

Aislamiento y caracterización de una cepa de *Streptomyces thermocarboxydus* con actividad antibiótica

Mariana Ávalos-García, Beatriz Ruiz-Villafán*, Romina Rodríguez-Sanoja y Sergio Sánchez

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, CDMX, AP 70228, CP 04510.

**beatrizruiz@biomedicas.unam.mx*

Resumen

El género *Streptomyces* es un grupo de microorganismos de gran importancia industrial pues son los principales productores de los antibióticos que se comercializan actualmente. A pesar de que se han descrito muchas biomoléculas producidas por las actinobacterias, el porcentaje de nuevos antibióticos descubiertos es muy bajo. Por otra parte, la resistencia de microorganismos patógenos a los antibióticos de uso corriente se incrementa cada día, por lo que cobra vital importancia la búsqueda de nuevos antibióticos para combatirlos. En el presente trabajo se aisló una actinobacteria de una muestra de suelo del Valle de Chalco, Estado de México, México. El microorganismo aislado fue identificado preliminarmente como *Streptomyces thermocarboxydus* K155 y produjo actividad antibiótica contra una serie de cepas de prueba (>20 mm de diámetro de halo de inhibición) cuando fue crecido en medio YMG. Se realizó una extracción del medio de fermentación con metanol y se fraccionó por medio de cromatografía en columna de sílice 100. Las fracciones activas fueron seleccionadas por bioensayo y se continuó su purificación por HPLC. Aunque la identificación estructural final de la molécula bioactiva no fue posible, algunas de las propiedades fisicoquímicas del metabolito como son su solubilidad, polaridad, espectro de absorción UV y termoestabilidad nos proporcionaron pistas sobre el posible carácter químico de la molécula responsable de la actividad antibiótica.

Palabras clave: *Streptomyces*, antibióticos, actinobacterias, árbol filogenético, ADN ribosomal, caracterización polifásica

Abstract

The genus *Streptomyces* comprise a group of microorganisms of great industrial importance because they are the main source of the antibiotics currently commercialized. Although many biomolecules produced by actinobacteria have been described, the percentage of new antibiotics discovered is very low. On the other hand, the resistance of pathogenic microorganisms to the antibiotics of current use increases every day, making the search for new antibiotics of vital importance to fight against resistant pathogens. In the present work, an actinobacteria was isolated from a soil sample from the Chalco Valley, Estado de México, México. The isolated microorganism was preliminarily identified as *Streptomyces thermocarboxydus* K155 and it was found that produce antibiotic activity against a series of test strains (> 20 mm diameter inhibition halo) when grown in YMG medium. An extraction of the fermentation medium with methanol was carried out and fractionated by means of chromatography on a silica column 100. The active fractions were determined by bioassay and their purification was continued by HPLC. Although the final structural identification of the bioactive molecule was not possible, some of the metabolic physicochemical properties such as its solubility, polarity, UV absorption spectrum and thermostability gave us clues about the possible chemical character of the molecule responsible for the antibiotic activity.

Key words: *Streptomyces*, antibiotics, actinobacteria, phylogenetic tree, ribosomic DNA, polyphasic characterization

Introducción

A pesar de que existe un gran número de antibióticos de uso en medicina humana y veterinaria, en la actualidad el número de cepas resistentes a estos antibióticos ha aumentado dramáticamente (Lukacisinová & Bollenbach, 2017). Por ello, resulta relevante el estudio de alternativas microbianas para la producción de antimicrobianos que pudieran resultar novedosos y con potencial para su uso en la industria farmacéutica.

Se sabe que los estreptomicetos producen una gran cantidad de antibióticos y otros metabolitos secundarios activos, como antitumorales, herbicidas y antihelmínticos. De los antibióticos conocidos provenientes de microorganismos, la mayor parte son producidos por este género. Incluso, si se toman en cuenta otro tipo de actividades biológicas, además de la antimicrobiana, las actinobacterias producen la mayoría (60%) de estos compuestos, y dentro de esta familia,

Streptomyces produce el 80% de estas sustancias (Kieser et al., 2000).

Materiales y Métodos

Identificación preliminar de la cepa de Streptomyces sp. K155 por su secuencia de ADNr 16S

El aislamiento de la bacteria se hizo a partir de una muestra de suelo de la región de Valle de Chalco del Estado de México, México. La cepa aislada se conservó en forma de esporas en una suspensión de glicerol al 20%v/v a -20°C. A partir de esta suspensión se realizaron los estudios subsecuentes. Para la caracterización de la bacteria se empleó un enfoque polifásico, con ello, se estudiaron sus características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y genéticas (secuencia de ADN ribosomal 16S).

La secuencia de ADN ribosomal se obtuvo mediante PCR usando como molde el ADN genómico de la cepa. Para la amplificación se utilizaron los primers fD1 (ccgaattcgtcgacaacAGAGTTTGATCCTGGC TCAG) y RD1 (cccgggatccaagcttAAGGAGGTGATCCAGCC) reportados en Weisburg et al., (1991). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 25 ciclos de 94°C (30 s), 56.5°C (1 min), 72°C (2 min) y una extensión final de 72°C por 7 minutos. La secuencia obtenida se comparó contra secuencias de la base de datos BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for

Biotechnology Information) y del Ribosomal Database Project (RDP). La secuencia se comparó y alineó empleando el programa MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation) con aproximadamente 500 secuencias de ADN ribosomal 16S reportadas en el RDP correspondientes a las especies aisladas y tipificadas, en la taxonomía de este género. Con la finalidad de facilitar la visualización del árbol filogenético, se construyó utilizando solamente 65 de estas secuencias más la secuencia de *Streptomyces* sp. K155, en el programa MEGA 7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Kumar et al., 2016). El alineamiento de las 66 secuencias se realizó con MUSCLE y se seleccionó el modelo evolutivo que ajustara mejor a los datos con el programa JModelTest (Darriba et al., 2012, Guindon y Gascuel, 2003). De este modo, la inferencia de la historia evolutiva se hizo con el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de GTR+I+G (General Time Reversible) partiendo de un árbol inicial construido con el método de Neighbor-Joining (Lanave et al., 1984, Tavaré 1984, Rodríguez et al., 1990).

La construcción del árbol filogenético de 49 cepas de *S. thermocarboxydus*, *S. lusitanus* y *S. spinoverrucosus*, más *Streptomyces* sp. K155 (número de acceso en Genbank MK537326) se realizó siguiendo la misma estrategia arriba mencionada, excepto que el modelo que se ajustó mejor a los datos fue HKY+G+I (Hasegawa-Kishino-Yano, Hasegawa et al., 1985). Para la construcción

final de ambos árboles se ejecutaron 1000 muestreos para cada uno (bootstrap).

Adicionalmente se realizó un ensayo de hibridación ADN-ADN (Tourova & Antonov, 1987) empleando el ADN genómico completo de *Streptomyces* sp. K155 y el ADN genómico de la cepa más cercana encontrada después de realizar el análisis filogenético.

Caracterización morfológica de Streptomyces sp. K155

Las características morfológicas se determinaron con base en lo reportado por Shirling & Gottlieb (1966) para discriminar la formación de micelio aéreo, el color y la producción de pigmentos solubles difusibles al medio de cultivo. Para lo anterior, se utilizaron los medios señalados por el International *Streptomyces* Project (ISP) como son ISP-1 a 5 (BD-Difco) y los medios de tripticaseína-agar, agar nutritivo (BD-Difco) y agar soya-manitol (Kieser et al., 2000). También se observó la producción de esporas, su forma y tamaño empleando un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-6360LV Scanning Electron Microscope).

Caracterización fisiológica

Se determinó el efecto de las condiciones de cultivo sobre el crecimiento de la cepa de *Streptomyces* sp. K155 en matraces bafleados de 250 ml con 50 ml de medio TSB (Tryptic Soy Broth, BD-Difco) y se determinó la cantidad de biomasa después de

48 h de incubación, por peso seco. Para el pH óptimo se ajustó inicialmente a pH 4, 5, 6 y 7 con HCl y a pH 8, 9 y 10 con NaOH, se incubó a 29°C con agitación a 180 rpm. Para la temperatura se incubó a las temperaturas: 29, 37, 45, 50 y 52°C, con agitación a 180 rpm.

Se determinó la tolerancia a NaCl de la cepa K155 mediante su adición a concentraciones 4, 7, 10 y 13%w/v, incubándose a 29°C y 180 rpm de agitación.

La capacidad de la cepa K155 de *Streptomyces* para emplear diversos carbohidratos como única fuente de carbono fue evaluada con el kit API 50CH de Biomérieux. La inoculación de las galerías se llevó a cabo siguiendo la ficha técnica del fabricante. Por cada ampolla de medio de cultivo (proporcionada en el kit) se emplearon 100 µL de la suspensión de esporas previamente lavadas para eliminar el glicerol y suspendidas en solución salina isotónica.

También se determinó la presencia de ácido L-diaminopimélico en la pared celular según Stanek & Roberts, (1974).

Ensayo de actividad antibiótica

La actividad antibiótica se escaneó empleando un ensayo cualitativo mediante estría cruzada, enfrentando directamente a la cepa de *Streptomyces* contra las cepas de prueba seleccionadas: *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*.

Producción y ensayos de purificación del metabolito bioactivo

La producción del metabolito secundario con actividad antibiótica se realizó en medio YMG modificando las concentraciones de sus componentes para obtener una mayor cantidad de antibiótico reflejada en un mejor efecto inhibitorio.

El aislamiento y purificación del compuesto responsable de la actividad antibiótica se realizó empleando un enfoque bidirigido, que consistió en llevar a cabo la purificación siguiendo la actividad antibiótica contra *M. luteus*.

El cultivo a partir del cual se realizó el aislamiento del compuesto activo se incubó por 6 días a 29°C, 180 rpm. La extracción se realizó con metanol previa eliminación del agua mediante liofilización. El metanol fue evaporado y el residuo se suspendió en una mezcla de acetonitrilo:agua (7:3), este extracto fue fraccionado mediante cromatografía en columna (1 m x 2 cm) empacada con sílica gel 100 (Merck). La elución se llevó a cabo empleando un gradiente de acetonitrilo:agua. Se determinaron las fracciones activas por medio de ensayos de antibiosis. Todas las fracciones que presentaron actividad antibiótica se combinaron y a la mezcla resultante se le determinó la concentración inhibitoria 50 según Wiegand et al., (2008) contra *M. luteus* y *S. cerevisiae*. La purificación final se hizo mediante HPLC con el equipo Varian ProStar

con detector UV-Vis, empleando una columna de Macherey-Nagel Nucleodur C18 Pyramid de 5 µm y acetato de trietilamonio (TEAA) como fase móvil.

Resultados

Identificación de la cepa de Streptomyces sp. K155

La secuencia de ADN ribosomal 16S de *Streptomyces* sp. K155 mostró una mayor similitud con las cepas *Streptomyces thermocarboxydus* y *Streptomyces aureus*, en una búsqueda preliminar con el programa BLAST. Al construir un árbol filogenético con esta secuencia se encontró una mayor relación con la especie *S. thermocarboxydus* DSM 44293 ya que se agrupan en el mismo clado, a diferencia de *S. aureus* que se agrupa con *Streptomyces scabies* y *Streptomyces diastatochromogenes* (Fig. 1). La cercanía a la especie *thermocarboxydus* se hizo más patente en la construcción de otro árbol filogenético en donde se tomaron en cuenta las especies más cercanas a *Streptomyces* sp. K155 (Fig. 2). Sin embargo, con respecto a las características fisiológicas reportadas para esta cepa por Kim et al., (1998) se habían observado varias diferencias, por lo que se consideró necesaria la caracterización polifásica que permitiera discernir si *Streptomyces* sp. K155 era una nueva variedad, para lo cual se empleó la cepa *S. thermocarboxydus* DSM 44293 con fines de comparación.

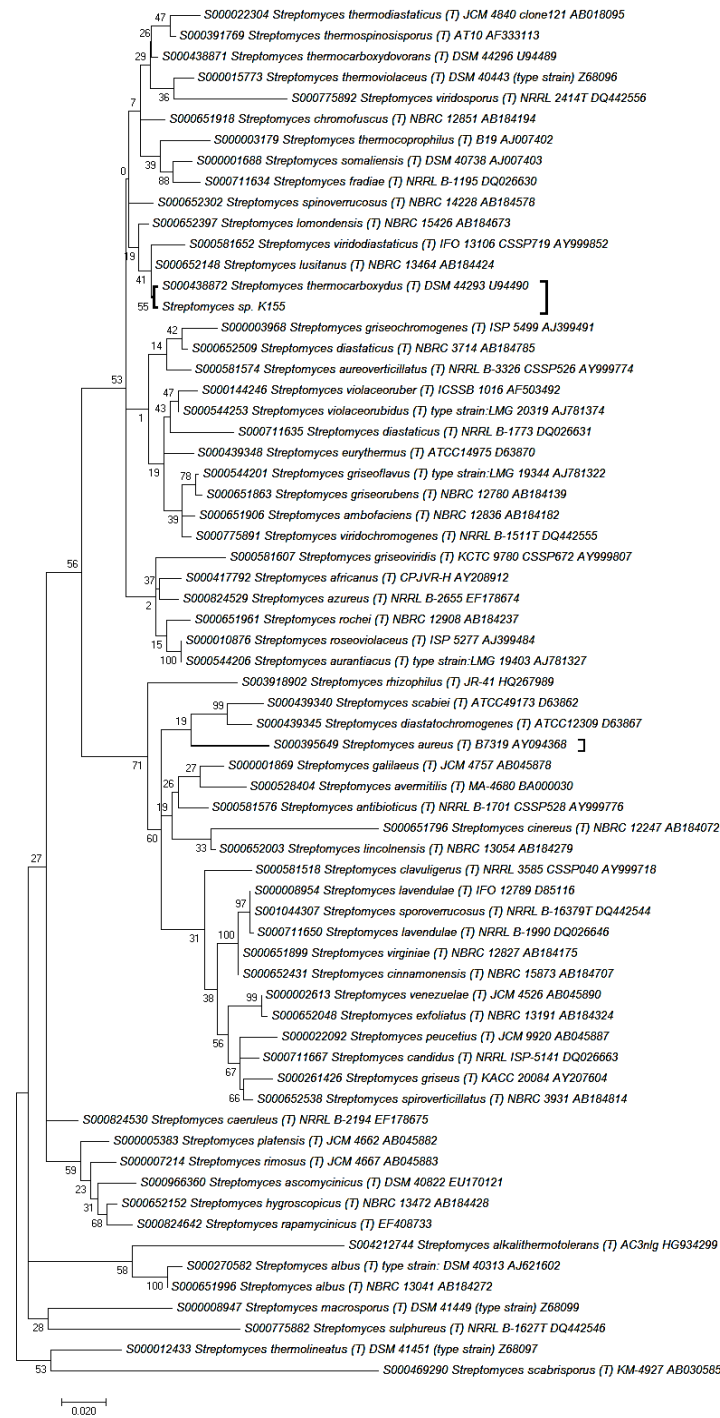


Figura 1. Árbol filogenético construido con 65 secuencias de ADNr 16S del género *Streptomyces* más la secuencia de *Streptomyces* sp. K155. En brackets negritos se muestra el sitio en donde se agrupa la cepa *Streptomyces* sp. K155. La historia evolutiva se construyó con el método GTR+G+, con 1000 muestras (Bootstrap) usando el programa Mega 7. Los números de acceso de Genbank de las secuencias de ADNr 16 S están al final del nombre de cada cepa, por ejemplo, la de *Streptomyces viridodiataticus* IFO13106 es AY999852.

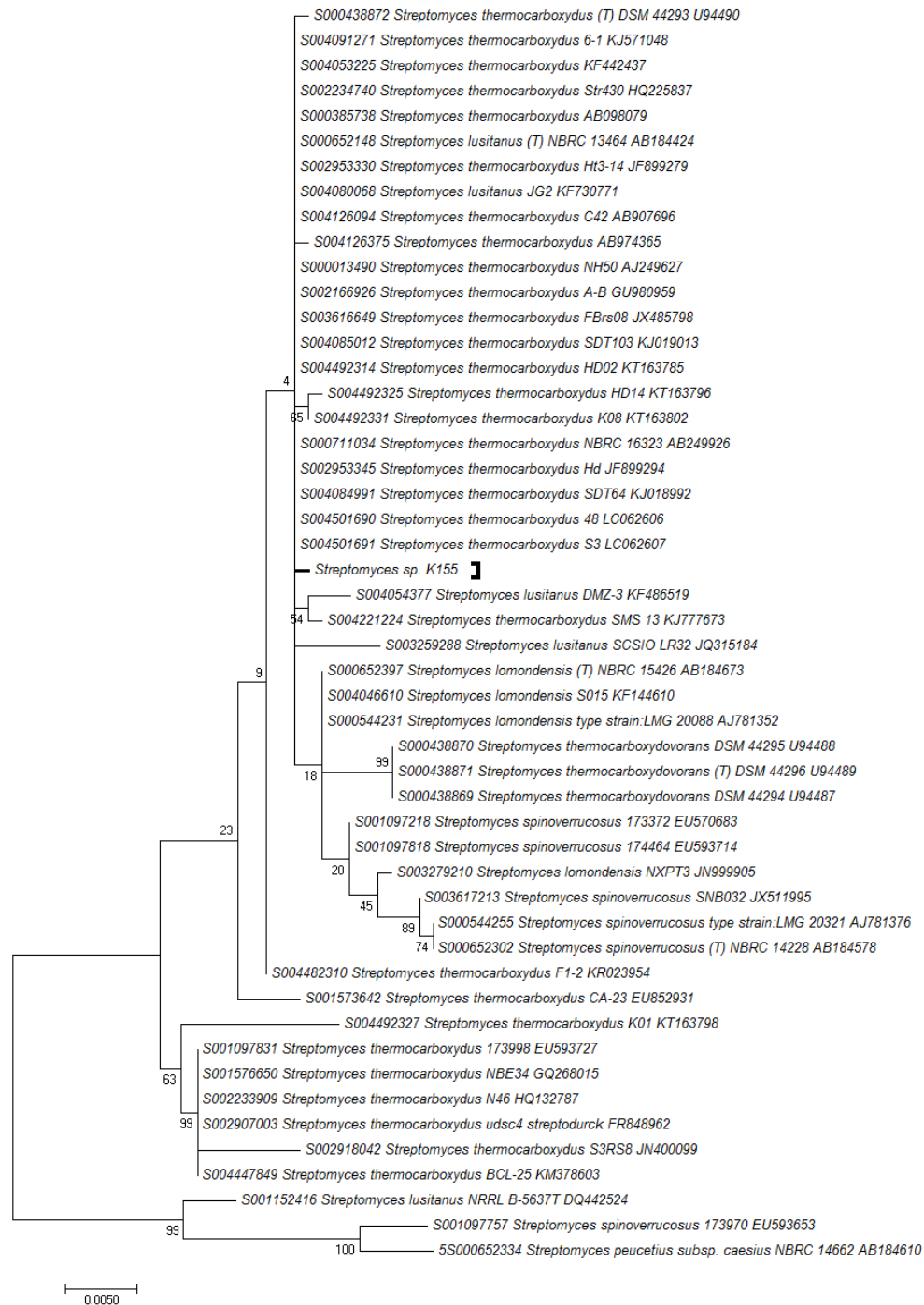


Figura 2. Árbol filogenético elaborado con las secuencias de ADNr 16S de la cepa K155 y las especies más cercanas, *S. thermocarboxydus*, *S. lusitanus* y *S. lomondensis*. En brackets negritos se muestra la cepa K155. La historia evolutiva se construyó con el método HKY+G+I, con 1000 muestras (Bootstrap) usando el programa Mega 7. Los números de acceso de Genbank de las secuencias de ADNr 16 S están al final del nombre de cada cepa, por ejemplo, la de *Streptomyces lusitanus* DMZ-3 es KF486519.

Características y diferencias entre la cepa de Streptomyces sp. K155 y S. thermocarboxydus DSM 44293

En la tabla 1 se indican las características del color del micelio aéreo en diferentes medios de cultivo definidos por el International *Streptomyces* Project (ISP) para la clasificación del género de estas bacterias. Podemos observar que en todos estos medios de cultivo sólido el color del micelio de la cepa *Streptomyces* sp. K155 y el de *S. thermocarboxydus* DSM 44293 son diferentes como por ejemplo el medio ISP-3 donde *Streptomyces* sp. K155 produce el micelio color gris y *S. thermocarboxydus* DSM 44293 de color blanco.

Una de las características que se utilizan para la clasificación de los miembros del género *Streptomyces*, es la morfología de las esporas, por ello se observaron el micelio y las esporas al microscopio electrónico. Lo más relevante que se observó fue la diferencia en la superficie de las esporas, así como el tamaño de éstas, ya que *S. thermocarboxydus* DSM 44293 produce esporas de textura más rugosa y de mayor tamaño a diferencia de las esporas de *Streptomyces* sp. K155 (Fig.3). Estas diferencias se podrían deber a la producción de polisacáridos de pared celular diferentes entre ambas cepas de *Streptomyces*.

Tabla 1. Color del micelio aéreo producido por *Streptomyces* sp. K155 y *S. thermocarboxydus*.

Medio Agar	K155	<i>S. thermocarboxydus</i>
Triptona-Lev (ISP-1)	Blanco	Gris
YMG (ISP-2)	Gris	Blanco/Gris
Avena (ISP-3)	Gris	Blanco
Almidón-Sales Inorgánicas (ISP-4)	Gris	Blanco
Glicerol-Asparagina (ISP-5)	Blanco	Café
Soya tripticaseína-agar	Blanco/Gris	Blanco
Agar nutritivo	Escaso grisáceo	Gris
Soya-Manitol	Gris	Blanco

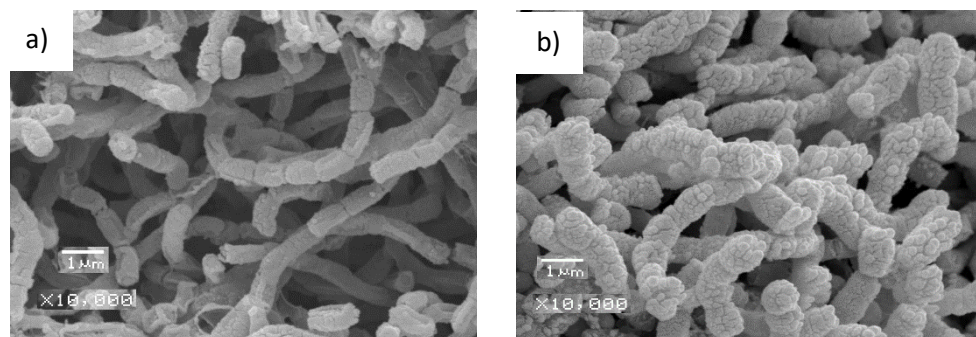


Figura 3. Fotografías de microscopía electrónica de barrido del micelio y esporas de a) K155 y b) *S. thermocarboxydus* vistas al microscopio electrónico de barrido.

En cuanto al crecimiento en medio de cultivo líquido a diferentes valores de pH, no se observaron diferencias siendo 7 el valor óptimo de ambas. Sin embargo, en cuanto a la temperatura y a la tolerancia al NaCl sí se observaron, puesto que *S. thermocarboxydus* DSM 44293 es termófilo, capaz de crecer a temperaturas de hasta 55°C mientras que *Streptomyces* sp. K155 es mesófilo y crece a temperaturas menores a 50°C.

Las pruebas bioquímicas de utilización de carbohidratos mostraron que a diferencia de *S. thermocarboxydus*, *Streptomyces* sp. K155 no puede metabolizar galactosa, fructosa, inositol, N-acetilglucosamina, ni genitiobiosa, bajo las condiciones de crecimiento de las tiras API.

La hibridación ADN-ADN mostró una similitud mayor al 70%, por lo que según el criterio empleado para la caracterización e identificación de una nueva especie (Anderson & Wellington, 2001), la cepa de *Streptomyces* sp. K155 pertenece a la especie *S. thermocarboxydus*. Sin embargo, dadas las diferencias encontradas, puede tratarse de

una subespecie. Para confirmar esto, son necesarias una serie de análisis que brinden mayor detalle e información que permitan realizar esta clasificación.

Durante la caracterización de la cepa de *Streptomyces* sp. K155 se le encontró actividad antibiótica contra bacterias Gram-positivas como *Bacillus subtilis* y *Micrococcus luteus*, así como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y tomando en cuenta que *S. thermocarboxydus* no tiene reportes de producción de antibióticos se decidió caracterizar el antibiótico producido.

Caracterización del principio bioactivo

Después de comprobar que la actividad antimicrobiana se producía en el medio de cultivo, se determinó su termoestabilidad. Se encontró que el extracto crudo con actividad antibiótica se mantuvo estable desde 37°C hasta 121°C (un ciclo en autoclave) por 20 min. Posteriormente, se procedió a su aislamiento y purificación. Se encontró que el metabolito bioactivo es

sumamente polar, por lo que únicamente pudo extraerse del extracto crudo eliminando primero el agua por medio de liofilización y posteriormente añadiendo metanol para su extracción. Una vez obtenido el extracto en metanol, el disolvente se evaporó y se suspendió en una mezcla de acetonitrilo:agua (1:1) para fraccionarlo por medio de cromatografía en columna. Se obtuvieron fracciones activas cuando se empleó una proporción de 50:50.

Las fracciones anteriores se colectaron y purificaron por medio de HPLC con detector UV-Vis, la elución de la columna se realizó de manera isocrática con TEAA. En el cromatograma obtenido (figura 4) se observan siete picos en un intervalo de tiempo de retención entre 2.5 y 6.5 minutos.

Estos picos corresponden a compuestos con mayor polaridad (como moléculas de tipo alcohol) que el pico mayoritario, que apareció en un intervalo de retención de 9.5-11.5 minutos.

Los primeros siete picos no mostraron ninguna actividad antibiótica, como el pico mayoritario, que conservó su actividad contra *M. luteus*. Este cromatograma nos demostró lo conveniente del fraccionamiento previo por medio de cromatografía en columna, pues se eliminó la mayoría de los componentes no deseados del extracto crudo y además se logró concentrar el producto de interés. Por otra parte, los resultados nos reafirmaron la naturaleza polar de dicho antibiótico, pues únicamente se empleó una fase móvil acuosa para la elución.

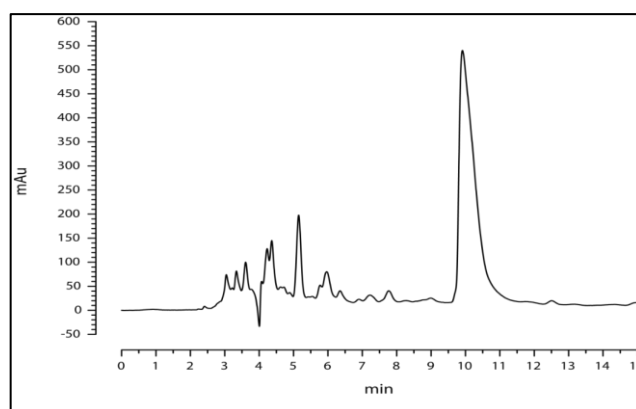


Figura 4. Cromatograma de la purificación de los compuestos biológicamente activos eluyendo isocráticamente con TEAA 100%.

Se realizaron estudios estructurales preliminares (RMN, MS, IR), sin embargo, se encontraron en mayor cantidad señales correspondientes a la fase móvil de la elución (TEAA), por lo que únicamente se sabe que el

peso molecular del compuesto es de aproximadamente 580 m/z, además de que posee un pico máximo de absorción a menos de 200 nm lo que nos indica que no posee un sistema de dobles enlaces conjugados. Con

las características encontradas, se podría pensar que el metabolito a activo pertenece a moléculas de tipo macrólido.

Caracterización del efecto inhibitorio

Con la fracción obtenida de la cromatografía en columna se determinó la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀).

La CI₅₀ del compuesto puro contra *M. luteus* fue de 31.25 µg/mL (figura 5A), y para *S. cerevisiae* de 250 µg/mL (figura 5B). Los controles empleados fueron eritromicina para

M. luteus y cicloheximida para *S. cerevisiae*, ambos antimicrobianos fueron efectivos a la menor concentración empleada, sin embargo, fueron específicos para cada microorganismo, es decir la eritromicina no tuvo actividad contra *S. cerevisiae* y viceversa, la cicloheximida no inhibe a *M. luteus*. Que la fracción probada tuviera actividad contra ambas cepas nos indica que este antibiótico posee un amplio espectro de acción o que en dicho pico hay dos compuestos activos.

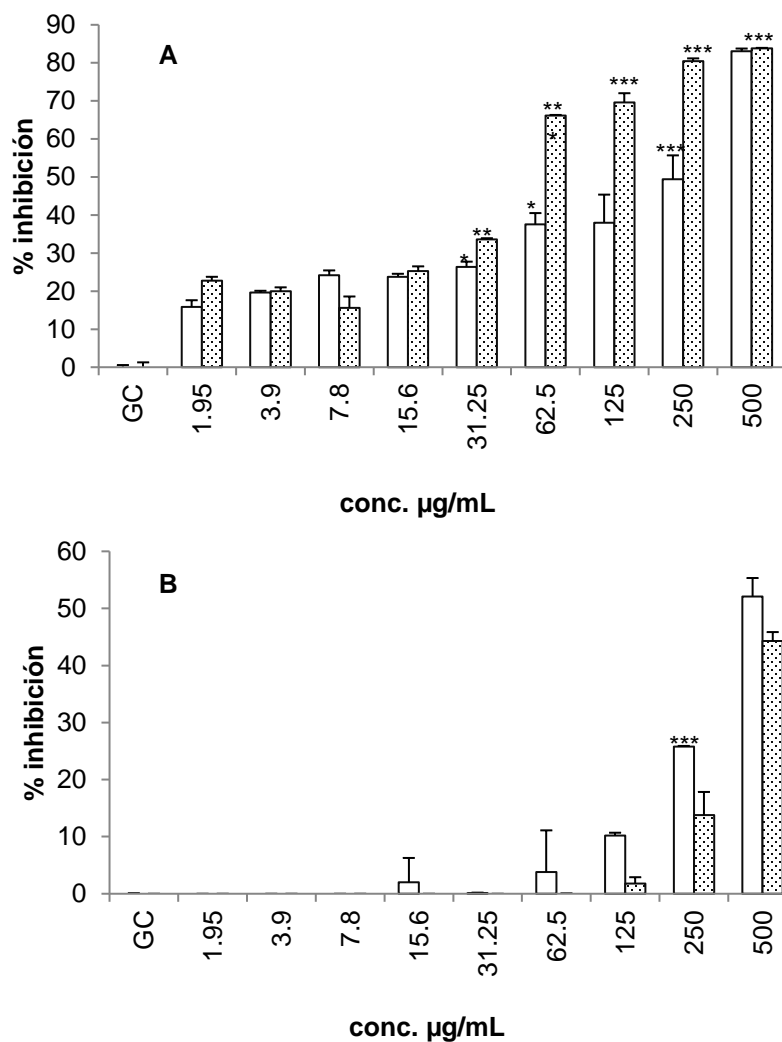


Figura 5. Gráficas para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de la fracción 20 (barras punteadas) obtenida de la cromatografía en columna y del compuesto obtenido después de la purificación con HPLC (barras vacías), sobre las cepas *M. luteus* (A) y *S. cerevisiae* (B). GC indica el crecimiento de la cepa sin antibióticos.

Discusión

La clasificación taxonómica polifásica tradicionalmente incluye datos de morfología colonial, y microscópica, así como fisiología y composición de la pared celular, además de incluir datos de secuencia de ADNr 16S e hibridización ADN-ADN (Mahato et al., 2017).

En lo concerniente a la cepa *Streptomyces* sp. K155, los resultados de la secuencia del ADNr 16S mostraron que tenía una mayor semejanza con la cepa de *Streptomyces thermocarboxydus*, lo mismo se observó en la hibridización ADN-ADN en donde mostraron tener más del 70% de semejanza. Sin embargo, la comparación entre ellas de otras características fisiológicas no muestra tantas similitudes. La temperatura óptima de crecimiento por ejemplo es mayor en *S. thermocarboxydus* (50°C) que en *Streptomyces* sp. K155 (29°C). En contraste la tolerancia a la concentración de NaCl fue mayor para K155 que para *S. thermocarboxydus*. Ambas diferencias son notables y podrían deberse al origen de aislamiento de ambas cepas, la cepa tipo fue aislada de suelo inglés y la nuestra del Estado de México por lo que probablemente la composición, altitud y temperatura del origen podrían haber influido. En lo concerniente a la utilización de las fuentes de carbono probadas, se observaron algunas diferencias notables como la incapacidad de *Streptomyces* sp. K155 de usar fructosa y N-

acetilglucosamina, ambas transportadas por el único PTS que posee el género *Streptomyces* y que es funcional justamente para esas dos fuentes de carbono (Parche et al., 2000). Aunque los genes que corresponden al PTS se encuentran en el genoma de *Streptomyces* sp. K155, podría ser que alguno de ellos no fuera funcional y por ello no pudo degradarlas en las tiras API.

Por otro lado, la morfología y superficie de las esporas producidas había sido utilizada anteriormente como ayuda para la clasificación de los *Streptomyces* (Tresner et al., 1961). En este caso, *S. thermocarboxydus* presentó esporas verrugosas a diferencia de la cepa de *Streptomyces* sp. K155, lo que puede deberse a diferencias en la producción de polisacáridos de la pared celular.

El análisis del hidrolizado ácido de la pared celular nos confirmó la presencia de ácido L-diaminopimélico en la pared celular de los *Streptomyces*, sin embargo, son necesarios estudios en HPLC-MS para determinar la presencia de los demás componentes de carbohidrato.

Según Cohan (2002) no hay que concebir a la especie bacteriana como “un conjunto de organismos con propiedades genéticas, ecológicas, evolutivas o filogenéticas especiales”. Por el contrario, se ha visto que cada “especie” contiene muchos

ecotipos (taxa bacterianos ecológicamente homogéneos) cada uno con propiedades dinámicas propias de una especie (Cohan, 2002, Cohan, 2016). Esto coincide con nuestros resultados pues genéticamente son muy semejantes, pero no ocurre lo mismo con algunas de sus características fenotípicas.

Finalmente, con respecto a la actividad antibiótica de *Streptomyces* sp. K155, es notable que la fracción activa mostrara capacidad inhibitoria contra bacterias Gram-positivas como *B. subtilis* y *M. luteus* y con un mayor efecto inhibitorio contra la levadura *S. cerevisiae*. Una actividad de este amplio espectro se podría explicar si el compuesto fuera semejante a un mutágeno como la antraciclina doxorubicina (Arcamone et al., 2000), la cual actúa como un agente intercalante del ADN, que inhibe la duplicación del cromosoma. Pero para saberlo con certeza aún habría que determinar la estructura del compuesto activo.

Conclusión

Se determinó la pertenencia de la cepa de *Streptomyces* sp. K155 a la especie *S. thermocarboxydus*, sin embargo, no existen reportes de antibióticos producidos por esta especie. Aunado a esto, el hecho de encontrar actividad tanto contra bacterias Gram-positivas como contra *S. cerevisiae*, hace la continuación del estudio de dicha cepa interesante, pues abre la posibilidad de obtener compuestos novedosos y/o con mayor actividad.

Referencias

- Anderson AS & Wellington EMH (2001) The taxonomy of *Streptomyces* and related genera, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 797-814.
- Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C & Spalla C (2000) Adriamicin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotech. Bioeng.* 67: 704-13.
- Cohan FM (2002) What are bacterial species? *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 457-487.
- Cohan FM (2016) Bacterial speciation: genetic sweeps in bacterial species. *Curr. Biol.* 26: R102-R124.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R & Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods.* 9: 772.
- Guindon S & Gascuel O (2003) A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Syst. Biol.* 52: 696-704.
- Hasegawa M, Kishino H & Yano T (1985) Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial ADN. *J. Mol. Evol.* 22:160-174.
- Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF & Hopwood DA (2000). *Practical Streptomyces genetics I*. The John Innes Foundation. Norwich, UK.
- Kim SB, Falconer C, Williams E & Goodfellow M (1998) *Streptomyces thermocarboxydovorans* sp. nov. and

Artículos

- Streptomyces thermocarboxydus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 59-68.
- Kumar S, Stecher G & Tamura K (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870-1874.
- Lanave C, Praparata G, Saccone C & Serio G (1984) A new method for calculating evolutionary substitution rates. *J. Mol. Evol.* 20: 86-93.
- Lukacisinová M & Bollenbach T (2017) Toward a quantitative understanding of antibiotic resistance evolution. *Curr. Opin. Biotech.* 46: 90-97.
- Mahato NK, Gupta V, Singh P, Kumari R, Verma H, Tripathi Ch, Rani P, Sharma A, Singhvi N, Sood U, Hira P, Kohli P, Nayyar N, Puri A, Bajaj A, Kumar R, Negi V, Talwar Ch, Khurana H, Nagar S, Sharma M, Mishra H, Singh AK, Dhingra G, Negi RK, Shakarad M, Singh Y & Lal R (2017) Microbial taxonomy in the era of OMICS: application of DNA sequences, computational tools and techniques. *Antonie van Leeuwenhoek*. DOI 10.1007/s10482-017-0928-1.
- Parche S, Nothaft H, Kamionka A & Titgemeyer F (2000) Sugar uptake utilization in *Streptomyces coelicolor*: a PTS view to the genome. *Antonie van Leeuwenhoek*. 78: 243-51.
- Rodríguez F, Oliver JL, Marín A & Medina JR (1990) The general stochastic model of nucleotide substitution. *J. Theor. Biol.* 142: 485-501
- Shirling EB & Gottlieb D (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16: 313-340.
- Staneck JL & Roberts GD (1974). Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl. Microbiol.* 28: 226-231.
- Tavaré S (1984) Line-of-descendent and genealogical processes, and their applications in population genetics models. *Theor. Popul. Biol.* 26: 119-164.
- Tresner HD, Davies MC & Backus EJ (1961) Electron microscopy of *Streptomyces* spore morphology and its role in species differentiation. *J. Bacteriol.* 81: 70-80.
- Tourova TP & Antonov AS (1988) Identification of microorganisms by rapid DNA-DNA hybridization. In *Methods in microbiology. Current methods for classification and identification of microorganisms*. Colwell RR & Grigorova R (ed). Academic Press Inc. UK. Vol.19, pp. 333-355.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA & Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697-703.
- Wiegand I, Hilpert K, & Hancock R (2008) Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc.* 3: 163-75.