndose un producto del medio de inducción de 43 mg por cada 100 mL de cultivo.

Sus propiedades reológicas son algunas veces medidas con un indicador de producto. Los autores Borges *et al.* (2007), estudiaron diferentes cepas de *Xanthomonas*, encontrando porcentajes de rendimiento de 3,8 g/L para la cepa 51 y 9,2 para la cepa 83, en donde tomaron en cuenta que el porcentaje de rendimiento en la producción de xantano comercial oscila entre 10 a 20 g/L. Asimismo, el rendimiento para el patovar *campestris* fue de 3,4 – 15,3 g/L; mientras que por el patovar *juglandis* fue entre 0,0- 7,3 g/L.

De acuerdo a la verificación del material obtenido a través de la técnica del espectro infrarrojo (Figura 4), se obtuvo un espectro medio, con bandas a longitudes de onda alrededor de 3400 y 2900 nm, correspondientes a grupos hidroxilo en su forma aniónica y grupos metileno (-CH₂), respectivamente. De igual manera se observaron bandas de aproximadamente 1700 y 1200 nm, en cuyas zonas de absorción se aprecian los grupos carboxilos y los grupos carbonilos. Finalmente, se observan bandas de absorción entre 600 a 800 nm, las cuales corresponden a la llamada zona de huella dactilar específica de la materia, siendo reconocida en el xantano particularmente un valor característico la absorción a 891 nm, correspondiente a grupos glucopiranosícos con enlaces de tipo β. Estas características se pueden comparar con el trabajo realizado por Aguilar *et al.* (2005), en cuyo espectro infrarrojo se observaron resultados muy similares que confirman la veracidad de la interpretación del resultado (Figura 6). Sin embargo a pesar de la similitud, se observaron algunas diferencias marcadas, específicamente en el espectro de absorción de 1250 cm⁻¹ aproximadamente, lugar en donde los autores (Pinto *et. al* 2011) observan las modificaciones sobre el xantano en estudio, realizadas en la investigación, respecto a deacetilación, en el cual lograron determinar por espectroscopia infrarroja los cambios de la goma xantano en su estructura con la finalidad de expandirle a novedosas propiedades reológicas.

A nivel industrial el xantano se produce mediante fermentación sumergida aeróbica, mediante el crecimiento en cultivos puros de *X. campestris* sobre diferentes medios en los que se utiliza como fuente de carbono glucosa, sacarosa, melaza, entre otros (Azuaje *et al.* 1999). Es interesante observar como las fuentes de carbono sacarosa y glucosa representadas en la Tabla 8 de caracterización fisiológica de la cepa *X. campestris* M2044, que fueron utilizadas en la metodología de inducción para la producción de xantano, lograron tener un óptimo crecimiento de la bacteria y producción de la goma de manera exitosa. Además, el medio fue

complementado con una fuente nitrogenada y algunas sales como lo sugieren Azuaje *et al.* (1999).

En nuestro país aún se exportan grandes cantidades de goma xantano, económicamente no favorable, lo que representa una gran importancia para la obtención del biopolímero. Observando la caracterización y el fenotipo de *X. campestris* M2044, de acuerdo a los resultados obtenidos, es posible pensar en estandarizar las condiciones que permitan una sobreproducción del xantano y estudiar sus propiedades reológicas, y de esta manera pueda ser utilizada a nivel biotecnológico en Venezuela.

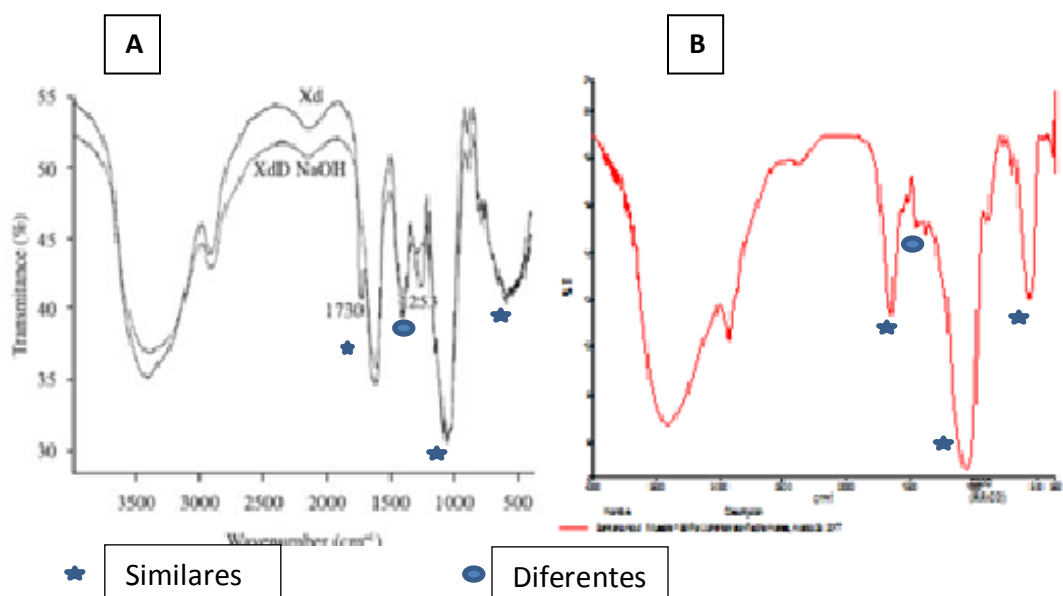


Figura 6. Imágenes comparativas de Espectro infrarrojo. A) Espectro infrarrojo de goma xantano obtenido por (Pinto *et. al* 2011) B) Espectro infrarrojo de xantano de *X. campestris* M2044 de este trabajo.

CONCLUSIONES

1. La cepa *X. campestris* M2044 tiene forma de bacilo, motilidad positiva y tinción de gram negativa. Además, sus colonias son de forma puntiforme, tamaño de 1mm, elevaciones convexas, bordes enteros, densidad opaca, consistencia viscosa y color amarillo claro.
2. En las pruebas bioquímicas preliminares, la cepa M2044 resultó ser oxidasa negativo, es incapaz de producir gas y H₂S, no fermenta glucosa ni lactosa, no desamina la lisina pero si la descarboxila, no utiliza el citrato como única fuente de carbono, no posee la enzima triptofanasa ni la enzima ureasa. Se determinó ser una bacteria de la familia *Xanthomonadaceae*.
3. La cepa M2044 fue identificada como *Xanthomonas campestris*, por medio de pruebas API (90,4 %) y comparación de secuencias del ADNr 16S (95 % de similitud).
4. *Xanthomonas campestris* M2044 es resistente a 11 de 14 antibióticos estudiados, lo que implica una alta tasa de resistencia para un aislado ambiental.
5. *X. campestris* M2044 es resistente a 6 metales de los 10 estudiados en diferentes concentraciones, reportándose por primera vez resistencia a bario y litio para esta especie bacteriana.
6. La fructosa, lactosa y dextrosa son los azúcares que más favorecen el crecimiento de la cepa en estudio, pudiendo diseñar medios de cultivo basados en estos azúcares para incrementar la bioamasa, y posiblemente la producción de goma xantano.
7. *X. campestris* M2044 es productora de proteasas, β -galactosidasa y catalasa, más no de amilasa. Estas enzimas pueden estar relacionadas con mecanismos de resistencia o de

mejoramiento de la cantidad y calidad de la goma xantano producida, además, de ser enzimas de gran interés biotecnológico.

8. Debido a la observación de zonas de huellas dactilares específicas en el espectro infrarrojo reconocidas en la goma xantano, se pudo determinar que la cepa M2044 de *X. campestris* es productora de goma xantano. Este hallazgo, junto con otros reportados en este trabajo, convierten a esta cepa en un blanco biotecnológico para la producción de xantano, así como otros productos de gran interés comercial.

RECOMENDACIONES

1. Caracterización genotípica de la producción de goma xantano mediante la identificación de los genes del operón *gum* en *X. campestris* M2044, involucrados en la producción de goma xantano.
2. Estudio de las propiedades reológicas del xantano obtenido a partir de *X. campestris* M2044, de modo de caracterizar el producto y poder conocer su potencial biotecnológico.
3. Estudio de los mecanismos de resistencia a antibióticos y metales pesados de *X. campestris* M2044.
4. Evaluar la producción de goma xantano en medios en los que se use como fuentes de carbono los azúcares que promovieron el crecimiento de la cepa M2044, para evidenciar el efecto de estos azúcares en la calidad y cantidad del xantano producido.
5. Usar medios no convencionales que permitan inducir la producción de una goma xantano de alta calidad reológica, disminuyendo los costos de producción.

Referencia Bibliohemerográficas

- Aguilar L, Gastón C, Llopiz J, Jérez A. (2005). Estudio de termoestabilidad de goma xantano por análisis térmico y viscosimetría. Red. Rev. Cient. Am. Latin. 39: 52-57.
- Alvez B, Carballo J, Alonso G, Oropeza M. (2011). Diagnóstico molecular de *Xanthomonas albilineans* (ashby) dowson en Venezuela, agente causal de la escaldadura foliar de la caña de azúcar. Agron. Trop. Venez. 61: 27-36.
- Arroyo M. (1998). Inmovilización de enzimas - In: Fundamentos, métodos y aplicaciones. Ars. Pharm. 39: 23-39.
- Azuaje R. (1999). Producción de xantano por *Xanthomonas campestris* en un medio de cultivo no convencional. (Tesis de pre grado). Universidad de Los Andes-Facultad de Ciencias, Mérida.
- Azuaje R, Sánchez J. (1999). Producción de xantano por *Xanthomonas campestris* en un medio de cultivo no convencional. Acta Cient. Venez. 50: 201-209.
- Banjerdki P, Vattanaviboon P, Mongkolsuk S. (2003). Cadmium-induced adaptive resistance and cross-resistance to zinc in *Xanthomonas campestris*. Curr. Microbiol. 47: 260-262.
- Barber C, Tang J, El Feng J, Pan M, Wilson T, Slater H, Dow J, Williams P, Daniels M. (1997). A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. Mol. Microbiol. 24: 555-566.
- Barreras M, Salinas S, Abdian P, Kampel M, Ielpi L. (2008). Structure and mechanism of *GumK*, a membrane-associated glucuronosyltransferase. J. Biol. Chem. 283: 25027-25035.
- Basim H, Minsavage G, Stall R, Wang J, Shanker S, Jones J (2005). Characterization of a unique chromosomal copper resistance Gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Am. Soc. Microbiol. 71: 284-291.
- Batisson I, Crouzet O, Besse- Hoggan P, Sancelme M, Mangot J, Mallet C, Bohatier J. (2009). Isolation and characterization of mesotrione- degrading *Bacillus* sp. From soil. Environ. Pollut. 157: 1195-1201.

- Becker A, Katzen F, Puhler A, Ielpi L. (1998). Xanthan *gum* biosynthesis and applications; a biochemical/genetic perspective. Mini review. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50: 145-152.
- Becker A, Niehaus K, Puhler A. (1995). Low-molecular-weight succinoglycan is predominantly produced by *Rhizobium meliloti* strains carrying a mutated ExoP protein characterized by a periplasmic N-terminal domain and a missing C-terminal domain. Mol. Microbiol. 16: 191–203.
- Becker A, Rüberg S, Küster H, Roxlau A, Keller M, Ivashina T, Cheng H, Walker G, Pühler A. (1997). The 32-kilobase *exp* gene cluster of *Rhizobium meliloti* directing the biosynthesis of galactoglucan: genetic organization and properties of the encoded gene products. J. Bacteriol 179: 1375-1384.
- Behlau F, Canteros B, Minsayage G, Jones J, Graham J. (2011). Molecular characterization of copper resistance genes from *Xanthomonas citri* *subsp. citri* and *Xanthomonas alfalfae* *subsp. citrumelonis*. Appl. Environ. Microbiol. 77: 4089-4096.
- Bhatia S, Kumar N, Bhatia R. (2015). Stepwise bioprocess for exopolysaccharide production using potato starch as carbon source. Biotechnol. 5: 736-739.
- Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks E, Jhonston M, Barton H, Wright G. (2012). Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. PLoS One. 7. doi: doi: 10.1371/journal.pone.0034953.
- Bianco M, Jacobs M, Salinas S, Salvay A, Ielmini M, Ielpi L. (2014). Biophysical characterization of the outer membrane polysaccharide export protein and the polysaccharide co-polymerase protein from *Xanthomonas campestris*. Protein. Expr. Purif. 101: 42-53.
- Borges C, Vendruscolo C, Biosci J. (2007). Xanthan synthesized by strains of *Xanthomonas campestris* *pv pruni*: production, viscosity and chemical composition. Biosci. J. 23: 67-73.
- Boua G, Fernández B, García C, Sáez J, Valdezate S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 29: 601-608.

- Burger A, Eichenlaub R. (2003). Genetics of phytopathogenic bacteria. *Prog. Bot.* 64: 98-114.
- Büttner D, Bonas U. (2010), Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol. Rev.* 34: 107-133.
- Chan J, Goodwin P. (1999). The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. *Biotechnol. Adv.* 17: 489–508.
- Chou F, Chou H, Lin Y, Yang L, Lin N, Weng S, Tseng Y. (1997). The *Xanthomonas campestris gumD* gene required for synthesis of xanthan gum is involved in normal pigmentation and virulence in causing black rot. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233: 265–269.
- Coplin L, Cook D. (1990). Molecular genetics of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria. *Mol. Plant. Microbe. Interact* 3: 271-279.
- Crécy-LaGard V, Glaser P, Lejeune P, Sismeiro O, Barber C, Daniels M, Danchin A. (1990). A *Xanthomonas campestris pv. campestris* protein similar to catabolite activation factor is involved in regulation of phytopathogenicity. *J. Bacteriol* 172: 5877-5883.
- Cubero J, Graham J. (2002). Relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identifications by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 3: 1257-1264.
- Cubero J, Redondo C, Subuquillo P, Vélez M, Garita-Cambronero J, Ferragud E. (2015). *Xanthomonas*, un grupo de bacterias fitopatógenas con una alta especialización. *Microbiol. Plant.* 60: 1-5
- Dekio I, Hayashi H, Sakamoto M, Kitahara M, Nishikawa T, Suematsu M, Benno Y. (2005). Detection of potentially novel bacterial components of the human skin microbiota using culture independent molecular profiling. *J. Med. Microbiol.* 54: 1231-1238.
- Denny T. (1995). Involvement of bacterial polysaccharide in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32: 173–197.

- Dunger G, Relling V, Tondo, Barreras M, Ielpi L, Orellano E, Ottado J. (2007). Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. Arch. Microbiol. 188: 127-135.
- Fernández A, García C, Sáez J, Valdezate S. (2010). Procedimientos en Microbiología clínica. Documento Científico–Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades infecciosas y microbiología. Recuperado de: www.seimc.org. Fecha de consulta: 10 de abril de 2017.
- García J, García-Sánchez J, García M, García E, Muñoz J. (1991). Antibiotic susceptibility profile of *Xanthomonas maltophilia*. In Vitro activity of β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations. Diag. Microbiol. Infect. Dis. 14: 239-243.
- Gilani S, Najafpour G, Heydarzadeh H, Zare H. (2011). Kinetic models for xanthan gum production using *Xanthomonas Campestris* from molasses. Chem. Eng. 17: 179–187.
- Guevara Y, Maselli A. (1999). El tizón bacteriano del arroz en Venezuela. Rev. Agron. 49: 505-516.
- Guillen J. (2012). Enfermedad–Cancro o Chancro. Enfermedades. Recuperado de: <http://www.botanicayjardines.com/enfermedad-cancro-o-chancro/>. Fecha de consulta: 10 de abril de 2017.
- Hall T. (1999). Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for window 95/98/NT. Oxford University press. Nucleic. Acids. Symp. 53: 1-2.
- Harding N, Raffo S, Raimondi A, Cleary J, Ielpi L. (1993). Identification, genetic and biochemical analysis of genes involved in synthesis of sugar nucleotide precursors of xanthan gum. J. Gen. Microbiol. 139: 447-457.
- Hashimi S, Wall M, Smith A, Maxwell A, Birch R. (2007). The phytotoxin albicidin is a novel inhibitor of DNA gyrase. Am. Soc. Microbiol. 1: 181-187.
- Hernández Y, Trujillo G. (2000). *Xanthomonas campestris* pv. *zinniae*, infectando plantas de cuarentona (*Zinnia elegans* Jacq.) en Venezuela. Rev. Fac. Agron. 17: 156-163.
- Hillis D, Dixon M. (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. Q. Rev. Biol. 66: 411-453

- Holt J, Krieg N, Sneath P, Staley J, Williams S. (2000). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. USA: 9na Edicion. Editorial Lippincott Williams & Wilkins. Pp 28-56
- Hötte B, Rath-Arnold I, Pühler A, Simon R. (1990). Cloning and analysis of a 35.3-kilobase DNA region involved in exopolysaccharide production by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J. Bacteriol.* 172: 2804-2807.
- Ielpi L, Cousot R, Dankert M. (1993). Sequential assembly and polymerization of the polyprenol Linked pentasaccharide repeating unit of the xanthan polysaccharide in *Xanthomonas campestris*. *J. Bacteriol.* 175: 2490-2500.
- Instituto Nacional de Estadísticas. Comercio Exterior. (2013). Recuperado de: http://www.ine.gov.ve/index.php?option=com_content&view=article&id=381:descripcion-de-los-capitulos&catid=48:comercio-exterior&Itemid=33. Fecha de consulta: 6 de Enero de 2017.
- Janas, P, Targonski P. (2007). The effect of coal and nitrogen sources on the production of xanthan and external enzymes by penicincinate mutanta *Xanthomonas campestris*. *Food. Sci. Technol.* 50: 161-172.
- Jiménez O, Contreras N, Nass H. (2004). *Xanthomonas albilineans* agente causal de la escaldadura foliar de la Caña de Azúcar (*Saccharum sp*) en los estados Lara y Yaracuy. *Rev. Fac. Agron.* 21: 233-245.
- Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezhuk Y, McGinnis S, Madden T. (2008). NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic.Acids Rev.* 36: 5-9.
- Joshi S, Satyanarayana T. (2013). Biotechnology of cold-active proteases. *Biol.* 2: 755-783.
- Kalogiannis S, Liakovidou G, Liakopoulou M. (2003). Optimization of xanthan *gum* production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses. *Proc. Biochem.* 39: 249-256.
- Kassim M. (2011). Production and characterization of the polysaccharide xanthan *gum* by a local isolate of the bacterium *Xanthomonas campestris*. *Afr. J. Biotechnol.* 10:16924-16928.

- Katzen F, Becker A, Zorreguieta A, Puehler A, Ielpi L. (1996). Promoter analysis of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum operon directing the biosynthesis of the xanthan polysaccharide. J. Bacteriol. 178: 4313- 4318
- Katzen F, Ferreiro D, Oddo C, Ielmini M, Becker A, Puhler A, Ielpi L. (1998). *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum Mutants: Effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. J. Bacteriol. 180: 1607-1617.
- Kay S, Bonas U. (2009). How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. Curr. Opin. Microbiol. 12: 37-43.
- Ki- Hoon J, Yong C. (2007). Transcriptional analysis of the gum gene cluster from *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae*. Biotechnol. Lett. 29: 95-103.
- Kim S, Kim J, Lee B, Cho J. (2009). Mutational analysis of the gum gene cluster required for xanthan biosynthesis in *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. Biotechnol. Lett. 31: 265-270.
- Kim S, Lee B, Cho J. (2010). Relationship between glucose catabolism and xanthan production in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Biotechnol. Lett. 32: 527-531.
- Kimati H, Bergamin F, Amorim L. (1995). Handbook of Plant Pathology principles and fetuses (3° ed.). Sao Paulo.
- Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. (1999). Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas de color. México: 5ta edición. Editorial Panamericana.
- Koplín R, Arnold W, Hotte B, Simon R, Wang G, Puhler A. (1992). Genetics of xanthan production in *Xanthomonas campestris*: the xanA and xanB genes are involved in UDP-glucose and GDP-mannose biosynthesis. J. Bacteriol. 174: 191-199.
- Lachke A. (2004). Xanthan a versatile gum. Resonance 10: 25-33.
- Lane D. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. Editorial E. Stackebrandt and M. Goodfellow. Nueva York. 115-175. Recuperado de <http://lutzonilab.org/16s-ribosomal-dna/> . Fecha: 15 marzo de 2016.
- Marrero J, Díaz A, Coto V. (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en bacterias y sus aplicaciones. Cienc. Biol. 41: 67-78.
- Martínez J. (2009). The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. Proc. R. Soc. B. 276: 2521-2530.

- Martínez J, Baquero F. (2009). Antibiotics and the evolution of antibiotic resistance. Encyclopedia of life science (ELS). Editorial Jhon Wiley and Sons. Chichester. 1-9.
- Martínez J, Baquero F. (2014). Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter space. J. Med. Sci. 119: 68-77.
- Moya L, Rodríguez L, Espinoza M. (2015). *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causante de manchas foliares del filodendro (*Philodendron scandens* subsp. *Oxycardium*) en Cuautla, Morelos- México. Rev. Cienc. Agric. 6.
- Nam J, Kim H, Lee C, Park Y. (2013). A mutation in the *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* *wxoD* gene affects xanthan production and chemotaxis. Biotechnol. Lett. 35: 1913-1918.
- Nigam P, Robinson T, McMullan G, Marchant R. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: A critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. Biores. Technol. 77: 247-255.
- Pinto E, Furlan L, Vendruscolo C. (2011). Chemical deacetylation natural xanthan (*Jungbunzlauer*). Polímeros. 21: 47-52
- Ramezani A, Jafari M, Goodarzi T, Alavi SM, Salmanian AH, Azin M. (2014). Lactose consuming strains of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) insight into the emergence of natural field resources for xanthan gum production. J. Microbiol. Biotechnol. 30: 1511-1517.
- Ramírez A, Amor E, Longa A, Sánchez K, Nieves M, Velasco J, Araque M, Mosqueda N. (2006). Manual de bacteriología general. (1° ed.) Editorial venezolana C.A. Venezuela. 42-195.
- Ramírez G, Luna B. (1996). Manual de prácticas de microbiología general. Laboratorio de microbiología experimental. Facultad de química. UNAM. México D.F. pp: 29
- Rigano L, Siciliano F, Enrique R, Sendín L, Filippone P, Torres P, Qüesta J, Dow M, Castagnaro A, Vojnov A, Marano M. (2007). Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Mol. Plant. Microbe. 20: 1222– 1230.

- Ripoll X. (2009). Obtención de exopolisacáridos de interés industrial a partir del lactosuero y permeates (Tesis doctoral). Universidad de Granada- Facultad de Farmacia, Granada.
- Rodríguez H, Aguilar L, LaO M. (1997). Variations in xanthan production by antibiotic-resistant mutants of *Xanthomonas campestris*. Cas. Lek. Cesk. 136: 154-156.
- Rodríguez S, Albarracín N, Arjona A, Albarracín M, Hernández Y. (2002). Diagnóstico postcosecha de enfermedades bacterianas en zanahoria. Fitopatol. Venez. 15: 17-20.
- Ryan R, Vorholter F, Potnis N, Jones J, Van S. Bogdanove A, Dow J. (2011). Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. Microbiol. J. 9: 344-355.
- Salazar E, Nieves B, Ruíz J, Vila J. (2008). Utilidad del Sistema API 20NE para identificar especies del género *Acinetobacter* y otros bacilos Gram negativos no fermentadores. Rev. Soc. Ven. Microbiol 28: 89-95.
- Salinas S, Bianco M, Barreras M, Ielpi L. (2011). Expression, purification and biochemical characterization of *GumI*, a monotopic membrane GDP-mannose: glycolipid 4- β -D-mannosyltransferase from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Glycobiol. 21: 903-913.
- Salinas S, Petruk A, Brukman N, Bianco M, Jacobs M, Marti M, Ielpi L. (2016). Binding of the substrate UDP-glucuronic acid induces conformational changes in the xanthan gumglucuronosyltransferase. Protein. Eng. Des. Sel 29:197-207.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. (2° ed.). Editorial Cold spring harbor. New York- USA. 28-45.
- Sambrook J, Russell D. (2012). Molecular cloning: a laboratory manual. (4° ed.). Editorial Cold spring harbor laboratory press New York-USA: 78-90.
- Sathya TA, Khan M. (2014). Diversity of glycosyl hydrolase enzymes from metagenome and their application in food industry. J. Food. Sci. 79: 2149-2156.
- Schaad N, Vidaver A, Lacy G, Rudolph K, Jones J. (2000). Evaluation of proposed amended names of several *Pseudomonads* and *Xanthomonas* and recommendations. Phytopathol. 90: 208-213.

- Souw P, Demain A. (1979). Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B1459. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 1186-1192
- Stackebrandt E, Ebers J. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol.* 33:152-155.
- Stoodley P, Sauer K, Davies D, Costerton W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 187-209.
- Sutherland I. (1990). *Biotechnology of microbial exopolysaccharides*. Cambridge University Press. (Cambridge Studies in Biotechnology). Cambridge. 60-63.
- Tang J, Liu Y, Barber C, Dow J, Wootton J, Daniels M. (1991). Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris pathovar campestris*. *Mol. Gen. Genet* 226: 409-417.
- Teixeira E, Franco J, Marques M, Bertolini M. (2008). The copper resistance operon *copAB* from *Xanthomonas axonopodis pathovar citri*: gene inactivation results in copper sensitivity. *Microbiol.* 154: 402-412.
- Torrestiana B, Fucikovsky L, Galindo E. (1990). Xanthan production by some *Xanthomonas* isolates. *Lett. Appl. Microbiol* 10: 81–83.
- Tseng Y, Choy K, Hung C, Lin N, Liu J, Lou C, Yang B, Wen S, Weng F, Weng S, Wu J. (1998). Chromosome map of *Xanthomonas campestris pv. campestris* 17 with locations of genes involved in xanthan gum synthesis and yellow pigmentation. *J. Bacteriol.* 181:117-125.
- Universidad Central de Venezuela. (2003). *Guía para muestras de infrarrojo*. Facultad de Ciencias- Escuela de Química. 3-4.
- Van Elsas J, Semenov A, Costa R, Trevors J. (2011). Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *Soc. Microb. Ecol.* 5: 173-183.
- Vattanaviboon P, Sriprang R, Mongkolsuk S. (2001). Catalase has a novel protective role against electrophile killing of *Xanthomonas*. *Microbiology* 147: 491-498.
- Velásquez N, Trujillo G, Hernández Y, Moreno N. (1988). Bacteriosis en ocumo (*xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott) ocasionada por *Xanthomonas sp.* *Rev. Agron. Trop.* 38: 49-56.

- Vojnov A, Slater H, Daniels M, Dow J. (2001). Expression of the *gum* Operon directing xanthan biosynthesis in *Xanthomonas campestris* and its regulation in planta. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 14: 768-774.
- Voloudakis A, Reignier T, Cooksey A. (2005). Regulation of resistance to copper in *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. *Am. Soc. Microbiol.* 71: 782-789.
- Wibberg D, Alkhateeb R, Winkler A, Albersmeier A, Schtschneider S, Albaum S, Niehaus K, Hublik G, Pühler A, Vorhölter FJ. (2015). Draft genome of the xanthan producer *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 (ATCC 13951). *J. Biotechnol.* 204: 45-46.
- Yang T, Wu G, Tseng Y. (2002). Isolation of a *Xanthomonas campestris* strain with elevated β -galactosidase activity for direct use of lactose in xanthan gum production. *Lett. Appl. Microbiol.* 35: 375-379.
- Zhang H, Wang S. (2013). Rice versus *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*: a unique pathosystem. *Nces. Plant. Gene. Res.* 16: 188-195.
- Zhang Z, Chen H. (2010). Fermentation performance and structure characteristics of xanthan produced by *Xanthomonas campestris* with a glucose/xylose mixture. *App. Biochem.* 6: 1653 -1663.
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. (2010). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol* 7: 203-214.

ANEXOS

Anexo 1: Medios de crecimiento utilizados en el desarrollo de la investigación

Medio Luria Bertani líquido (para 1200 mL)

- Extracto de carne: 12 g
- Extracto de levadura: 6 g
- Cloruro de sodio: 12 g
- H₂O destilada: 1200 mL

Preparación: Se disuelven los componentes en agua caliente (500 mL) y luego llevar al volumen de 1200 mL con un cilindro graduado. Se distribuye el medio en recipientes de vidrio y se esterilizan a 121°C, 15 lb por 15 minutos.

Medio Luria Bertani Duro (para 1200 mL)

1. Extracto de carne: 12 g
2. Extracto de levadura: 6 g
3. Cloruro de sodio: 12 g
4. Agar bacteriológico: 21,6 g
5. H₂O destilada: 1200 mL

Preparación: Se disuelven los ingredientes 1,2,3 en agua caliente (500 mL). Luego se va agregando poco a poco el agar bacteriológico removiendo constantemente la mezcla hasta que tenga un aspecto uniforme. Se lleva al volumen de 1200 mL en un cilindro graduado. Se distribuye en recipientes de vidrio y se esterilizan a 121°C, 15 lb por 15 minutos.

Medio Levadura, Dextrosa, Calcio (YDC)

- Extracto de levadura 10 g
- Carbonato de Calcio 20 g
- Agar 15 g
- Dextrosa 20 g
- H₂O destilada 1 L

Preparación: suspender los componentes en agua destilada. Esterilizar a 121 °C 15 lb de presión por 15 minutos

Medio agar BHI

- Extracto cerebro-corazón: 17,5 g
- Peptona pancreat.gelatina: 10 g
- Cloruro de sodio: 5 g
- Fosfato disodico: 2,5 g
- Glucosa: 2 g
- Agar: 10 g
- H₂O destilada: 1 L

Preparación: Disolver en un litro de agua destilada. Calentar hasta el punto de ebullición, agitando para su total homogeneización. Repartir en tubos p frascos y esterilizar en la autoclave a 121 °C, 15 lb por 15 minutos. No sobrecalentar para evitar el oscurecimiento y caramelización del medio (pH final: 7,1 ± 0,2).

Anexo 2: Medios utilizados en el caracterización bioquímica preliminar

Prueba KIA:

- Extracto de carne: 3 g
- Extracto de levadura: 3 g
- Peptona: 15 g
- Proteosa peptona: 5 g
- Lactosa: 10 g
- Glucosa: 1 g
- Sulfato ferroso: 0,2 g

- Cloruro de sodio: 5 g
- Tiosulfato de sodio: 0,3 g
- Agar: 12 g
- Rojo fenol: 0,024 g
- Agua destilada: 1 L

(pH final: 7.4)

Preparación: Suspender los componente en agua destilada, calentar hasta ebullición. Envasar, esterilizar a 121 °C, 15 lb de presión por 15 mint. Inclinar.

Prueba LIA:

- Peptona de carne: 5 g
- Tiosulfato de sodio: 0,04 g
- Citrato férrico (III) amonio: 0,5 g
- Extracto de levadura: 3 g
- D-Glucosa: 1 g
- Púrpura de bromocresol: 0,02 g
- Monohidrato de L- lisina: 10 g
- Agar: 12,5 g
- Agua destilada: 1 L

(pH final: 6,7 +o- 0,1)

Preparación: Suspender los componentes en agua destilada, calentar hasta ebullición, envasar en tubos. Esterilizar a 121 °C, 15 lb de presión por 15 mint. Inclinar

Agar Citrato de Simons:

- Cloruro de sodio: 5 g
- Fosfato dipotásico: 1 g
- Citrato de sodio: 2 g
- Sulfato de magnesio: 0,2 g
- Agar: 15 g
- Azul de bromotimol: 0,08 g
- Agua destilada: 1 L
(pH final 6,9)

Preparación: suspender los componentes de agua destilada, calentar hasta ebullición, envasar en tubos. Esterilizar a 121 °C, 15 lb por 15 minutos

Prueba MIO:

- Extracto de levadura: 3 g
- Clorhidrato de L- ornitina: 5 g
- Peptona: 10 g
- Dextrosa: 1 g
- Triptona: 10 g
- Agar: 2 g
- Púrpura de bromocresol: 0,02 g
- Agua destilada: 1 L

(pH final: 6,5 +o- 0,2)

Preparación: Suspender los componentes en agua destilada, calentar hasta ebullición, envasar en tubos. Esterilizar a 121 °C, 15 lb de presión por 15 mint.

Agar Úrea:

- Peptona: 1 g
- Glucosa: 1 g
- Cloruro de sodio: 5 g
- Fosfato monopotásico: 2 g
- Urea: 20 g
- Rojo fenol: 0,012 g
- Agar: 15 g
- Agua destilada: 1 L
(pH final 6,8 +o- 0,1)

Preparación: Suspender los componentes en agua destilada (excepto la urea), calentar hasta ebullición. Esterilizar a 121°C, 15lb por 15 minutos. Preparar una solución de urea al 40 %, esterilizarla por filtro 0,2 um y agregar al agar base cuando este a temperatura de 45 °C, repartir en tubos e inclinar.

Anexo 3: Preparación de las soluciones utilizadas en la inducción de la goma xantano

Medio 1:

- Sacarosa 20 g/L
- Peptona 5 g/L
- K_2HPO_4 0,5 g/L
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,25 g/L
- AGAR: 16 g/L

Medio 2:

- Extracto de levadura: 3 g/L
- Extracto de malta: 3 g/L
- Peptona : 5 g/L
- Glucosa 20 g/L

Medio 3

- $NH_4H_2PO_4$: 1,5 g/L
- K_2HPO_4 : 2,5 g/L
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/L
- SACAROSA 40 g/L

Anexo 4: Presentación de resultados en las Jornadas de la Sociedad Venezolana de Microbiología, Capítulo Mérida.



Sociedad Venezolana de Microbiología
Capítulo Mérida



Otorga el presente **CERTIFICADO**
a
Maura Rojas, Milibeth Peña, María José Peña-Vera, Miguel Sulbarán, Elizabeth Pérez-Pérez.

Por su participación en las
Jornadas de la Sociedad Venezolana de Microbiología Capítulo Mérida
Con la presentación del *Trabajo Libre bajo la modalidad de Póster*
titulado:

“Estudio de diferentes cepas de *Xanthomonas* aisladas de ambientes naturales”
Mérida del 19 al 21 de Enero del 2017.



Dra. Elaysa Salas
Presidente SVM-Mérida



Lic. Reina Araujo
Presidente Colegio de Bioanalistas. Estado Mérida



SVM-Mérida 2016-P0014
Activar Windo