

Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología
Celular y Genética

**Caracterización genética de actinomicetos aislados
en suelos de Tenerife y evaluación de su potencial
biotecnológico**

**Genetic characterization of Actinomycetes isolated
from soils of Tenerife and assessment of their
biotechnological potential**

Trabajo de Fin de Grado en Biología

Yanira Gorrín López

Grado en Biología, Julio 2018

Este trabajo de Fin de Grado ha sido tutorizado por
Milagros León Barrios y Néstor J. Abreu Acosta.

Índice:

Resumen:	3
Abstract :	3
Introducción:	5
Objetivos:	9
Material y métodos:	10
Medios de cultivo y técnicas para la detección de actividades enzimáticas.....	10
Análisis estadístico de las actividades enzimáticas	12
Técnicas para valorar la actividad antimicrobiana	12
Extracción de ADN genómico.....	13
Amplificación por PCR y Box Fingerprint	13
Amplificación por PCR y secuenciación del gen del ARNr 16S	15
Resultados y discusión.....	17
Evaluación de las actividades enzimáticas en los actinomicetos aislados.....	17
Detección de actividad antibiótica en los actinomicetos aislados	18
Caracterización de actinomicetos por secuenciación del gen del ARNr 16S ...	19
Estimación de la diversidad genética mediante Perfiles BOX	25
Conclusiones	27
Bibliografía	28

Resumen:

Los actinomicetos son un grupo de procariontes Gram positivos caracterizado por un alto contenido en G+C y la morfología filamentosa de sus células. Su hábitat más común es el suelo, y su amplio metabolismo secundario, les otorga un elevado potencial biotecnológico. Entre las moléculas de mayor valor comercial que producen destacan un gran número de antibióticos, pero también, enzimas hidrolíticas capaces de degradar polímeros complejos. En este Trabajo se realizaron distintos ensayos para valorar la capacidad de producir amilasas, lipasas, celulasas y proteasas, así como compuestos antimicrobianos en una colección de actinomicetos aislados previamente en suelos de Tenerife (Güímar, Las Mercedes e Izaña). Los resultados más prometedores para las actividades hidrolíticas se obtuvieron con cepas aisladas en suelo de Las Mercedes, que presentaron índices de degradación muy elevados con respecto a la media. Se seleccionaron veinte cepas para su caracterización taxonómica por secuenciación del gen del ARN ribosómico 16S. El árbol filogenético mostró que estos aislados pertenecen al género *Streptomyces*, a excepción de una cepa de Izaña que se incluye en el género *Nocardia*. Dentro de *Streptomyces*, varias cepas podrían representar nuevas especies para este género. La diversidad a nivel infraespecífico evaluada a partir de huellas genómicas de perfiles BOX reveló la existencia de una elevada diversidad genética.

Abstract:

Actinomycetes are a group of Gram positive prokaryotes, characterized by high content in G+C and the filamentous morphology of its cells. The soil is the most common habitat and its wide secondary metabolism, gives them a high biotechnological potential. Among the molecules of higher commercial value, stand out a large number of antibiotics produced, but also, hydrolytic enzymes capable of degrading complex polymers. In this project, several methodologies were tested to assess the ability to produce amylases, lipases, cellulases and proteases, as well as antimicrobial compounds by a collection of actinomycetes previously isolated from soils of Tenerife: (Güímar, Las Mercedes and Izaña). The most promising results for hydrolytic activities were obtained by strains isolated in Las Mercedes, which showed very high degradation rates compared to the average. Twenty strains were selected for their taxonomic characterization by sequencing the 16S ribosomal RNA gene. The phylogenetic tree showed that these isolates belong to the genus *Streptomyces*, except for a strain from Izaña that is included in the genus *Nocardia*. Within *Streptomyces*, several strains

could represent new species for this genus. The diversity at infraspecific level, evaluated from genomic fingerprint of BOX profiles, revealed the existence of a high genetic diversity.

Palabras clave: Actinomicetos, *Streptomyces*, suelo, Tenerife, filogenia, diversidad potencial biotecnológico.

INTRODUCCIÓN

Los actinomicetos o actinobacterias son un grupo de procariotas Gram positivos de alto contenido en guanina+citosina, que alcanza valores en torno al 70%.

Otra característica de relevancia que caracteriza a este grupo es la morfología. Muchos géneros tienen una morfología similar a la de los hongos, ya que presentan células con morfología filamentosa (hifas) que, similar al de los hongos, se desarrollan formando un micelio (Chavan et al., 2013). En la estructura de este micelio se distingue el vegetativo, que permanece unido e incrustado a la superficie del sustrato, y el aéreo, que crece hacia el exterior y permite el desarrollo de esporas a partir de hifas especializadas. Capacita a estas bacterias para ser resistentes a múltiples tipos de estrés abiótico, como por ejemplo la deshidratación. A pesar de esta similitud morfológica con los hongos, el diámetro de las hifas es inferior, como corresponde a células procariotas.

Los actinomicetos son microorganismos ubicuos cuyo hábitat más común es el suelo, donde conforman un 20-60% de la población microbiana. Más recientemente, también se han descrito en ambientes acuáticos como océanos, ríos y lagos. Son generalmente saprofíticos y participan activamente en la mineralización de la materia orgánica (Quiñones-Aguilar et al., 2016). Las actinobacterias son organismos quimiorganotrofas y, en su mayoría, aerobias estrictas. Crecen bien a temperaturas en torno a 25°C y a pH neutro (pH=7).

Actualmente los actinomicetos constituyen uno de los filos más grandes de bacterias dentro del Dominio Bacteria, en el Phylum Actinobacteria. Este filo incluye una Clase *Actinobacteria*, con seis Órdenes (Stackebrand y Schumann, 2006) y numerosas familias, que engloban más de 200 géneros y cientos de especies.

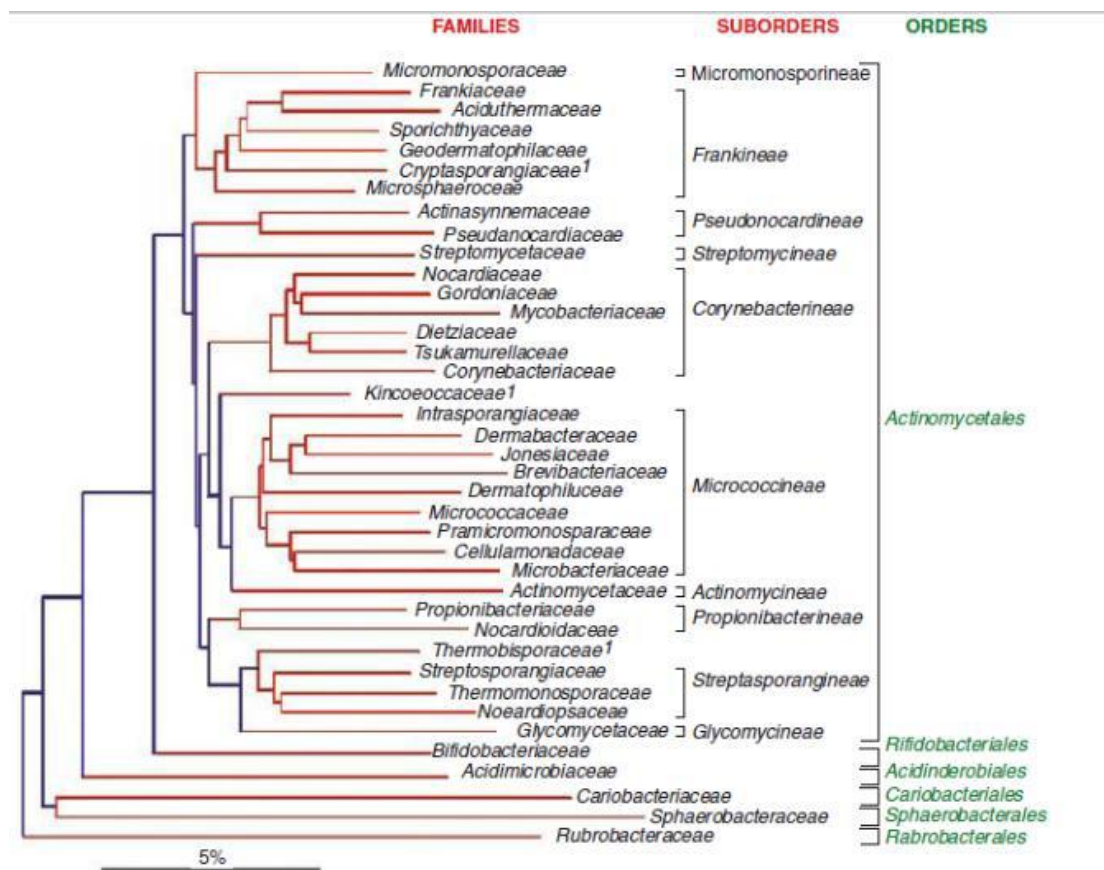


Figura 1. Árbol filogenético de *Actinobacteria*, basada en la comparación de las secuencias del ARN ribosómico 16S (Kämpfer, 2006).

La primera clasificación de los procariotas de este grupo fue realizada en 1943 por Waksman y Henrici, que consideraron a estos organismos como un puente evolutivo entre bacterias y hongos. Transcurrieron varias décadas en las que se consideró a este grupo como constituyente del Reino *Fungi*. De ahí su nombre, proveniente del griego: *actis*: rayo, y *mykes*: hongos, ya que dado su morfología era fácil denominarlos “hongos radiados” (Soler-Hernández, 2012). Desde entonces, se han realizado numerosos reordenamientos dentro de la clasificación taxonómica, puesto que se trata de un grupo de bacterias complejo desde el punto de vista taxonómico.

Tradicionalmente, los sistemas de clasificación de los actinomicetos se han basado en la morfología y en sus características fisiológicas. Sin embargo, los estudios más recientes basados en el análisis de las secuencias han demostrado que los antiguos esquemas taxonómicos no reflejan las verdaderas relaciones entre los grupos de actinomicetos.

En 1997 (Stackebrandt et al., 1997) proponen una nueva clasificación jerárquica apoyada en las relaciones filogenéticas en base a las secuencias del gen del ARN ribosomal 16S.

La pertenencia de una nueva cepa a la clase *Actinobacteria* requiere valores de similitud de la secuencia 16S superiores al 80%.

Ahora bien, a pesar del enorme valor taxonómico de las filogenias ribosomales, actualmente se sabe que las secuencias del ARN ribosomal 16S, por su alto grado de conservación, son insuficientes para distinguir especies estrechamente relacionadas dentro de un género ni, por supuesto, distintas cepas dentro de una misma especie. Es por ello, que se hace necesario incluir la filogenia de varios genes codificadores de proteínas, implicados en funciones esenciales del mantenimiento celular (“genes *housekeeping*”). Estos genes, por tener una mayor tasa evolutiva producen filogenias más resolutivas para las especies cercanas. En la taxonomía de los actinomicetos los más utilizados son el gen *atpD* (que codifica la subunidad F1-beta de la ATP-Sintasa.), *gyrB* (subunidad B de la DNA girasa), *recA* (recombinasa A), *rpoB* (subunidad-b de la RNA polimerasa) y *trpB* (subunidad-b triptófano sintasa). El análisis filogenético basado en la concatenación de estos genes, MLSA (del inglés Multilocus sequence analysis), constituye hoy una de las bases fundamentales en la delimitación de las especies.

A nivel infraespecífico, el empleo de técnicas rápidas *fingerprint* o huella molecular, que son de alta resolución, permite la distinción de subespecie y cepas. Los fragmentos amplificados por rep-PCR son resueltos en geles de agarosa, obteniéndose patrones complejos con múltiples bandas de distintas intensidades (Rademaker et al., 2000). Dicha técnica se basa en la amplificación de ácidos nucleicos, para lo que es necesario utilizar cebadores diseñados a partir de secuencias repetitivas dispersas en el genoma de distintas especies bacterianas. Entre ellas, se encuentra la técnica PCR-BOX, en la cual se amplifican los elementos Box, que se encuentran distribuidos aleatoriamente en el genoma, y pueden ser indicativos de su estructura y evolución (Mantilla et al., 2004).

La taxonomía polifásica actual que se aplica a la descripción de nuevas especies obliga a que conjuntamente con, los análisis de secuencias se realice una caracterización fenotípica (que incluye morfología, propiedades bioquímicas, fisiológicas y quimiotaxonómicas). (Olga et al, 2011).

Los actinomicetos son también ampliamente conocidos por su amplio metabolismo secundario, donde se produce moléculas biológicas de alto valor comercial. En efecto, este grupo produce aproximadamente dos tercios de los antibióticos antibacterianos (ejemplos

notables son estreptomicina, vancomicina y tetraciclina) actualmente utilizados en clínica, asimismo como muchos antivirales, anticancerígenos, antihelmínticos, antifúngicos o inmunomoduladores (León et al., 2007). Además de su importancia en medicina, los actinomicetos, y particularmente muchas especies del género *Streptomyces*, son bacterias descomponedoras de materia orgánica, por acción de enzimas hidrolíticas. Estas actividades que permiten degradar polímeros complejos como la lignocelulosa, el almidón y la quitina (Crawford et. al, 1993) tienen una gran importancia biotecnológica en muchas industrias.

En los últimos dos años, dentro de un convenio de colaboración entre la Universidad de La Laguna (área de Microbiología del Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética) se han realizado numerosos aislamientos de actinomicetos de diversos suelos de Tenerife. Así, para la realización de este trabajo, se parte de una colección de cultivos puros almacenada en la empresa *Nertalab S.L.* Dichos cultivos fueron aislados a partir de tres ecosistemas de Tenerife: una zona árida del sur de la isla (Güímar), una zona húmeda del bosque de Laurisilva (Parque Rural de Anaga) y una zona de alta montaña (Izaña).

Los primeros datos de este estudio sugieren que el archipiélago de Canarias puede ser un amplio reservorio de actinomicetos. No obstante, aún se desconoce su taxonomía y las relaciones filogenéticas existente entre ellos.

OBJETIVOS

Los objetivos que se plantean para este Trabajo de Fin de Grado son los siguientes:

1. Estimar la diversidad genética de los actinomicetos aislados a partir de huellas genómicas: Perfiles BOX.
2. Caracterización taxonómica de los actinomicetos mediante filogenia por secuenciación del gen del ARN ribosómico 16S.
3. Valorar el potencial biotecnológico de los actinomicetos aislados para producir enzimas degradadoras de polímeros complejos y actividad antibiótica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Medios de cultivos y técnicas para la detección de actividades enzimáticas en actinomicetos:

Para ello se realizan distintos medios de cultivo, de diferente composición, y en ellos se inoculan, utilizando la punta de los palillos estériles, varias cepas de actinomicetos.

Para la detección de las actividades enzimáticas, los actinomicetos se crecieron en placas de Petri con medios de cultivo seleccionados para detectar la actividad deseada, según se detalla a continuación. Estos medios se inoculan utilizando la punta de los palillos estériles, lo que permite ensayar en una sola placa varias cepas de actinomicetos y además, realizar sobre la placa un “punto” de inoculación que permite conseguir el desarrollo de una zona de crecimiento redondeada a modo de colonia.

Para cada actividad se realizaron 3 réplicas de cada uno de los medios de cultivo.

Transcurrido el tiempo de incubación indicado para cada actividad, a 26°C, se tomaron medidas del diámetro de la colonia y del halo en caso de haberlo. El potencial de degradación de las cepas se estimó a partir de la relación entre el diámetro del halo y de la colonia.

Actividad celulolítica:

El medio de cultivo utilizado para estudiar la actividades celulolítica se compone de: fosfato dipotásico (K_2HPO_4), 0.5g/l ; sulfato de magnesio ($Mg SO_4 \cdot 7H_2O$), 0.25g/l ; gelatina, 2g/l y agar, 15g/l.

El pH del medio se ajusta a un valor de 6,8- 7,2 y, luego se añade lentamente y en constante agitación, carboximetilcelulosa, 2g/l como fuente de carbono, y Rojo Congo, 0.1% (en forma de sal sódica). El Rojo Congo es un colorante que presenta afinidad por las fibras de celulosa, formando complejos con moléculas no hidrolizadas (Arenas et al, 2015), por lo que la pérdida de color que se presenta en forma de un halo a su alrededor de las colonias, servirá como indicador de microorganismos que degradan la celulosa.

La actividad celulolítica se midió tras 4 días de incubación, utilizando el ácido acético 2% para dar mayor contraste a los halos.

Actividad amilolítica:

El medio de cultivo para determinar la actividad amilolítica contiene: extracto de carne, 3g/l; NaCl, 6g/l almidón, 2g/l y agar, 15g/l.

Como revelador de los halos de hidrólisis, se utiliza el lugol, ya que éste presenta afinidad por polisacáridos como el almidón. El almidón se colorea de azul intenso en presencia de lugol, debido a la adsorción del colorante sobre las unidades de glucosa en la amilosa (Arenas et al, 2015), y por lo tanto, la formación de un halo alrededor de las colonias indica presencia de actinomicetos degradadores de almidón.

Actividad proteolítica:

El medio de cultivo para determinar la actividad proteolítica presenta como peculiaridad que deben prepararse los ingredientes por separado, para evitar el deterioro de la leche desnatada.

Se usa el medio triptona soja agar (TSA) (*Scharlab S.L*, España) suplementado con leche desnatada, 2% (*Scharlab S.L*, España).

Se realiza una medición a los 4 días, haciendo una observación a contraluz, y a los 7 días se tiñe utilizando 2 ml de Rojo Congo 0.1% como colorante. Transcurridos 15 minutos, se eliminan los restos de éste lavando con solución salina 0.85%. Luego, se añade ácido acético 2% para oscurecer las placas y dar mayor contraste a los halos.

Actividad lipolítica:

El medio de cultivo para determinar la actividad lipolítica está compuesto por: peptona, 10g/l; NaCl, 5g/l; CaCl₂*2H₂O, 2g/l; Agar, 15g/l y Tween 80, 0.01%.

Son incubadas durante 7 días, haciendo mediciones al cuarto y séptimo día. Se observa un precipitado blanco donde haya habido degradación. Es recomendable observar los halos bajo la lupa, ya que a veces es difícil distinguir el precipitado a simple vista.

Análisis estadístico de las actividades enzimáticas:

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó utilizando el programa informático SPSS 22.0. Al tratarse de resultados que no se ajustan a la curva de Normalidad, se utilizaron test no paramétricos para su análisis. Concretamente se realizaron comparaciones de muestras independientes 2 a 2, utilizando el estadístico de Mann-Whitney.

Se tomó como referencia un intervalo de confianza del 95%, por lo que un valor de significación inferior a 0.05 indica que existen diferencias significativas entre las distintas muestras analizadas. Además, se calculó el percentil 90 a partir de los promedios de H/D con el objetivo de detectar qué cepas presentan mejor actividad enzimática.

Técnicas para valorar la actividad antimicrobiana de los actinomicetos:

Para determinar la actividad antimicrobiana de los actinomicetos se realizó el método de la siembra cruzada, en el que el actinomiceto potencialmente productor de actividad antibiótica se crece en una estría central en la placa de Petri con el medio Müller-Hinton (*Scharlab S.L.*, España) y se incuba 7 días hasta que se produce un buen crecimiento, tras lo cual varios microorganismo patógenos se siembran en estrías perpendiculares al actinomiceto central.

Para hacer estos ensayos, se parte de cultivos jóvenes (de 3 a 7 días) de actinomicetos crecidos en un medio YMA (Yeast Malt Agar) (*Scharlb S. L.*, España) o en medios ISP (International Streptomyces Project): como son el medio ISP2 específicos para el aislamiento y caracterización de especies del género *Streptomyces* (Shirling y Gottlieb, 1966). El medio de cultivo ISP2 está compuesto por: extracto de levadura, 4g/l; malta, 10g/l; dextrosa, 4g/l; y agar, 20g/l) y el El medio ISP2 se ajusta a pH 7.3 antes de añadir el agar.

Las placas con estos medios se incuban a una temperatura de 25-28 °C durante 3 días hasta que se produce el crecimiento de los actinomicetos y luego se siembra cada actinomiceto en estría central una placa de Müller-Hinton (*Scharlab S.L.*, España), en estría central. Estas placas se incuban a 26°C durante una semana.

Los microorganismos patógenos utilizados como indicadores para valorar la actividad antimicrobiana se crecen en un medio PCA (Plate Count Agar) (*Scharlab S.L.*, España).

Las placas con estos microorganismos se incuban a 37°C durante 24 horas. Tras este período, se resuspenden en 1 ml de agua destilada estéril, y a partir de esta suspensión líquida se siembran en una estría perpendicular con respecto a la estría central de crecimiento del actinomiceto. Estas placas se incuban a 37°C durante 24 horas, tras lo cual se mide el halo de inhibición del crecimiento, en caso de producirse.

Extracción de ADN genómico:

A partir de un cultivo puro del actinomiceto se tomaron varias colonias y se resuspendieron en un tubo eppendorf con 1 ml de agua destilada para lavarlas. Luego, se centrifugaron a 13.000 rpm durante 15 minutos y se eliminó el sobrenadante. Las células obtenidas, se incubaron en 500 µl de tampón de extracción (30 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA y 0,4% SDS) durante 24 horas a -20°C.

Transcurrido este período, se utilizó arena fina de 0,1-0,6mm (Labkem, España) para homogeneizar las células por cizallamiento. Luego, se sometieron a 3 ciclos que constan de: 1 minuto de agitación a máxima velocidad en el vórtex y 1 minuto de incubación a -20°C, sucesivamente.

A continuación, se centrifugaron, para separar el homogeneizado de la arena. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo eppendorf y se le añadió 275 µl de acetato de amonio. Posteriormente, se sometió a 65°C durante 5 minutos y -20°C durante otros 5 minutos. Se añadió 500 µl de cloroformo y se centrifugó a 13000 rpm durante 2 minutos. Del tubo eppendorf centrifugado, se obtuvo aproximadamente 500 µl del sobrenadante (que se transfirió a un nuevo tubo eppendorf), y se añadió 200 µl de acetato de amonio, cuyos iones eliminan la atmósfera de solvatación del ADN y 800 µl de EtOH, que convierten el ADN en menos soluble y favorece su precipitación. Luego se mantuvo a -20°C durante 20 minutos. Seguidamente se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos, eliminando luego el sobrenadante. El sedimento se lavó con 1 ml de EtOH 70%. Se centrifugó de nuevo, durante 5 minutos, a la misma velocidad. Una vez más, se eliminó el sobrenadante, y cuando se secaron los restos, se añadió 20 µl de agua MQ.

Amplificación por PCR y BOX Fingerprint:

La diversidad infraespecífica de las cepas aisladas se estimó mediante amplificación por PCR de regiones BOX. Se trata de secuencias intergénicas cortas (154 pb) que se encuentra

repetidas a lo largo de todo genoma y que pueden presentarse en ambas orientaciones (Versalovic et al., 1994).

La mezcla de reacción, para un volumen final de 20 µl es: 12,5 µl de Premix Taq (TaKaRa Taq 1,25 units/25µl; dNTP Mixture 2x conc., ea 0,4mM; PCR Buffer, 20 mM Tris-HCl, pH 8.3, 100mM KCl; 3mM MgCl₂); 2,5 cebador BOX (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'); 3ul de agua miliQ estéril y 2ul de ADNg muestra

La amplificación se realizó en un termociclador iCicler™ (BioRad) con los siguientes ciclos:

Tabla 1. Parámetros de ciclado PCR-BOX <i>fingerprint</i>		
Desnaturalización inicial	95°C	7 min
35 ciclos de : Desnaturalización Anillamiento Extensión	94°C	1 min
	52°C	1 min
	72°C	3 min, 50 s
1 ciclo	72°C	10 min
1 ciclo	18°C	∞

Los productos de amplificación se separan en una electroforesis en 100 ml de gel de agarosa al 1,5% con tampón TAE 0,5X (20 mM Tris, 10 mM ácido acético y 0.5 mM EDTA). El ADN se visualiza por tinción con Midori Green. En cada pocillo del gel se cargaron 15µl de la reacción de PCR. Como marcador de peso molecular se utilizó Ladder Takara de 100pb. La electroforesis se realizó aplicando un voltaje inicial de 40V durante los primeros minutos y luego se fue aumentando progresivamente hasta 80V.

La captura de la imagen del gel se realizó con el equipo ImageMaster® VDS asociado al software LISCAP Capture Application,. Posteriormente, las imágenes de los perfiles son procesadas con el software GelComparII (Versión 2.0, Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

El dendograma se construyó usando el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Averages) con el coeficiente de Pearson, considerado el más adecuado para la comparación de este tipo de huellas moleculares de ADN, ya que tiene en cuenta, además de la presencia o ausencia de bandas, la cantidad o intensidad de las mismas.

Amplificación por PCR y secuenciación del gen del ARN ribosómico 16S:

Con el fin de identificar a los actinomicetos aislados a nivel de género y especie se procedió a la amplificación y secuenciación del gen ARN ribosómico 16S, para a partir de esas secuencias construir un árbol filogenético que estime las relaciones entre las cepas aisladas en Tenerife con las cepas tipo de todas las especies de actinomicetos descritos hasta ahora, tomadas de la base de datos la base EZtaxon (https://www.ezbiocloud.net/resources/16s_download) (Yoon et al., 2017).

La mezcla de reacción para la amplificación por PCR, con un volumen final de 20ul consta de: 10 ul de Premix Taq (TaKaRa Taq 1,25 units/25ul; dNTP Mixture 2x conc., ea 0,4mM; PCR Buffer, 20 mM Tris-HCl, pH 8.3, 100mM KCl; 3mM MgCl₂); 6 ul de agua miliQ estéril; 2ul de ADNg muestra; 1ul de los cebadores universales fd1 (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCTCAG- 3') (15 pmoles/ul) y rd1(5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (15pmoles /ul).

La amplificación se realizó en un termociclador Perkin Elmer 9600, con los siguientes parámetros de ciclado:

Desnaturalización inicial	95°C	3 min, 30 s
30 ciclos de:		
Desnaturalización	94°C	1 min, 10 s
Anillamiento	56°C	40 s
Extensión	72°C	2 min, 10 s
Extensión final	72°C	6 min, 20 s

Posteriormente se comprobó la amplificación de los fragmentos del tamaño deseado mediante una electroforesis en geles de agarosa al 1%. Para ello se cargaron: 3ul de la reacción de amplificación. Y como referencia, el marcador Ladder Takara de 100pb.

Una vez se ha comprobado la amplificación correcta de fragmentos adecuados, se prepararon alícuotas para enviar al servicio de secuenciación (MACROGEN Europe o MACROGEN Spain).

Para la secuenciación del gen (casi) completo se emplearon tres cebadores: los dos diseñados en los extremos del gen: fd1 y rd1, utilizados como se mencionó anteriormente para amplificar el gen, y un cebador interno, p5 (5'-CTAACTTCGTGCCAGCAGCCG-3').

Todas las secuencias se analizaron haciendo uso del software MEGA 7 (Kumar, Stecher and Tamura, 2016). Para el alineamiento de las secuencias se utiliza la herramienta Clustal W incluida en el MEGA 7, y para la construcción de los árboles filogenéticos se emplea el método de Neighbour-Joining con el parámetro de distancias Kimura-2 (NJ-K2p). El cálculo del soporte de cada nodo de las ramas se realizó con el método de bootstrap (BS) con 1000 réplicas

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de las actividades enzimáticas en los actinomicetos aislados:

Tras realizar el análisis estadístico con el SPSS se obtiene que la zona de Las Mercedes es la que presenta mayor actividad enzimática, puesto que se obtienen los valores de H/D más altos (a excepción de la actividad lipolítica, que es mayor en Güímar) (Tabla 3); mientras que es Izaña la que presenta menor actividad. Existen diferencias significativas en la actividad celulolítica entre Las Mercedes-Güímar ($U=813.500$, $p=0.005$), y entre Las Mercedes-Izaña ($U=885.000$, $p=0.004$). También en la actividad amilolítica entre Las Mercedes-Güímar ($U=462.500$, $p=0.000$) y Las Mercedes-Izaña ($U=971.000$, $p=0.019$), siendo, en todos los casos, superior en la zona de Las Mercedes. Sin embargo, Izaña contiene un mayor número de cepas con actividad enzimática que superan el Percentil 90 (Tabla 5) mientras que Güímar es la zona con menor número.

Por lo tanto, las actividades llevadas a cabo por los actinomicetos con mayor éxito son las degradadoras de celulosa y almidón. Las cepas que podrían presentar un mayor beneficio, desde el punto de vista biotecnológico, son los actinomicetos aislados en la zona de Las Mercedes.

Tabla 3. Valores H/D medios por actividad enzimática y por localidad

	Las Mercedes	Izaña	Güímar
Proteolítica	1.60	1.28	1.40
Lipolítica	2.24	2.20	2.61
Amilolítica	4.19	3.68	2.85
Celulolítica	4.20	3.40	3.44

Tabla 4. Cepas de actinomicetos que superan el Percentil 90.

Proteolítica		Lipolítica		Amilolítica		Celulolítica	
Cepa	H/D	Cepa	H/D	Cepa	H/D	Cepa	H/D
10E	3.06	i1Q	3.97	i5Mn	9.11	i5Mn	6.33
72Q	3.74	i5	3.55	i6M	6.77	72Q	6.39
74	2.53	g32F	4.27	11Q	6.14	17E	5.25
i14	2.75	g11M	2.90	71Q-G	5.75	91F	5.78
i6M	2.27					1M	5.44
						g99	6.33

Detección de actividad antibiótica en los actinomicetos aislados

Con las cepas seleccionadas, se realizó un ensayo en estría, para comprobar su capacidad de producción de antibióticos. Como patógenos test utilizamos *Escherichia coli* (Gram negativa), *Staphylococcus aureus* (Gram positiva), *Salmonella sp.* (Gram negativa) y *Candida albicans* (levadura). Los resultados obtenidos son los siguientes:

Tabla 5. Actividades antibióticas de las cepas de actinomicetos evaluadas a partir de la inhibición de las estrías de crecimiento de patógenos indicadores. Los grados de inhibición de la estría sembrada de patógeno se indican de la siguiente forma: + (inhibición de 1/3 del crecimiento), ++ (inhibición entre 1/3 y 1/2), +++ (inhibición de más de 1/2).

Cepa	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>S.aureus</i>	<i>C.albicans</i>
72	++	++	+++	-
17E	-	-	+	-
90	++	-	+	-
i3E	+++	++	+++	-
i6E	-	+++	-	-
i19F	+++	++	++	-
111	++	-	+	-
1M	+	-	+	-
20E	-	-	+++	-
i13	+	+	+	-
g15E	++	-	+	-
79F	+++	+++	-	-
g89F	-	-	+	-
74	+++	++	+++	-
g32F	+	-	-	-
87Q	+	+	+++	-
90	+++	-	++	-
g11Q	+	-	-	-
g15M	+	-	++	-
g17M	+	-	+	-
72Q	-	-	++	-
73	+++	+++	+++	-
10E	+++	+++	+++	-

Como se puede comprobar en la Tabla 5, todos los actinomicetos inhiben al menos uno de los patógenos bacterianos. El único patógeno que no fue inhibido por ninguna de las cepas fue el organismo eucariótico, la levadura, *Candida albicans*.

Entre los patógenos inhibidos, *S. aureus* es el microorganismo con un mayor porcentaje de inhibición. Esto puede ser debido a que se trata de una bacteria Gram positiva, ya que en general, las bacterias Gram negativas presentan mayor resistencia a los antibióticos. Una de las razones para ello es que su membrana externa actúa como una barrera que limita la entrada de varios tipos de agentes antibacterianos (Cabrera et al., 2007). Sin embargo, las bacterias Gram positivas, carecen esta membrana externa, y es por ello que presentan mayor vulnerabilidad frente a los agentes antibióticos.

Entre las bacterias Gram negativas, es *Salmonella sp.* la que se muestra más resistente a la actividad antibiótica de los actinomicetos. De este microorganismo se conoce que ha desarrollado multiresistencia a los antibióticos, lo que conlleva el descenso de la acumulación de antibióticos en su interior, su modificación o destrucción, además de mecanismos para la eliminación de éstos al exterior por medio de bombas específicas (Velge et al., 2005).

Caracterización de actinomicetos por secuenciación del gen del ARNr16S:

En función de la localidad de aislamiento y teniendo en cuenta la morfología de las colonias, hifas, producción de pigmentos y los valores de percentil más altos para las actividades enzimáticas (Tabla 4), y a aquellas cepas que produzcan la inhibición de, al menos un patógeno (Tabla 5). Se seleccionaron 25 cepas para la secuenciación del gen del ARN ribosómico 16S.

Las 20 cepas en las que se obtuvo un fragmento de un tamaño suficiente para el análisis filogenético se muestran en la Tabla 6, e incluyen 9 cepas aisladas en Güimar, 5 aisladas en las Mercedes y 6 cepas de Izaña. En la tabla se muestran las similitudes obtenidas para nuestros aislados con las cepas tipo de las especies más próximas utilizando la base EZtaxon (https://www.ezbiocloud.net/resources/16s_download) (Yoon et al., 2017)

Tabla 6. Relación entre las cepas aisladas de cada zona y sus taxones más cercanos.

Cepa	Localidad	Taxón más cercano	Similitud (%)	Fragmento comparado (%)	
g11M	Güimar	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	ATCC 23877 ^T	99.65	97.4
g19F	Güimar	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	ATCC 23877 ^T	99.29	97.4
g17M	Güimar	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	ATCC 23877 ^T	99.07	96.7
g15E	Güimar	<i>Streptomyces thinghirensis</i>	DSM 41919T	98.76	100.0
g28	Güimar	<i>Streptomyces thinghirensis</i>	DSM 41919T	98.87	98.1
g68F	Güimar	<i>Streptomyces thinghirensis</i>	DSM 41919T	99.44	99.3
g15M	Güimar	<i>Streptomyces matensis</i>	NBRC 12889T	98.50	97.5
g32F	Güimar	<i>Streptomyces pseudovenezuelae</i>	DSM 40212T	98.79	97.6
g99	Güimar	<i>Streptomyces xantholiticus</i>	NBRC 13354T	99.85	93.7
73	L.Mercedes	<i>Streptomyces anulatus</i>	NRRL B2000 ^T	100.00	97.9
111	L.Mercedes	<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i>	NRRL B2570 ^T	99.01	98.1
20E	L.Mercedes	<i>Streptomyces setonii</i>	NRRL ISP 5322T	99.91	79.7
10E	L.Mercedes	<i>Streptomyces luridiscabiei</i>	NRRL B24455T	99.57	97.5
1M	L.Mercedes	<i>Streptomyces luridiscabiei</i>	NRRL B24455T	99.37	98.5
i3E	Izaña	<i>Streptomyces pratensis</i>	ch24T NR 125621	98.89	96.4
i1Q	Izaña	<i>Streptomyces rhizosphaerihabitans</i>	JR-35T	99.52	100.0
i2F	Izaña	<i>Streptomyces hundertgensis</i>	MBRL 251 ^T	99.44	98.1
i14	Izaña	<i>Streptomyces longisporus</i>	ISP 5166T	98.94	100.0
i13	Izaña	<i>Streptomyces cinereorecta</i>	NBRC15395T	99.29	98.1
I6E	Izaña	<i>Nocardia ninae</i>	OFN 02.72(T)	95.64	99,3

Para las cepas de Güimar, el árbol filogenético (Figura 3) basado en la comparación de las secuencias del ARN ribosómico 16S muestra que las cepas aisladas en esta localidad, en general, son más próximas entre sí, quedando 7 de las 9 cepas dentro de un gran *clúster*, que incluye también varias cepas tipo de varias especies.

Tres aislados de Güimar (g11M, g17M y g19F) tienen a *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877^T como especie más próxima, con similitudes de 99,65%, 99,29 y 99,07%, respectivamente. En consecuencia, esas cepas se agrupan en una misma rama; sin embargo, el bajo valor de bootstrap, 60%, no apoya que necesariamente pertenezcan a la misma especie. Cabe destacar que las cepas g17M y g19F presentan actividad antibiótica frente a los mismos patógenos (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*).

Otros tres aislados de Güímar, g15E, g28 y g68F presentan mayor similitud con la especie *Streptomyces thinghirensis* DSM 41919^T (98,76%, 98,87 y 99,44%, respectivamente), una especie que presenta una ecología muy distinta, ya que *S. thinghirensis* fue aislada al sur de Marruecos, de la rizosfera y plantas de la especie *Vitis vinífera* (Loqman et al., 2009). El hecho de que las identidades para las cepas g15E, g28 sean inferiores al 99% con *S. thinghirensis* claramente indica que aunque esta especie es la más cercana, estas cepas no pueden ser incluidas en ella y deben representar una especie nueva. Estas tres cepas de Tenerife presentan actividad antibiótica frente a *S. aureus*, *E. coli* y *Salmonella sp.* y difieren por lo tanto también de *S. thinghirensis* en las actividades (*S. thinghirensis* tiene actividad frente a múltiples microorganismos entre los que se encuentran: *Candida albicans*, *Bacillus cereus* o *E. coli*). Morfológicamente presentan cierta similitud con esta especie ya que *S. thinghirensis* se caracteriza por presentar hifas abundantes, un micelio aéreo blanco-grisáceo y produce un pigmento difusible amarillo, mientras que las tres cepas producen esporas blanco-grisáceas. Además g28 produce pigmentos difusibles, aunque de color rojo-rosado. La filogenia por el ARNr 16s presenta cierta correlación con algunas características fenotípicas que presenta *Streptomyces thinghirensis* con el aislado g68F, siendo éste también productor de pigmentos amarillos difusibles y, como se ha descrito anteriormente en el laboratorio, presenta actividad antibiótica frente a *Candida albicans*.

Por último, los otros dos aislados de Güímar ocupan posiciones más distantes. La cepa g32F con un 98.79% se agrupa con *Streptomyces pseudovenezuelae* DSM 40212^T, mientras que g99 tiene una secuencia casi idéntica (99,85% de similitud) a *Streptomyces xantholiticus* NBRC 13354^T.

Los aislados de Las Mercedes están incluidos en otra gran rama principal que incluye diversas especies tipo de actinomicetos y también dos aislados de Izaña. Dentro de este gran grupo, las subramas que incluyen a los aislados canarios muestran valores de bootstrap bajos (<50%), lo que sugiere que cada aislado puede representar una especie distinta.

Entre las cepas aisladas de Las Mercedes, dos cepas (10E y 1M) presentan la similitud más alta por encima del 99%, con la especie *Streptomyces luridiscabiei* NRRL B24455^T, ahora bien, la ausencia de un valor alto de bootstrap, indica que ésta es la especie más próxima pero nuestros aislados son un linaje nuevo que representaría una especie distinta. Estas dos cepas de Güímar presentan un porcentaje de similitud entre sí del 99.4%. Además, entre ellas presentan gran similitud morfológica, siendo colonias redondeadas con numerosos pliegues y

esporas blancas al borde de la colonia. Ambas tienen actividad antibiótica frente a patógenos como *E. coli* y *S.aureus*.

Los otros dos aislados que se muestran más próximos en el árbol filogenético son las cepas 111 y 73, las cuales también guardan un alto porcentaje de similitud con las especies *Streptomyces cyaneofuscatus* (NRRL B2570^T, 99.01%) y *Streptomyces anulatus* (NRRL B2000^T, 100%), respectivamente. Éstas también tienen similitud morfológica entre ellas, colonias redondeadas con pliegues y esporas blancas. Del mismo modo que las anteriores, presenta actividad antibiótica frente a *E. coli* y *S.aureus*.

El otro aislado, 20E, se muestra más alejado de las anteriores en el árbol filogenético y su especie más cercana es *Streptomyces setonii* NRRL ISP 5322^T, con 99.91% de similitud (este resultado hay que tomarlo con precaución porque la secuencia fue relativamente corta, unos 1000 nucleótidos). Al igual que ocurre con los aislados de Güimar, los bajos valores de bootstrap parecen apoyar la teoría de que probablemente las cepas aisladas puedan representar una nueva especie.

En el caso de los aislados en la zona de Izaña, éstos muestran una mayor divergencia entre ellos y en consecuencia aparecen en distintas ramas por todo el árbol filogenético. Es interesante el hecho de que dos cepas aisladas en Izaña, i13 e i3E, presenten las similitudes más altas con cepas de los suelos de Las Mercedes (1M, 10E, 111 y 73). El taxón más cercano para la cepa i13 es *Streptomyces cinereorecta* (NBRC 15395^T) con un porcentaje de similitud de 99.29%. Ésta ocupa una posición muy cercana a los dos aislados 1M y 10E de Las Mercedes. En una rama adyacente a éstas, se encuentra la cepa i3E, cuyo taxón más cercano es *Streptomyces pratensis* (ch24^T NR 125621, 98.89%).

Los otros cuatro aislados de Izaña ocupan ramas distantes entre sí y con el resto de aislados. Para la cepa i2F, la especie más próxima es *Streptomyces hundungensis* (MBRL 251^T, 99.44%). La especie más cercana a i1Q es *Streptomyces rhizosphaerihabitans* (JR-35^T, 99.52%), y aparecen juntos en una rama con un valor de bootstrap del 99%, lo que apoya la relación. El aislado i14, tiene como especie más próxima a *Streptomyces longisporus* (ISP 5166^T, 98.94%) y el apoyo de esta rama es del 100%.

Por último, la cepa aislada denominada i6E, es la única que aparece en una rama que se sitúa fuera del género *Streptomyces*, y pertenece al género *Nocardia*, su taxón más cercano es *Nocardia ninae* (OFN 02.72^T, 95.64%), pero la baja similitud es indicativo de que i6E representa una especie distinta.

Así, entre la diversidad de actinomicetos estudiados en distintas zonas de Tenerife, hemos descubierto que con una excepción, todas las cepas se engloban dentro del género *Streptomyces*, donde ocupan distintas ramas próximas a especies muy diversas de este género. Los porcentajes de similitud y/o valores de bootstrap sugieren, sin embargo, que muchas de ellas son especies nuevas. La excepción está representada por un aislado de Izaña, la cepa i6E, que se encuadra dentro del género *Nocardia*.

Estos resultados no son extraños si pensamos que el género *Streptomyces* es uno de los más frecuentes en los suelos, en el cual se han descrito más de 500 especies. Las especies de *Streptomyces* producen más de la mitad de los antibióticos conocidos derivados de fuentes microbianas y de utilidad en uso clínico, y es por ello que este grupo de actinomicetos han sido los más aislados y estudiados (Berdy, 2005). Muchos miembros de este grupo, también desempeñan un papel importante en la biodegradación y biorremediación (Ishiyama et al., 2004).

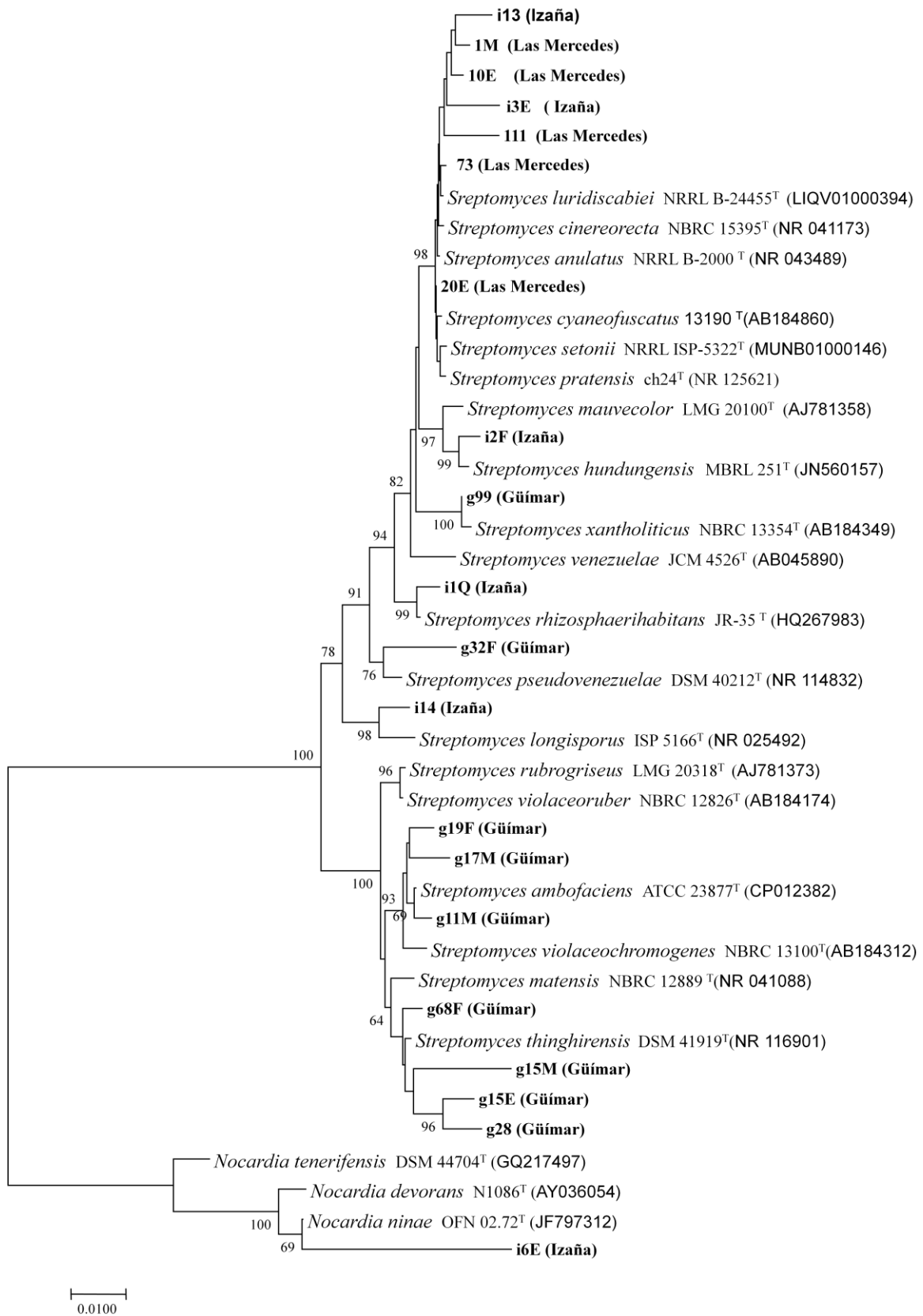


Figura 3. Árbol filogenético, basado en la comparación de las secuencias del ARN ribosómico 16S entre las cepas aisladas y las cepas tipo.

Estimación de la diversidad genética mediante Perfiles Box:

Los perfiles BOX obtenidos de la amplificación de regiones del genoma comprendidas entre las regiones repetidas BOX, producen huellas moleculares, que permiten la distinción de cepas a nivel infraespecífico con alto nivel de resolución. Así, es posible diferenciar distintas cepas dentro de una misma especie, lo cual es de interés, puesto que éstas podrían presentar diversas actividades. Además, otro de sus usos es comprobar si existe redundancia entre ellas. Sin embargo, cabe destacar que la técnica de los perfiles BOX no necesariamente tiene connotaciones taxonómicas, por lo tanto, aquello que aparece agrupado no tiene por qué tener una relación filogenética.

Para ver la reproducibilidad de la técnica, en algunas algunas cepas (71Q-R, i6E, i1Q, i3E y 10E) se realizó una segunda extracción y amplificación, y se corrió en geles distintos, puesto que se ha comprobado que en actinomicetos llega a tener valor filogenético precisamente por su elevada reproducibilidad (Versalovic et al., 1994). Así, se han obtenido bandeados muy similares, por lo tanto esto indica que se trata de una técnica reproducible.

Los perfiles obtenidos para nuestros aislados mostraron una gran diversidad (Figura 4). Las cepas que mostraron el perfil más similar (con un 96% similitud) son de Las Mercedes (1M y 111). Curiosamente, estas dos cepas se encuentran agrupadas en una misma rama del árbol filogenético del gen del ARN ribosómico 16S (Fig.3). Esto podría indicar que pueden ser dos cepas redundantes de la misma especie.

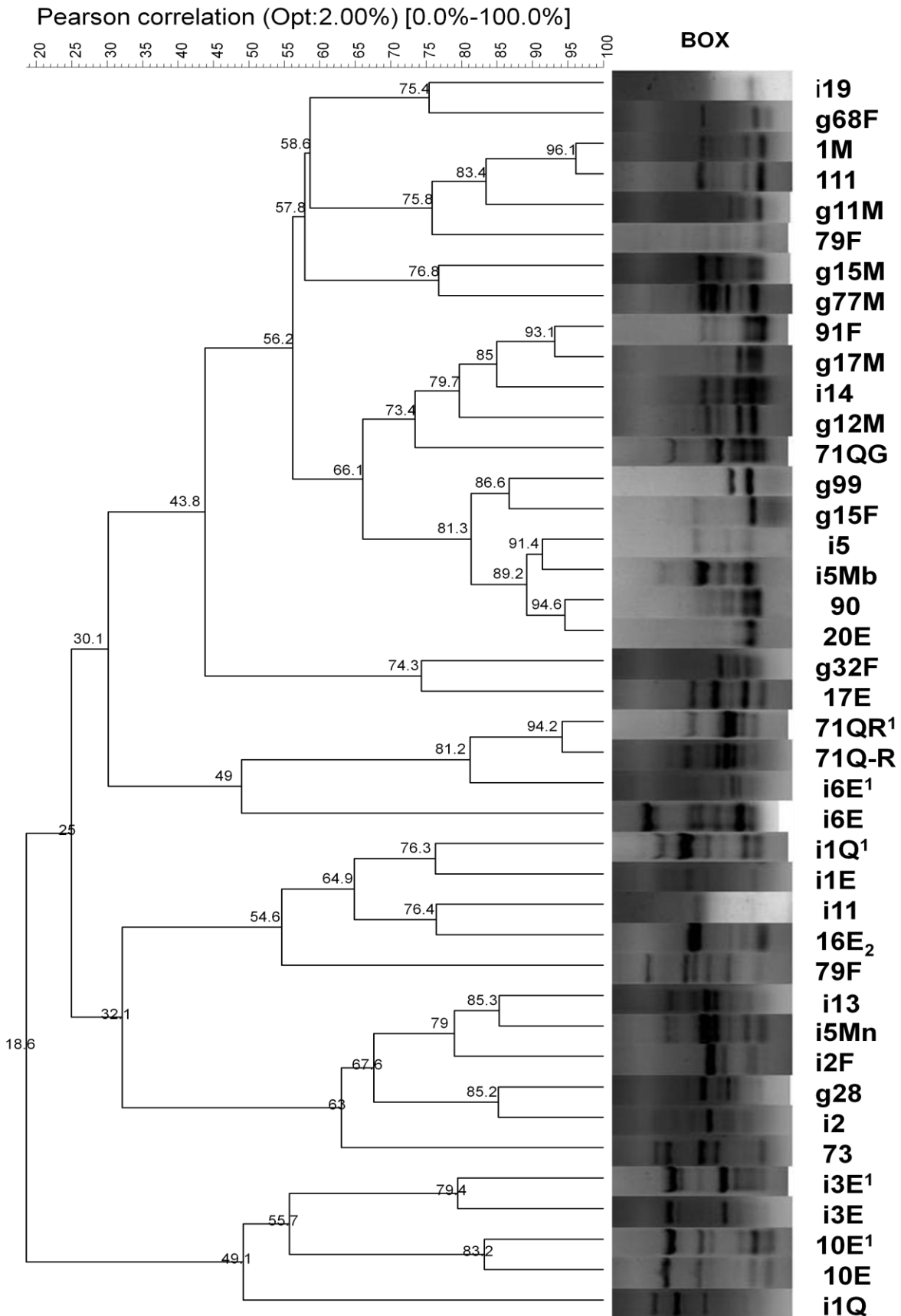


Figura 4. Perfiles Box de cepas aisladas en distintas zonas de Tenerife. El superíndice¹ indica que es una réplica, realizada en un gel de electroforesis distinto.

CONCLUSIONES:

1. Las cepas de actinomicetos aisladas en los suelos de Tenerife pertenecen todos al género *Streptomyces*, a excepción de una cepa que se incluye en el género *Nocardia*.
2. Dentro del género *Streptomyces* los porcentajes de similitud y la posición en subramas independientes sugieren que muchas cepas representan nuevos linajes compatibles con nuevas especies.
3. Los perfiles BOX demostraron una alta diversidad genética entre cepas aisladas en estos suelos.
4. La detección de la capacidad para producir enzimas hidrolíticas y antibióticos, denotan, en general, un elevado potencial biotecnológico entre las cepas aisladas.
5. Las cepas aisladas en la zona de Las Mercedes son las que presentaron mayor rendimiento en las actividades enzimáticas, por lo que podrían ser las que aportaran un mayor beneficio.

CONCLUSIONS :

1. The strains of actinomycetes isolated in the soils of Tenerife belong all to the genus *Streptomyces*, except for a strain that is included in the genus *Nocardia*.
2. Within the genus *Streptomyces* the percentages of similarity and the position in independent subbranches suggest that many strains represent new lineages compatible with new species.
3. BOX profiles showed a high genetic diversity among isolated strains in these soils.
4. The detection of the capacity to produce hydrolytic enzymes and antibiotics, denote, in general, a high biotechnological potential among the isolated strains.
5. The isolates in the zone of Las Mercedes are those that showed higher yield in the enzymatic activities, so they could be those that provide a greater benefit.

BIBLIOGRAFÍA

- Aigle, B., Lautru, S., Spitteller, D., Dickschat, J. S., Challis, G. L., Leblond, P. y Pernodet, J. L.** 2014. Genome mining of *Streptomyces ambofaciens*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **41**, 251-263.
- Arenas, S. F. G., González, L. F. S., & Cardozo, D. C. D.** 2015. Caracterización de microorganismos celulolíticos y amilolíticos de residuos sólidos orgánicos dispuestos en la planta Ecosangil del municipio de San Gil, Santander. *Matices tecnológicos*, **5**.
- Berdy, J.** 2005. Bioactive microbial metabolites. *The Journal of antibiotics*, **58**, 1–26
- Cabrera, C. E., Gómez, R. F., y Zúñiga, A. E.** 2007. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica*, **38(2)**, 149-158.
- Charan, R. D., Gerhard, S., Janso, J., Bernan, V., Feng, X., et al.** 2004. Diazepinomicin, a New Antimicrobial Alkaloid from a Marine Micromonospora sp. *Journal of Natural Products*, **67 (8)**, 1431-1433.
- Crawford, D. L., Lynch, J. M., Whipps, J. M., Ousley, M. A.** 1993. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Applied and environmental Microbiology*, **59(11)**, 3899-3905.
- Dilip, C. V., Mulaje, S. S., Mohalkar, R. Y.** 2013. A review on actinomycetes and their biotechnological application. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, **4(5)**, 1730.
- Genilloud, O., González, I., Salazar, O., Martín, J., Tormo, J. R., Vicente, F.** 2011. Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **38(3)**, 375-389.
- Gonzalez, J. A. R.** 2014. Búsqueda de enzimas lipolíticas de interés biotecnológico en actinomicetos del desierto de Sonora.
- Hirsch, C. F. y Christensen, D.** 1983. Novel Method for Selective Isolation of Actinomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, **46 (4)**, 925-929.
- Ishiyama, D., Vujaklija, D. y Davies, J.** 2004. Novel pathway of salicylate degradation by *Streptomyces* sp. strain WA46. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 1297–1306.
- Jiménez, P. y Elisa, M.** Determinación de la actividad celulolítica, ligninolítica y amilolítica de actinobacterias aisladas de suelo rizosférico de trébol blanco (*Trifolium Repens*) (Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias).
- Kämpfer, P.** 2006. The Family Streptomycetaceae, Part I: Taxonomy. En *The Prokaryotes* (Vol. 3, págs. 538-604). Springer New York.
- Kroppenstedt R.M., Mayilraj S., Wink J.M., Kallow W., Schumann P., Secondini C. y E. Stackebrandt.** 2005. Eight new species of the genus *Micromonospora*, *Micromonosporacitrea* sp. nov., *Micromonosporaechinaurantiaca* sp. nov., *Micromonosporaechinofusca* sp. nov., *Micromonosporafulviviridis* sp. nov., *Micromonosporainyonensis* sp. nov., *Micromonosporapeucetia* sp. nov., *Micromonosporasagamiensis* sp. nov., and *Micromonosporaviridifaciens* sp. nov.. *Syst. Appl. Microbiol.* **28(4)**, 328-39.

- León, J., Liza, L., Soto, I., Cuadra, D., Patiño, L., y Zerpa, R.** 2007. Actinomycetes bioactivos de sedimento marino de la costa central del Perú. *Revista Peruana de biología*, **14(2)**, 259-270.
- Loqman, S., Bouizgarne, B., Barka, E. A., Clement, C., von Jan, M., Sproer, C., ... y Ouhdouch, Y.** 2009. *Streptomyces thinghirensis* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Vitis vinifera*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **59**, 3063-3067.
- Mantilla, J. R., García, I., Espinal, P. A. y Valenzuela, E. M.** 2004. Estandarización y evaluación de tres sistemas de rep-PCR para la tipificación de *Klebsiella pneumoniae*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, **33**, 1.
- Park, D. H., Kim, J. S., Kwon, S. W., Wilson, C., Yu, Y. M., Hur, J. H., y Lim, C. K.** 2003. *Streptomyces luridiscabiei* sp. nov., *Streptomyces puniscabiei* sp. nov. and *Streptomyces niveiscabiei* sp. nov., which cause potato common scab disease in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**, 2049-2054.
- Quiñones-Aguilar, E. E., Evangelista-Mar, Z. y Rincón-Enríquez, G.** 2016. Los actinomicetos y su aplicación biotecnológica.
- Rademaker, J. L., Hoste, B., Louws, F. J., Kersters, K., Swings, J., Vauterin, L., y de Bruijn, F. J.** 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **50(2)**, 665-677.
- Savi, D. C., Aluizio, R., Galli-Terasawa, L., Kava, V. y Glienke, C.** 2016. 16S-gyrB-rpoB multilocus sequence analysis for species identification in the genus *Microbispora*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **109(6)**, 801-815.
- Shirling, E. T., y Gottlieb, D.** 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **16(3)**, 313-340.
- Soler-Hernández, Albert** 2012. Biodiversidad de actinomicetos aislados de plantas depuradoras de aguas residuales. Estudio de la capacidad de biodegradación de compuestos tóxicos.
- Stackebrandt, E., Rainey, A. y Ward-Rainey, N.** 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **47**:479-491.
- Velge, P., Cloeckert, A., y Barrow, P.** 2005. Emergence of *Salmonella* epidemics: The problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Vet. Res*, **36**, 267-288.
- Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F. J., & Lupski, J. R.** 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in molecular and cellular biology*, **5(1)**, 25-40.
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H. and Chun, J.** 2017. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **67**:1613-1617