

Accepted Manuscript / Manuscrito Aceptado

Title Paper/Título del artículo:

Aislamiento e identificación de bacterias asociadas a líquenes presentes en el estado de Guanajuato

Isolation and identification of lichen-associated bacteria present in the state of Guanajuato

Authors/Autores: Laguna-Montes, Y., Cervantes-Gutiérrez, A. E., Rodríguez-Gómez, D., López-Ramírez, V.

ID: e1626

DOI: <https://doi.org/10.15741/revbio.11.e1626>

Received/Fecha de recepción: January 24th 2024

Accepted /Fecha de aceptación: September 25th 2024

Available online/Fecha de publicación: October 10th 2024

Please cite this article as/Como citar este artículo: Laguna-Montes, Y., Cervantes-Gutiérrez, A. E., Rodríguez-Gómez, D., López-Ramírez, V. (2024). Isolation and identification of lichen-associated bacteria present in the state of Guanajuato. *Revista Bio Ciencias*, 11, e1626. <https://doi.org/10.15741/revbio.11.e1626>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Este archivo PDF es un manuscrito no editado que ha sido aceptado para publicación. Esto es parte de un servicio de Revista Bio Ciencias para proveer a los autores de una versión rápida del manuscrito. Sin embargo, el manuscrito ingresará a proceso de edición y corrección de estilo antes de publicar la versión final. Por favor note que la versión actual puede contener errores de forma.

Aislamiento e identificación de bacterias asociadas a líquenes presentes en el estado de Guanajuato

Isolation and identification of lichen-associated bacteria present in the state of Guanajuato

Bacterias asociadas a líquenes/ Lichen-associated bacteria

Laguna-Montes, Y. , Cervantes-Gutiérrez, A. E. , Rodríguez-Gómez, D. , López-Ramírez, V. 

Adscripción: División de Ing. Bioquímica. Tecnológico Nacional de México/ITS de Irapuato. Carretera Irapuato-Silao km. 12.5 Col. El Copal, 36821. Irapuato, Guanajuato, México

***Corresponding Author:**

[Varinia López-Ramírez](#). División de Ing. Bioquímica. Tecnológico Nacional de México/ITS de Irapuato. Carretera Irapuato-Silao km. 12.5 Col. El Copal, 36821. Irapuato, Guanajuato, México. Teléfono: (462) 606 7900 ext. 141. E-mail: varinia.lr@irapuato.tecnm.mx

RESUMEN

Los líquenes son asociaciones complejas constituidas principalmente por un micobionte y un fotobionte. Diversos estudios han demostrado la presencia de bacterias asociadas a esta simbiosis; sin embargo, en Guanajuato la investigación a este nivel es escasa. Aquí, exploramos las bacterias asociadas a líquenes del estado de Guanajuato. Se realizó un muestreo aleatorio de 21 líquenes en el área recreativa "Las Palomas", Guanajuato. Las muestras se identificaron morfológica y químicamente. Las bacterias asociadas se aislaron en diversos medios de cultivo sólidos y después se caracterizaron mediante tinción de Gram y se identificaron con secuenciación del gen 16S rDNA, comparando las secuencias con bases de datos genéticas públicas. Se registraron un total de 11 líquenes foliosos, 4 fruticosos, 5 costrosos y uno compuesto, tales como *Punctelia*, *Parmelia* y *Dendrographa*. De las 23 cepas bacterianas aisladas el filo Proteobacteria fue el más abundante (52.2 %), seguido del de Firmicutes (39.1 %) y Actinobacteria (8.7 %), provenientes principalmente de líquenes foliosos y fruticosos. Se identificaron géneros como *Mesorhizobium* sp., *Paenibacillus* sp., *Bacillus* sp., *Acinetobacter* sp. y *Stutzerimonas* sp. La descripción de bacterias contribuye al conocimiento de la diversidad microbiana que cohabita en líquenes, determinar las probables funciones que desempeñan dentro de los líquenes queda por ser establecido.

PALABRAS CLAVE:

Asociación liquen-bacteria, Aislamiento bacteriano, Gen 16S rDNA, Guanajuato.

ABSTRACT

Lichens are complex associations consisting mainly of a mycobiont and a photobiont. Recent studies have shown the presence of bacteria associated with this symbiosis. This study explores lichen-associated bacteria from the state of Guanajuato, Mexico. A random sampling of 21 lichens was conducted in the recreational area "Las Palomas", Guanajuato. The samples were identified morphologically and chemically. The associated bacteria were isolated from various solid culture media, characterized by Gram staining, and identified with 16S rDNA gene sequencing, comparing the sequences with public genetic databases. A total of 11 foliose, 4 fruticose, 5 crustose, and one composite lichen were recorded and identified as *Punctelia*, *Parmelia*, and *Dendrographa* genera. Of the 23 bacterial strains isolated, the phylum Proteobacteria was the most abundant (52.2 %), followed by Firmicutes (39.1 %) and Actinobacteria (8.7 %), from foliose and fruticose lichens. Genera such as *Mesorhizobium* sp., *Paenibacillus* sp., *Bacillus* sp., *Acinetobacter* sp., and *Stutzerimonas* sp. were identified. The description of these bacteria contributes to the knowledge of the microbial diversity that coexists in lichens; however, their probable function within lichens remains to be established.

KEYWORDS

Lichen-bacteria association, Bacterial isolation, 16S rDNA gene, Guanajuato.

Introducción

En México 2,722 especies de líquenes han sido registradas, lo que corresponde aproximadamente a un 50 % del total de especies que forman parte de la biodiversidad del país (Herrera-Campos *et al.*, 2014). Un líquen es un organismo simbiótico conformado por un hongo el cual se denomina micobionte y un alga verde y/o cianobacteria, conocido como fotobionte (Nash III, 2008). El micobionte pertenece principalmente a la división *Ascomycota*, aunque algunos pertenecen a la división *Basidiomycota*. Los fotobiontes más comunes son los géneros *Trebouxia* y *Trentepohlia* (algas verdes) y *Nostoc* (cianobacterias); el fotobionte proporciona al micobionte carbohidratos y otros nutrientes necesarios para su crecimiento. A cambio, el micobionte crea una estructura que sirve de recubrimiento y protección para el fotobionte y otros microorganismos presentes (Aschenbrenner *et al.*, 2016). La forma y aspecto del talo liquénico son determinados generalmente por el socio fúngico (Büdel & Scheidegger, 2008). Existen tres morfotipos principales de talo liquénico: costrosos (en forma de corteza, estrechamente relacionados con su sustrato), foliosos (en forma de hojas, adheridos parcialmente a su sustrato) y fruticosos (forma de arbustos, pueden estar o no ramificados (Oksanen, 2006). Además, algunos líquenes se encuentran entre los tres tipos anteriores (Zhao *et al.*, 2021).

Los líquenes cumplen diversas funciones en diversos ámbitos. Por ejemplo, actúan como organismos pioneros en la sucesión primaria de comunidades ecológicas (Gilbert, 1990). Sirven para datar de manera sencilla y económica la edad superficial de las rocas en las que crecen los líquenes (Rosenwinkel *et al.*, 2015). Contribuyen a prevenir la desertificación y restauración de tierras desertificadas mediante la formación de costras biológicas (Oksanen, 2006). Tienen la capacidad de descomponer algunos contaminantes como resinas sintéticas de poliéster (Cappitelli & Sorlini, 2008). Además, los líquenes son considerados muy buenos bioindicadores

debido a que su diversidad y cantidad se reduce al aumentar la actividad industrial y la contaminación urbana (Antolín *et al.*, 2021). Por lo tanto, se puede evaluar el impacto del cambio climático y el estado de contaminación del aire utilizando líquenes como bioindicadores ambientales (Mikhaylov, 2020). Diversas sociedades han utilizado ciertos líquenes como alimento destacando especialmente su gran contenido proteico (Zhao *et al.*, 2021). Los líquenes han sido valorados en la medicina tradicional por su producción de una diversa gama de metabolitos secundarios con actividades antibióticas (Illana-Esteban, 2012; Zuñiga-González *et al.*, 2021). Sin embargo, su crecimiento lento y las dificultades para aislar los simbioses han limitado el aprovechamiento de estos compuestos con fines farmacéuticos (Shishido *et al.*, 2021).

En asociación con los líquenes también se pueden encontrar levaduras y diversos géneros de bacterias no fotosintéticas (Swamy & Gayathri, 2021). De estas últimas se ha determinado que las proteobacterias, actinobacterias y acidobacterias son los fila más comúnmente encontrados (Martínez-Vargas & Pérez-y-Terrón, 2020; Sierra *et al.*, 2020; Swamy & Gayathri, 2021). Las bacterias no fotosintéticas albergan en los líquenes formando biopelículas en partes específicas del talo de manera interna (endoliquénicas) o en la superficie (ectoliquénicas; Grube *et al.*, 2009; Grube & Berg, 2009). Hasta el momento, no se conocen con precisión las razones detrás de las variaciones en la abundancia, composición y organización espacial de las comunidades microbianas asociadas a líquenes. Sin embargo, estas variaciones podrían atribuirse a factores como la especie de líquen, la parte del talo analizada, el tipo de sustrato (roca, árbol, suelo) y, en menor medida, la exposición a la radiación solar (Cardinale *et al.*, 2011; Pankratov, 2018). En trabajos recientes, Martínez-Vargas & Pérez-y-Terrón (2020) investigaron la diversidad de bacterias no fotosintéticas asociadas a diversas especies de *Lobaria pulmonaria*, *Lichina* spp., *Rocella fuciformes*, *Collema auriforme*, *Peltigera* spp., *Xhantoria aureola*, *Usnea* spp., *Ramalina* sp., *Cora* sp., *Hypotrachyna* sp., *Cladonia* sp., *Stereocaulon* sp. y *Sticta* sp. En esta recopilación encontraron que los fila bacterianos más predominantes en líquenes son: Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Verrucomicrobia, Chloroflexi, Acidobacteria y Thermus.

El papel de las bacterias en la simbiosis líquénica aún no es claro, sin embargo, estos microorganismos pueden contribuir al complejo simbiótico en la provisión de nutrientes (como nitrógeno, fósforo y azufre), la resistencia contra factores de estrés biótico y abiótico, el suministro de vitamina B12 y hormonas, desintoxicación de metabolitos y la degradación de las partes más antiguas del talo del líquen (Grube *et al.*, 2015). Guanajuato cuenta con áreas naturales protegidas que ofrecen un hábitat ideal para una variedad de especies de líquenes. Al tomar muestras de estos líquenes y seguir un protocolo de aislamiento de bacterias asociadas, así como su posterior análisis morfológico y molecular, es posible identificar distintos filos bacterianos. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue aislar e identificar molecularmente las bacterias de diferentes géneros asociadas a líquenes en el estado de Guanajuato.

Material y Métodos

Recolección de muestras de líquenes

Se seleccionaron 21 muestras de líquenes de árboles y rocas de manera arbitraria en un área de aproximadamente 0.2 km² en la zona recreativa "Las Palomas", ubicada dentro de la reserva natural "Cuenca de la Esperanza", al norte de la ciudad de Guanajuato. Las muestras se tomaron de la parte más joven de los líquenes, que se encuentra en la periferia del talo (Sanders, 2001), utilizando guantes de látex y una navaja, esta última fue desinfectada con etanol al 70 % (v/v) y papel absorbente entre cada toma de muestra. Todas las muestras se colocaron en sobres individuales de papel manila, en los cuales se anotó con lápiz de grafito en la parte trasera: número de muestra, fecha y hora de recolección. Además, se recabaron datos como tipo de sustrato, lugar de recolección y coordenadas geográficas (latitud y longitud), lo anterior se almacenó con base al número de muestra (YM-# líquen recolectado) y se construyó una imagen satelital con los puntos de colecta de los líquenes utilizando los servicios de Google Earth (Google, 2022). Todos los sobres fueron almacenados en una caja de cartón con tapa, misma que fue transportada al laboratorio. Las muestras de líquenes fueron preservadas en tubos Eppendorf estériles (un tubo por muestra) para su posterior congelación a 4°C hasta su procesamiento.

Identificación de líquenes

La identificación de líquenes se llevó a cabo mediante un enfoque integral que combinó la descripción macroscópica con pruebas químicas específicas. Se emplearon reactivos como el hipoclorito de sodio (NaClO) al 5 % (v/v), hidróxido de potasio (KOH) al 10 % (p/v), así como sus combinaciones y lugol. Para ello, se seccionaron las muestras de líquen en tres partes, las cuales fueron dispuestas en una placa de porcelana horadada. Posteriormente, se aplicaron los reactivos químicos correspondientes, permitiendo observar bajo el microscopio tanto el cambio de coloración como la respuesta morfológica ante dichos reactivos. Se prestaron especial atención a la visualización de la morfología del talo, las estructuras reproductivas y los propágulos. Finalmente, utilizando una guía dicotómica de Brodo (2016) se determinó el género de los líquenes muestreados.

Protocolo y condiciones de aislamiento de bacterias asociadas a los líquenes

Lavado y macerado de líquenes

Se siguió el protocolo inicial para el aislamiento de bacterias asociadas a líquenes descrito por Biosca *et al.* (2016). Cada muestra de líquen (0.5 g) se desinfectó añadiendo 1 mL de etanol al 70 % (v/v) y agitándola suavemente durante 30 segundos. El etanol se eliminó y la muestra se enjuagó tres veces con 1 mL de agua destilada estéril, agitando el tubo delicadamente 15 veces consecutivas en cada enjuague antes de desechar el líquido. Posteriormente, se añadieron 500 µL de solución salina NaCl al 0.9 % (p/v), y la muestra se maceró y homogeneizó durante 3 minutos utilizando una varilla de vidrio estéril.

Aislamiento de bacterias

En condiciones asépticas, se realizaron disoluciones seriadas; de la solución stock se tomaron 100 μL y se añadieron a un tubo que contenía 900 μL de agua destilada estéril, hasta la dilución 10^{-3} . Se sembraron 100 μL de esta última dilución con ayuda de una espátula de Drigalsky estéril a cajas Petri con distintos medios de cultivo y 25 μL de terbinafina 1 % (v/v): agar nutritivo; agar NK (por litro de agua contiene 15 g de sacarosa, 5 g de peptona, 3 g de extracto de carne, 1 g de extracto de levadura, 15 g de agar y un pH de 7.0; Huang *et al.*, 2009), y agar TWYE (por litro de agua de grifo contiene 0.25 g de extracto de levadura, 0.5 g de K_2HPO_4 , 18 g de agar y un pH de 7.2; Huang *et al.*, 2012). Las siembras se realizaron por duplicado y como controles negativos para cada medio se inocularon 100 μL de una solución que contenía 100 μL de NaCl 0.9 % (p/v) y 900 μL de agua destilada. Todos los cultivos fueron incubados a 28°C por 1-7 días. Una vez que se obtuvieron cultivos axénicos, las colonias fueron descritas por su morfología analizando su tamaño, color, forma general, borde y elevación, y una vez que el crecimiento fue constante se realizó la descripción microscópica a través de tinción Gram. Los aislados obtenidos de cultivaron en agar TSA (por litro de agua contiene 5 g de cloruro de sodio, 2.5 g de dextrosa, 2.5 g de fosfato dipotásico, 17 g de peptona de caseína, 3 g de peptona de soya y 15 g de agar).

Caracterización molecular de bacterias aisladas

Extracción de DNA bacteriano

Los cultivos axénicos bacterianos se inocularon en tubos Falcon que contenían 15 mL de caldo nutritivo y se incubaron en agitación (110 rpm) a 28°C por 1-7 días. Cada tubo que contenía su cultivo líquido bacteriano fue mezclado utilizando un agitador vortex, después, se inoculó 1 mL de cultivo bacteriano a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 100 μL de tampón de lisis STES (0.2 M Tris-Cl pH 7.6, 0.5 M NaCl, 0.1 % (p/v) SDS y 10 mM EDTA pH 8.0) y 120 μL de fenol-cloroformo-alcohol Isoamílico (25:24:1), se mezcló en vortex durante 30 s y se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente, el sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo estéril. El DNA se precipitó empleando 100 μL de etanol absoluto y se conservó en baño de hielo durante 15 min, posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante por aspiración y se lavó el pellet con 200 μL de etanol al 70 % (v/v), se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante por aspiración y se dejó secar el precipitado durante 15 min. El DNA fue rehidratado con 40 μL de buffer TE (1X) y almacenado en congelador a 4°C. Para determinar la integridad del DNA se realizó electroforesis en gel de agarosa 0.5 % (p/v) en TBE 0.05X.

Amplificación y secuenciación del gen 16S rDNA

Se amplificó el gen 16S rDNA a partir de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) utilizando los oligonucleótidos 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') y 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3'). A cada tubo de PCR se le

añadieron 25 μ L de la mezcla maestra PCR MM 2X (Thermo Fisher Scientific™), 2 μ L de oligo directo (27F), 2 μ L de oligo reverso (1492R), 20 μ L de H₂O bidestilada y 1 μ L de DNA bacteriano. Se utilizó un termociclador marca Techne™ para la amplificación, la cual se llevó a cabo en 30 ciclos con las siguientes condiciones: 95°C por 30 s, 45°C por 46 s, y 72°C por 2 min. Se utilizaron 5 μ L de producto de PCR para verificar el tamaño del producto mediante electroforesis en gel de agarosa 0.5 % (p/v) en TBE 0.05X.

Identificación molecular de las secuencias

Utilizando la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) se realizaron análisis tipo BLASTn (Zhang *et al.*, 2000) para cada uno de los productos de amplificación del gen 16S rDNA secuenciados, y se identificaron las bacterias a nivel género y/o especie (cuando la calidad de la secuencia lo permitió), tomando en cuenta la calificación total, el porcentaje de cobertura, E-value, porcentaje de identidad y tamaño de secuencia.

Reconstrucción filogenética de las bacterias aisladas.

Se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias 16S rDNA de los mejores candidatos BLAST y las secuencias de referencia utilizando el programa BioEdit (Hall, 1999) y el algoritmo ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). El modelo de sustitución se obtuvo al analizar el alineamiento en el programa MEGA 11 (Tamura *et al.*, 2021). Posteriormente, se realizó la reconstrucción filogenética utilizando el método de Máxima Verosimilitud, la validación estadística se realizó a partir del método Bootstrap con 1000 réplicas.

Resultados y Discusión

En el área recreativa “Las Palomas”, Guanajuato habitan líquenes que exhiben distintas morfologías

Se recolectaron un total de 21 líquenes en el área recreativa "Las Palomas", localizada a 5 km al norte de la ciudad de Guanajuato. En la Figura 1 se observan los puntos de colecta de los líquenes y las coordenadas geográficas. Se identificaron 11 líquenes foliosos, 4 fruticosos, 5 costrosos y 1 compuesto (Figura 2). La mayoría de los líquenes muestreados fueron foliosos. Esto no necesariamente indica una mayor prevalencia de líquenes foliosos en la zona, pero sugiere que su estructura aplanada y a menudo de gran tamaño los hace más visibles y fáciles de localizar. Además, todos estos líquenes se encontraban en sustratos de fácil acceso (principalmente troncos). En cambio, líquenes fruticosos como *Teloschistes*, aunque presentan colores llamativos y una estructura arbustiva, se encontraban en su mayoría en ramas de árboles de difícil acceso, de igual manera para líquenes costrosos como *Lepraria* y *Caloplaca*.

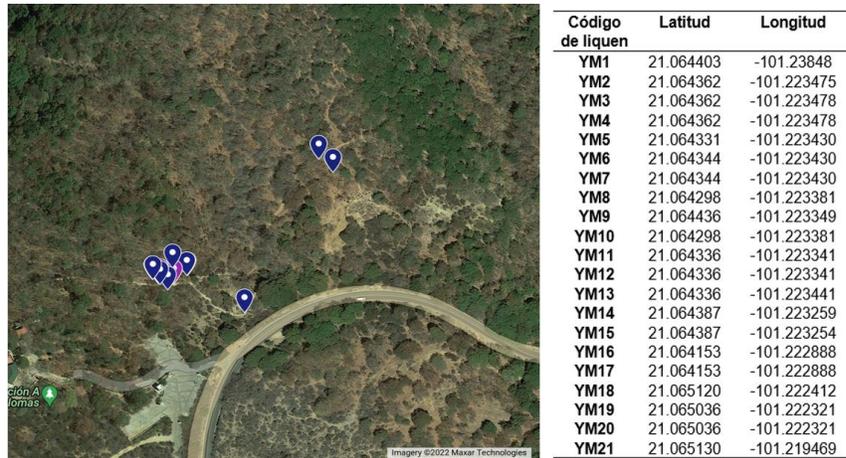


Figura 1. Ubicación geográfica de los líquenes colectados dentro del área recreativa “Las Palomas”

A cada uno de los líquenes muestreados se les tomó una fotografía en su respectivo sustrato (Figura 2) de donde se extrajo cuidadosamente una muestra de la periferia del talo liquénico. La mayoría de los líquenes se encontraban principalmente en cortezas de árboles situados en la zona y suelo rocoso.

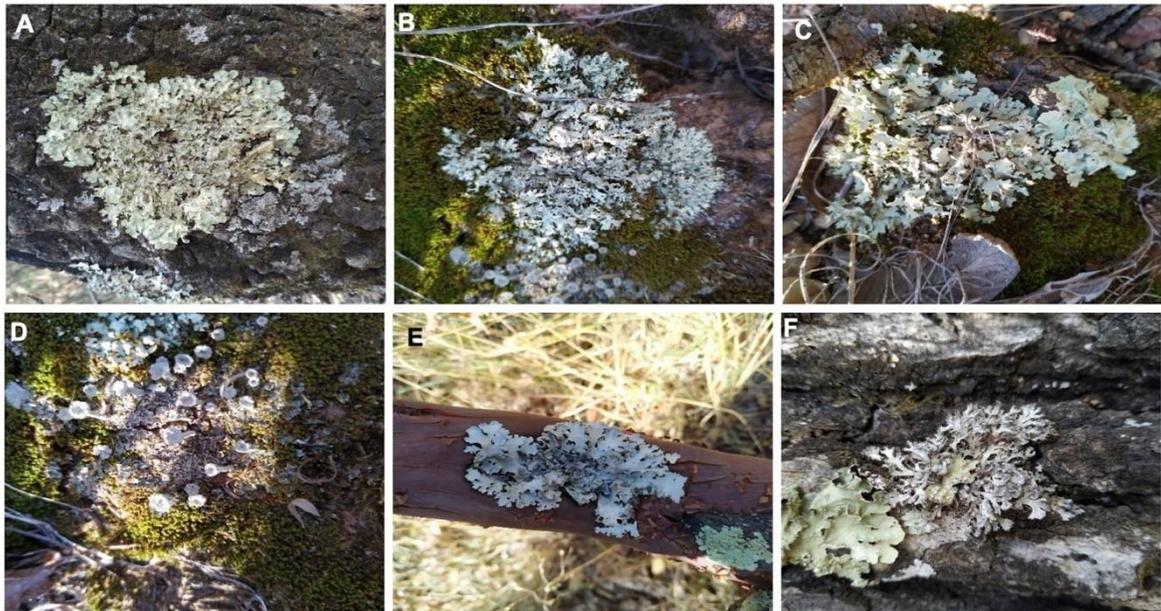


Figura 2 (Parte 1). Líquenes colectados: A) YM1 (foliose) - *Punctelia* sp.; B) YM2 (foliose) - *Phaeophyscia hispidula*; C) YM3 (foliose) - *Parmelia* sp.; D) YM4 (compuesto) - *Cladonia carneola*; E) YM5 (foliose) - *Hypotrachyna* sp.; F) YM6 (foliose) - *Heterodermia* sp.



Figura 2. Líquenes colectados (Parte 2): G) YM7 (fruticoso) - *Dendrographa alectoroides*; H) YM8 (costroso) - *Pertusaria pseudocorallina*; I) YM9 (folioso) - *Punctelia* sp.; J) YM10 (fruticoso) - *Usnea glabrescens*; K) YM11 (costroso) - *Lepraria* sp.; L) YM12 (folioso) - *Punctelia* sp.; M) YM13 (folioso) - *Physcia* sp.; N) YM14 (costroso) - *Ochrolechia* sp.; O) YM15 (folioso) - *Parmelia* sp.; P) YM16 (fruticoso) - *Teloschistes* sp.; Q) YM17 (fruticoso) - *Teloschistes* sp.; R) YM18 (costroso) - *Caloplaca* sp.; S) YM19 (costroso) - *Lepraria neglecta*; T) YM20 (folioso) - *Punctelia* sp.; V) YM21 (folioso) - *Parmelia* sp.

Diversidad bacteriana asociada a líquenes.

En la Figura 3 y Tabla 1 se presentan ejemplos de aislados bacterianos obtenidos de los líquenes *C. carneola*, *Caloplaca* y *Parmelia*. Antes de describir morfológicamente cada una de las bacterias aisladas, se contabilizó un total de 51 aislados bacterianos provenientes del conjunto de líquenes procesados. Cabe destacar que líquenes como *Caloplaca* presentaron solo un aislado bacteriano.

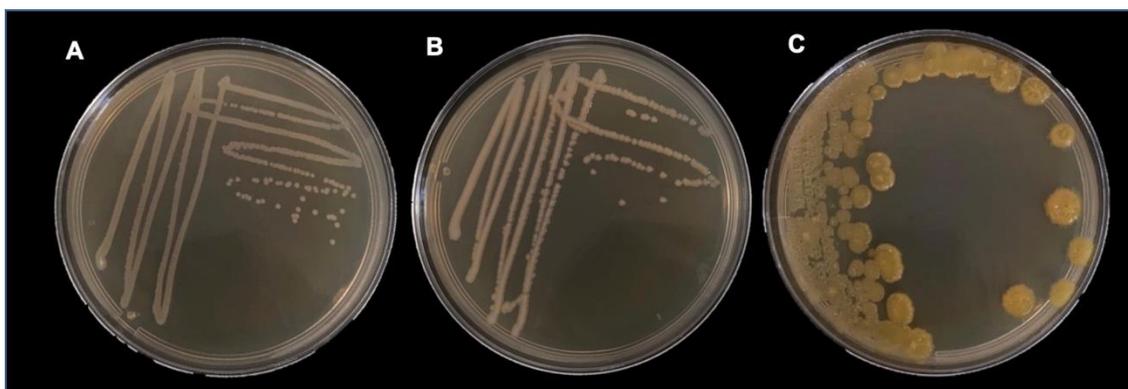


Figura 3. Ejemplos de bacterias aisladas en este trabajo. A) YM4_2; B) YM18_1, C) YM21_2 from *Cladonia carneola*, *Caloplaca* sp. y *Parmelia* sp, respectivamente.

Tabla 1. Morfología colonial de algunas bacterias aisladas de líquenes.

Característica /Feature	YM4_2	YM18_1	YM21_2
Tamaño/Size (mm)	1.8	2.0	5.0
Color	Blanca	Beige	Amarillo
Forma/Shape	Circular	Circular	Circular
Elevación/Elevation	Plana	Convexa	Plana
Gram	Positivo	Negativo	Negative

La mayoría de los líquenes analizados en el área recreativa “Las Palomas”, Guanajuato cohabitan con bacterias, encontramos fila bacterianos Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria

Se obtuvieron 23 cepas bacterianas provenientes de 21 muestras de líquenes colectadas en el área recreativa “Las Palomas”, de las cuales 52.2 % corresponden al filo Proteobacteria, 39.1 % a Firmicutes y 8.7 % a Actinobacteria (Figura 4). En total, 9 muestras de líquenes presentaron un solo aislado bacteriano (Tabla 2).

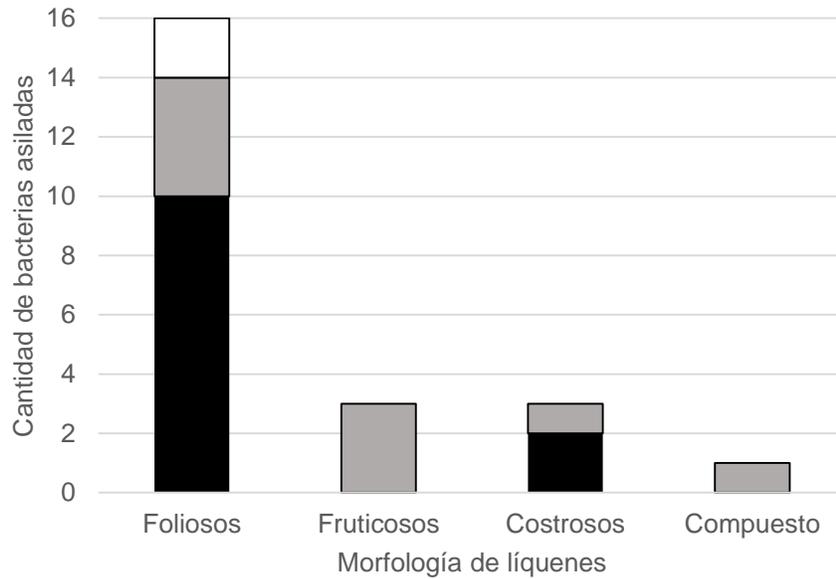


Figure 4. Proportion of bacteria of acuerdo con el filo bacteriano. Proteobacteria (■), Firmicutes (■), and Actinobacteria (□) in líquenes foliosos, fruticosos and costrosos and uno compuesto.

En este estudio se identificaron los géneros: *Mesorhizobium*, *Stutzerimonas*, *Enterobacter*, *Agrobacterium*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Paenibacillus*, *Acinetobacter*, *Caulobacter*, and *Staphylococcus* (Figura 5). A nivel cultivo no hay un patrón bacteriano relacionado con las distintas especies de líquenes muestreados, lo que sugiere que no existe una asociación requerida y/o específica entre los líquenes y estas bacterias encontradas (Liba *et al.*, 2006).

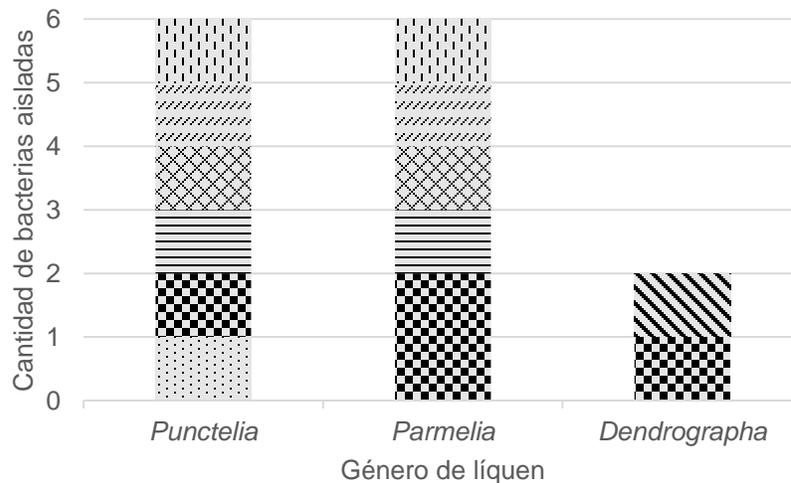


Figura 5. Géneros bacterianos aislados de líquenes. Los géneros bacterianos encontrados son: *Mesorhizobium* (□), *Bacillus* (■), *Paenibacillus* (■), *Stutzerimonas* (■), *Enterobacter* (■), *Agrobacterium* (■) y *Klebsiella* (■)

En la Tabla 2 se presentan las 23 bacterias identificadas a partir de análisis bioinformáticos utilizando la base de datos de NCBI (Zhang *et al.*, 2000). Todas las secuencias mostraron un E-value de 0 y un porcentaje de cobertura del 100 %. Además, la mayoría de ellas tuvieron un porcentaje de identidad superior al 99 %. A partir de esta identificación, se realizó un análisis filogenético que agrupó a las bacterias en los tres distintos filos encontrados: Proteobacteria, Actinobacteria y Firmicutes (Figura 6).

Tabla 2. Identificación molecular de bacterias provenientes de los líquenes estudiados.

Líquenes identificados	Código de la bacteria	% Identidad	ID NCBI	Tamaño (nt)	Nombre de la bacteria
(YM1) <i>Punctelia</i> sp.	YM1_1	98.19%	NR_114122.1	1410	<i>Mesorhizobium amorphae</i>
(YM2) <i>Phaeophyscia hispidula</i>	YM2_2	98.64%	NR_114122.1	1410	<i>Mesorhizobium amorphae</i>
(YM3) <i>Parmelia</i> sp.	YM3_2	99.71%	NR_114919.1	1503	<i>Bacillus</i> sp.
(YM5) <i>Hypotrachyna</i> sp.	YM5_1	99.69%	NR_112192.1	1976	<i>Arthrobacter globiformis</i>
(YM6) <i>Heterodermia</i> sp.	YM6_1	99.13%	NR_181874.1	1424	<i>Curtobacterium allii</i>
(YM13) <i>Physcia</i> sp.	YM13_1	98.23%	NR_180213.1	1552	<i>Bacillus clarus</i>
(YM15) <i>Parmelia</i> sp.	YM15_1	98.92%	NR_157736.1	1509	<i>Bacillus tropicus</i>
(YM20) <i>Punctelia</i> sp.	YM20_2	100%	NR_118798.1	1456	<i>Stutzerimonas stutzeri</i>
(YM20) <i>Punctelia</i> sp.	YM20_4	99.75%	NR_118568.1	1369	<i>Enterobacter cloacae</i>
(YM20) <i>Punctelia</i> sp.	YM20_5	99.92%	NR_157731.1	1509	<i>Bacillus mobilis</i>
(YM20) <i>Punctelia</i> sp.	YM20_6	99.83%	NR_116306.1	1448	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
(YM20) <i>Punctelia</i> sp.	YM20_8	99.69%	NR_112010.1	1540	<i>Klebsiella oxytoca</i>
(YM21) <i>Parmelia</i> sp.	YM21_1	99.92%	NR_180640.1	1540	<i>Klebsiella pasteurii</i>
(YM21) <i>Parmelia</i> sp.	YM21_2	99.84%	NR_118798.1	1456	<i>Stutzerimonas stutzeri</i>
(YM21) <i>Parmelia</i> sp.	YM21_5	100%	NR_116306.1	1448	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
(YM21) <i>Parmelia</i> sp.	YM21_7	99.92%	NR_118568.1	1369	<i>Enterobacter cloacae</i>
(YM7) <i>Dendrographa alectoroides</i>	YM7_1	99.92%	NR_042189.1	1505	<i>Paenibacillus cineri</i>

(YM7) <i>Dendrographa alectoroides</i>	YM7_2	100%	NR_113265.1	1455	<i>Bacillus subtilis</i>
(YM16) <i>Teloschistes</i> sp.	YM16_1	98.23%	NR_157736.1	1509	<i>Bacillus tropicus</i>
(YM8) <i>Pertusaria pseudocorallina</i>	YM8_1	100%	NR_113346.1	1460	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
(YM14) <i>Ochrolechia</i> sp.	YM14_1	95.94%	NR_114435.1	1419	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
(YM18) <i>Caloplaca</i> sp.	YM18_1	97.52%	NR_041964.1	1432	<i>Caulobacter mirabilis</i>
(YM4) <i>Cladonia carneola</i>	YM4_1	99.92%	NR_043242.1	1434	<i>Bacillus pumilus</i>

Todas las secuencias mostraron un E-value de 0, corresponde a la significancia estadística de la similitud entre dos secuencias. También, en todas las secuencias se observa un porcentaje de cobertura de 100 %, que representa la proporción de la longitud del query que se alinea con la secuencia candidata. El porcentaje de identidad corresponde a la similitud entre el query y la secuencia candidata en la base de datos.

ARTÍCULO EN PREPARACIÓN

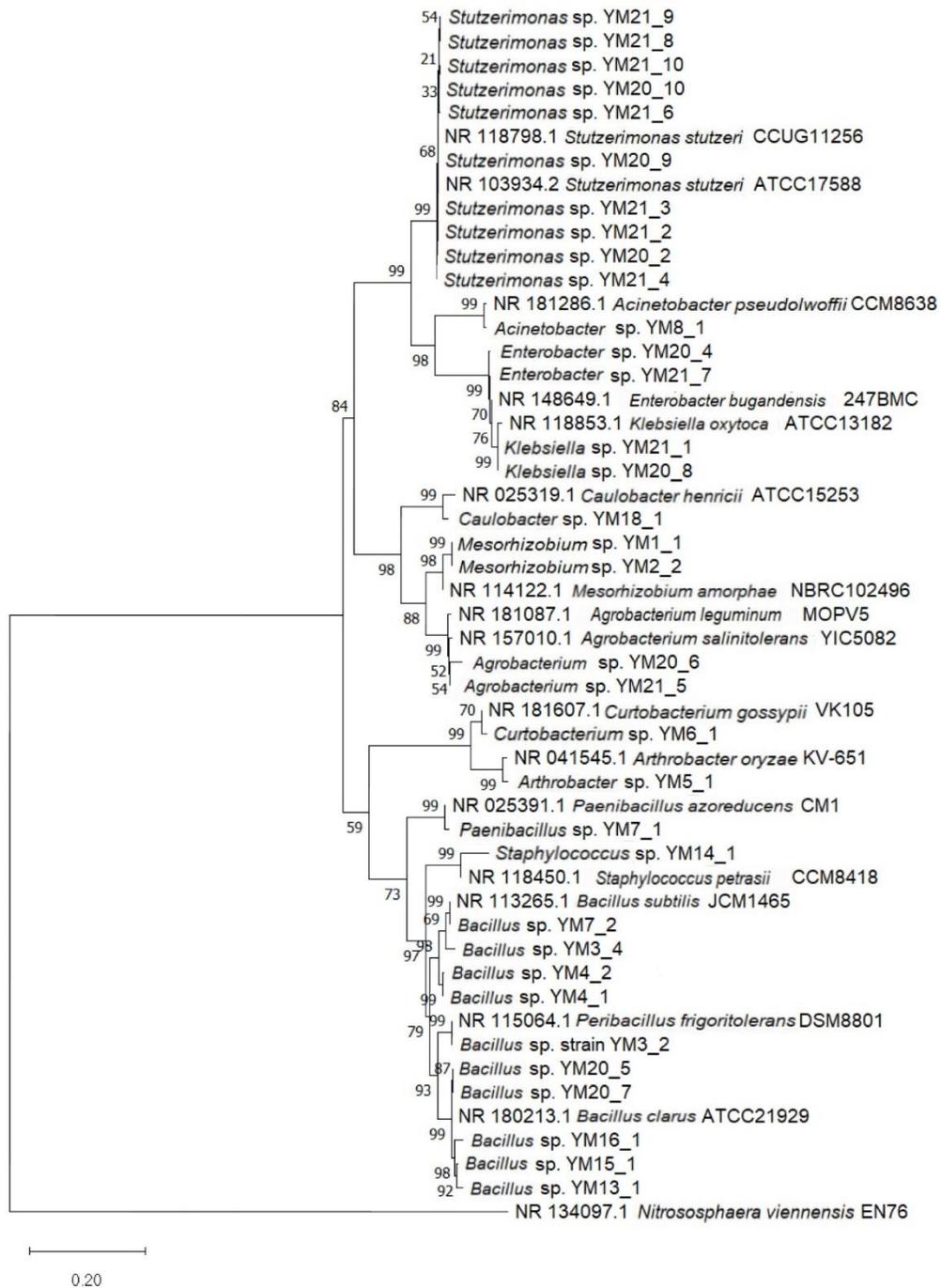


Figura 6. Análisis filogenético de secuencias de 16S rDNA realizado con el método de Máxima Verosimilitud y el modelo de sustitución 3 parámetros de Tamura (Tamura, 1992). Se muestra el árbol con la probabilidad logarítmica más alta (-9599,28). Se utilizó una distribución Gamma discreta para modelar las diferencias de tasas evolutivas entre sitios (5 categorías (+G, parámetro = 0,7258)). Este análisis involucró 51 secuencias de nucleótido con un total de 1271 posiciones en el conjunto de datos final. Los OTUS correspondientes a los aislados bacterianos contienen su código correspondiente (YM).

En total, se aislaron 10 colonias bacterianas del género *Bacillus*, correspondientes a 6 especies según la Tabla 2. Este género fue el único que se encontró tanto en líquenes fruticosos como en foliosos, y uno compuesto, siendo el único compartido entre líquenes morfológicamente distintos (Figura 7).

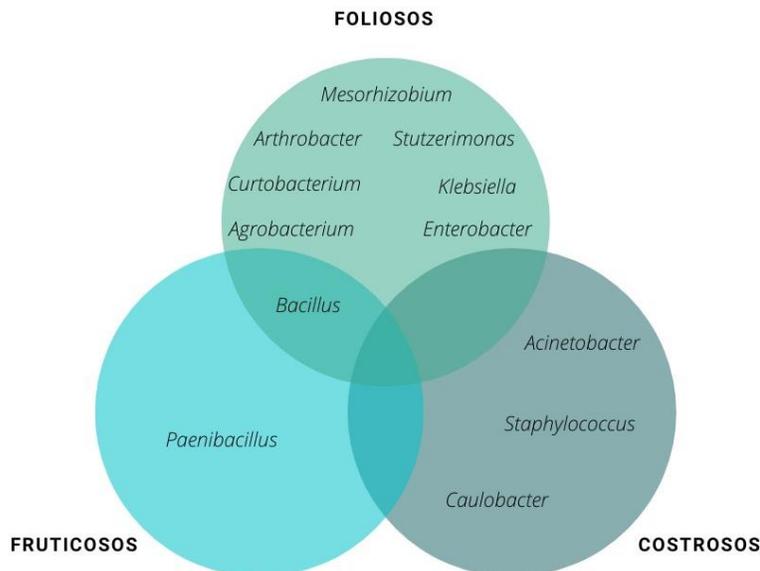


Figura 7. Diversidad de géneros bacterianos encontrados en líquenes foliosos, fruticosos y costrosos

De líquenes como *Parmelia* y *Punctelia* se obtuvieron bacterias pertenecientes al phylum Proteobacteria, estos datos coinciden con reportes previos (Grube *et al.*, 2015; Swamy & Gayathri, 2021). En general, los dos filia bacterianos más abundantes contemplando las tres morfologías de líquenes fueron Proteobacteria y Firmicutes (Figura 3), esto concuerda con el análisis que realizó Grube *et al.* (2009), en donde se identificaron cepas cultivables provenientes de líquenes (foliosos, fruticosos y costrosos), y se determinaron géneros que coinciden con los encontrados en esta investigación como *Acinetobacter*, *Bacillus* y *Paenibacillus*. Para los cuales, se ha comprobado, a partir de análisis de cultivos, la capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico en distintas especies (Grube *et al.*, 2009), sin embargo, esta característica aún no se verifica en las cepas aisladas en este trabajo, ni tampoco si el nitrógeno fijado podría ser empleado por el micobionte.

Se ha determinado que una contribución funcional de *Paenibacillus* en la simbiosis líquénica es la defensa contra patógenos; esta y otras bacterias que forman parte del microbioma del líquen se adaptan de tal forma que pueden soportar ciclos periódicos de desecación/rehidratación con posteriores eventos de oxidación, es decir, poseen mecanismos para sobrevivir a condiciones de estrés que el mismo líquen genera a manera de protección (Cernava *et al.*, 2017).

De los líquenes foliosos como *Punctelia* y *Phaeophyscia* se aislaron bacterias pertenecientes al género *Mesorhizobium* (Tabla 2), las cuales son bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN) que pueden establecer simbiosis con diversos géneros de árboles

y plantas (Helene *et al.*, 2019), sin embargo, se desconoce si esta capacidad se presenta al entrar en contacto con líquenes. El gen *nifH* que codifica a la dinitrogenasa reductasa (Hodkinson & Lutzoni, 2009) ha sido encontrado en *Mesorhizobium* spp. (Zhang *et al.*, 2020), con ello se podría determinar para las cepas de este género aisladas de estos líquenes foliosos la capacidad de fijación de nitrógeno a partir de la amplificación y evaluación del nivel de expresión de dicho gen.

No se lograron obtener aislados bacterianos de algunos líquenes (YM9-12, YM17 y YM19; Figura 2). Esto no implica necesariamente la ausencia de bacterias simbióticas en los talos liquénicos, sino que podría deberse a una manipulación deficiente, especialmente durante la maceración, etapa crucial para obtener una mayor diversidad bacteriana presente en los talos liquénicos. Además, dado que estos estudios dependieron del cultivo, los análisis genéticos se realizaron en colonias con morfologías diferentes. Sin embargo, es posible que se hayan descartado cepas morfológicamente similares, pero genéticamente distintas (Cardinale *et al.*, 2006), lo cual podría explicar por qué algunos líquenes (Tabla 2) presentaron solamente un aislado bacteriano.

Del líquen *Caloplaca* sp. se aisló la bacteria *Caulobacter* sp. (Tabla 2), muchas especies de este género bacteriano se encuentran en diversos ambientes, como minas de oro, agua (ríos, estanques, pozos, etc.) y suelo (Poindexter, 1962; Curtis & Brun, 2010). Así mismo, *Caulobacter* sp. se ha identificado en muestras de suelo por debajo de líquenes (Navarro-Noya *et al.*, 2013), lo que podría indicar que ciertas bacterias que existen en su hábitat natural podrían hospedarse en los líquenes que subyacen su entorno, formándose de este modo una simbiosis bacteria-liquen, que según Grube *et al.* (2009), si las bacterias se mantienen en diferentes situaciones ecológicas, podrían a largo plazo contribuir a la adaptación ecológica del líquen.

Del phylum Actinobacteria se aislaron solamente bacterias como *Curtobacterium* y *Arthrobacter*, las cuales se han descrito principalmente en suelos y en asociación con plantas (Jones & Keddie, 2006; Chase *et al.*, 2016). En estudios anteriores, se han encontrado estos géneros bacterianos asociados con líquenes (Cardinale *et al.*, 2006; Selbmann *et al.*, 2010), su interés es relevante, debido a que los actinomicetos producen el 40 % de los antibióticos y el 38 % de los metabolitos bioactivos, y debido a la creciente resistencia a los antibióticos, se ha intensificado la búsqueda de nuevos taxones productores de nuevos compuestos bioactivos, con ello, los líquenes representan un nicho importante en donde albergan Actinobacterias con potencial biotecnológico (Liu *et al.*, 2017).

En el estudio de Kim *et al.* (2019) se determinó que cepas de *Bacillus* spp. provenientes de líquenes son capaces de producir agentes antimicrobianos contra bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* y *Staphylococcus aureus*. Lo anterior, podría sugerir que, las cepas de *Bacillus* obtenidas en esta investigación podrían tener capacidad antimicrobiana contra diversos patógenos, de ser así, se podría experimentalmente comprobar este hecho, además de la posible resistencia antibiótica de las bacterias en contacto con *Bacillus* sp. provenientes de ciertos líquenes.

Además, en este trabajo, se aisló *Stutzerimonas stutzeri* de los líquenes *Punctelia* y *Parmelia* (Figuras 5 y 6). Recientemente, se propuso el género *Stutzerimonas* dentro de la familia Pseudomonadaceae que incluye cepas que anteriormente correspondían al grupo filogenético *Pseudomonas stutzeri* (Lalucat *et al.*, 2022), esta bacteria ha sido aislada de líquenes foliosos privados de cianobacterias y se ha demostrado su capacidad de fijar nitrógeno, además se encontró que *P. stutzeri* y *Acinetobacter* sp. liberan ciertos aminoácidos al ambiente, y dado que estas bacterias están en contacto con los líquenes, pueden contribuir a su nutrición proporcionándoles directamente estas moléculas (Liba *et al.*, 2006). También, las cepas de *Stutzerimonas* aisladas podrían tener la capacidad de ser utilizadas para la biorremediación de cuerpos de agua contaminados con selenio, debido a que, se ha reportado que *S. stutzeri* NT-I es capaz de reducir selenato y selenito en selenio elemental y especies de selenio volátil, lo cual es conveniente para el tratamiento de aguas residuales contaminados con estos componentes tóxicos (Kuroda *et al.*, 2022).

Conclusiones

Los líquenes son asociaciones compuestas por un socio fúngico y un alga y/o cianobacteria. Este estudio aporta información de la presencia de bacterias de diversos géneros asociados a líquenes con morfología foliosa, fruticosa, costrosa y uno compuesto (*Cladonia*), muestreados en una zona natural protegida del estado de Guanajuato. Se aislaron mayormente bacterias pertenecientes al filo Proteobacteria. Las bacterias encontradas no se comparten entre las diferentes formas de crecimiento que exhiben los líquenes (a excepción del género *Bacillus*), sin embargo, como no se puede afirmar que los géneros bacterianos encontrados en los distintos líquenes estudiados son los únicos que forman parte de los microbiomas de estos líquenes, se estima que podría habitar una diversidad bacteriana aún más grande que la determinada en esta investigación, con lo cual, se propone realizar más estudios dependientes e independientes de cultivo sobre determinación de bacterias asociadas a diversos líquenes en Guanajuato, y determinar las funciones que realizan las bacterias identificadas que podrían estar asociadas al mantenimiento de la simbiosis, evitar la pérdida de humedad, proteger a las fracciones liquénicas, entre otras. Otro aspecto de interés a evaluar sería determinar si las bacterias identificadas en este trabajo pueden sintetizar metabolitos de interés biotecnológico. Estos hallazgos no solo enriquecen nuestra comprensión de las asociaciones simbióticas en los líquenes, sino que también plantean interrogantes sobre las posibles funciones que desempeñan estas bacterias en este ecosistema particular. Sin duda, este estudio sienta las bases para futuras investigaciones que explorarán más a fondo el papel y la importancia de estas bacterias en los líquenes de Guanajuato.

Contribución de los autores

Conceptualización del trabajo, VLR; desarrollo de la metodología, YLM, AECG; manejo de software, YLM, VLR; validación experimental, YLM, VLR; análisis de resultados, YLM, VLR; Manejo de datos, YLM; escritura y preparación del manuscrito, YLM.; redacción, revisión y edición, YLM, VLR, DRG; administrador de proyectos, VLR.; adquisición de fondos, VLR.

Todos los autores de este manuscrito han leído y aceptado la versión publicada del mismo.

Financiamiento

Esta investigación no recibió financiamiento externo.

Agradecimientos

Agradecemos al Tecnológico Nacional de México por el apoyo financiero del proyecto, así como al Instituto Tecnológico Superior de Irapuato por brindar las facilidades para la ejecución de este proyecto. También, agradecemos a José Francisco Cabrera Rangel por su apoyo.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Referencias

- Antolín, D. P., Delgado, H. E., Díaz, C. J., Fernández, R. L., Gómez, C. L., Gómez, I. M., Sánchez, S. L., Sanchón, B.A., Martina, M. D. S., & Garrido, H. M. V. (2021). Estudio de contaminación en Salamanca utilizando líquenes como bioindicadores. *Revista de Investigación Científica para Alumnos de Enseñanza Secundaria. Meridies*, 24,53-58. <https://www.meridies.info/assets/meridies-24.pdf>
- Aschenbrenner, I. A., Cernava T., Berg G., & Grube, M. (2016). Understanding Microbial Multi-Species Symbioses. *Frontiers in Microbiology*, 7,180. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00180>
- Biosca, E. G., Flores, R., Santander, R. D., Díez-Gil, J. L., & Barreno E. (2016). Innovative Approaches Using Lichen Enriched Media to Improve Isolation and Culturability of Lichen Associated Bacteria. *PLoS One*. 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160328>
- Brodo, I. M. (2016). *Keys to Lichens of North America: Revised and Expanded*. Yale University Press.
- Büdel, B., & Scheidegger, C. (2008). Thallus morphology and anatomy. In T. H. III. Nash. *Lichen Biology*, (pp. 40-68). Ed. Cambridge University Press.
- Cappitelli, F., & Sorlini, C. (2008). Microorganisms Attack Synthetic Polymers in Items Representing Our Cultural Heritage. *Applied And Environmental Microbiology*, 74(3), 564-569. <https://doi.org/10.1128/aem.01768-07>
- Cardinale, M., Puglia, A. M. & Grube, M. (2006). Molecular analysis of lichen-associated bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 57(3), 484-495. <https://doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00133.x>
- Cardinale, M., Steinová, J., Rabensteiner, J., Berg, G., & Grube, M. (2011). Age, sun and substrate: triggers of bacterial communities in lichens. *Environmental Microbiology Reports*, 4(1), 23-28. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00272.x>
- Cernava, T., Erlacher, A., Aschenbrenner, I., Krug, L., Lassek, C., Riedel, K., Grube, M. & Berg, G. (2017). Deciphering functional diversification within the lichen microbiota by meta-omics. *Microbiome*, 5(82), <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0303-5>
- Chase, A. B., Arévalo, P., Polz, M. F., Berlemont, R. & Martiny, J. B. H. (2016). Evidence for Ecological Flexibility in the Cosmopolitan Genus *Curtobacterium*. *Frontiers in Microbiology*, 7, Article 1849. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01874>
- Curtis, P. D., & Brun, Y. V. (2010). Getting in the Loop: Regulation of Development in *Caulobacter crescentus*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(1), 13-41. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00040-09>
- Gilbert, O. L. (1990). The Lichen Flora of Urban Wasteland. *The Lichenologist*, 22(1), 87-101. <https://doi.org/10.1017/s0024282990000056>
- Google. (2022). Google Earth. <https://www.google.com/earth/>
- Grube, M., Cardinale, M., de Castro, J. V. Jr., Müller, H. & Berg, G. (2009). Species-specific structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbioses. *The ISME Journal*, 3, 1105-1115. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.63>

- Grube, M., Cernava, T., Soh, J., Fuchs, S., Aschenbrenner, I., Lassek, C., Wegner, U., Becher, D., Riedel, K., Sensen, C. W. & Berg, G. (2015). Exploring functional contexts of symbiotic sustain within lichen-associated bacteria by comparative omics. *The ISME Journal*, 9, 412-424. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.138>
- Grube, M. & Berg, G. (2009). Microbial consortia of bacteria and fungi with focus on the lichen symbiosis. *Fungal Biology Reviews*, 23(3), 72-85. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2009.10.001>
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Helene, L. C. F., Dall'Agnol, R. F., Delamuta, J. R. M. & Hungaria, M. (2019). *Mesorhizobium atlanticum* sp. nov., a new nitrogen-fixing species from soils of the Brazilian Atlantic Forest biome. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(6), 1800-1806. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003397>
- Herrera-Campos, M. de los Á., Lücking, R., Pérez-Pérez, R. E., Miranda-González, R., Sánchez, N., Barcenas-Peña, A., Carrizosa, A., Zambrano, A., Ryan, B. D. & Nash, T. H. III. (2014). Lichen biodiversity in Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 82-99. <https://doi.org/10.7550/rmb.37003>
- Hodkinson, B. P., & Lutzoni, F. (2009). A microbiotic survey of lichen-associated bacteria reveals a new lineage from the Rhizobiales. *Symbiosis*, 49, 163-180. <https://doi.org/10.1007/s13199-009-0049-3>
- Huang, H. D., Wang, W., Ma, T., Li, G. Q., Liang, F. L. & Liu, R. L. (2009). *Sphingomonas sanxanigenens* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(4), 719-723. <https://doi.org/10.1099/ijis.0.000257-0>
- Huang, H. Y., Li, J., Zhao, G. Z., Zhu, W. Y., Yang, L. L., Tang, H. Y., Xu, L. H., & Li, W. J. (2012). *Sphingomonas endophytica* sp. nov., isolated from *Artemisia annua* L. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(Pt_7), 1576-1580. <https://doi.org/10.1099/ijis.0.031484-0>
- Illana-Esteban, C. (2012). Líquenes usados en Medicina Tradicional. *Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid*, 36, 163-174.
- Jones, D., & Keddie, R. M. (2006). The Genus *Arthrobacter*. In Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H. & Stackebrandt E. *The Prokaryotes*. (pp. 945-960). Ed. Springer eBooks. https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5_36
- Kim, B., Han, S. R., Lamichhane, J., Park, H. & Oh, T. J. (2019). Draft Genome Analysis of Antimicrobial *Streptomyces* Isolated from Himalayan Lichen. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(7), 1144-1154. <https://doi.org/10.4014/jmb.1906.06037>
- Kuroda, M., Sei, K., Yamashita, M. & Ike, M. (2022). Draft Genome Sequence of *Stutzerimonas stutzeri* NT-I, Which Reduces Selenium Oxyanions into Elemental Selenium and Volatile Selenium Species. *Microbiology Resource Announcements*, 11(12), Article 101016-22. <https://doi.org/10.1128/mra.01016-22>
- Lalucat, J., Gomila, M., Mulet, M., Zaruma, A., & García-Valdés, E. (2022). Past, present and future of the boundaries of the *Pseudomonas* genus: Proposal of *Stutzerimonas* gen. Nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 45(1), Article 126289. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2021.126289>
- Liba, C. J., Ferrara, F., Manfio, G. P., Fantinatti-Garborggini, F., Albuquerque, R., Pavan, C., Ramos, P., Moreira-Filho, C. A. & Barbosa, H. R. (2006). Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones. *Journal of Applied Microbiology*, 101(5), 1076-1086. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03010.x>
- Liu, C., Jiang, Y., Wang, X., Chen, D., Chen, X., Wang, L., Han L., Huang, X. & Jiang, C. (2017). Diversity, Antimicrobial Activity, and Biosynthetic Potential of Cultivable Actinomycetes Associated with Lichen Symbiosis. *Microbial Ecology*, 74(3), 570-584. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-0972-4>
- Martínez-Vargas, B. I. & Pérez-y-Terrón, R. (2020). Diversity of non-photosynthetic bacteria and their metabolic processes associated with lichens. *Alliances and Trends BUAP*, 5(20), 155-171. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/9785>
- Mikhaylov, A. (2020). Lichens as indicators of atmospheric pollution in urban ecosystems. *Israel Journal of Ecology and Evolution*, 67(1-2), 60-68. <https://doi.org/10.1163/22244662-bja10016>
- Nash, T. H. III. (2008). *Lichen Biology*. Cambridge University Press
- Navarro-Noya, Y. E., Jiménez-Aguilar, A., Valenzuela-Encinas, C., Alcántara-Hernández, R. J., Ruíz-Valdiviezo, V. M., Ponce-Mendoza, A., Luna-Guido, M., Marsch, R. & Dendooven, L. (2013). Bacterial Communities in Soil Under Moss and Lichen-Moss Crusts. *Geomicrobiology Journal*, 31(2), 152-160. <https://doi.org/10.1080/01490451.2013.820236>

- Oksanen, I. (2006). Ecological and biotechnological aspects of lichens. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 73(4), 723-734. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0611-3>
- Pankratov, T. A. (2018). Bacterial complexes of Khibiny Mountains lichens revealed in *Cladonia uncialis*, *C. portentos*, *Alectoria ochroleuca* and *Nephroma arcticum*. *Microbiology*, 87, 79-88. <https://doi.org/10.1134/S0026261718010149>
- Poindexter, J. S. (1962). Biological properties and classification of the *Caulobacter* group. *Bacteriological Reviews*, 28(3), 231-295. <https://doi.org/10.1128/br.28.3.231-295.1964>
- Rosenwinkel, S., Korup, O., Landgraf, A., & Dzhumabaeva, A. (2015). Limits to lichenometry. *Quaternary Science Reviews*, 129, 229-238. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2015.10.031>
- Sanders, W. B. (2001). Lichens: The Interface between Mycology and Plant Morphology: Whereas most other fungi live as an absorptive mycelium inside their food substrate, the lichen fungi construct a plant-like body within which photosynthetic algal symbionts are cultivated. *BioScience*, 51(12), 1025-1035. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2001\)051\[1025:LTIBMA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2001)051[1025:LTIBMA]2.0.CO;2)
- Selbmann, L., Zucconi, L., Ruisi, S., Grube, M., Cardinale, M., & Onofri, S. (2010). Culturable bacteria associated with Antarctic lichens: affiliation and psychrotolerance. *Polar Biology*, 33(1), 71-83. <https://doi.org/10.1007/s00300-009-0686-2>
- Shishido, T. K., Wahlsten, M., Laine, P., Rikkinen, J., Lundell, T., & Auvinen, P. (2021). Microbial Communities of *Cladonia* Lichens and Their Biosynthetic Gene Clusters Potentially Encoding Natural Products. *Microorganisms*, 9(7), 1347. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071347>
- Sierra, M. A., Danko, D. C., Sandoval, T. A., Pishchany, G., Moncada, B., Kolter, R., Mason, C. E. & Zambrano, M. M. (2020). The Microbiomes of Seven Lichen Genera Reveal Host Specificity, a Reduced Core Community and Potential as Source of Antimicrobials. *Frontiers in Microbiology*, 11, Article 398. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00398>
- Swamy, C. T., & Gayathri, D. (2021). High throughput sequencing study of foliose lichen-associated bacterial communities from India. *Molecular Biology Reports*, 48, 2389–2397. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06272-6>
- Tamura, K. (1992). Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution*, 9(4), 678-687. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040752>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027 <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673-4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Zhang, J., Peng, S., Shang, Y., Brunel, B., Li, S., Zhao, Y., Liu, Y., Chen, W., Wang, E., Sing, R. P., & James, E. K. (2020). Genomic diversity of chickpea-nodulating rhizobia in Ningxia (north central China) and gene flow within symbiotic *Mesorhizobium muleiense* populations. *Systematic and Applied Microbiology*, 43(4), Article 126089. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126089>
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. & Miller, W. (2000). A Greedy Algorithm for Aligning DNA Sequences. *Journal of Computational Biology*. 7(1-2), 203-214. <https://doi.org/10.1089/10665270050081478>
- Zhao, Y., Wang, M., & Xu, B. (2021). A comprehensive review on secondary metabolites and health-promoting effects of edible lichen. *Journal Of Functional Foods*, 80, 104283. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104283>
- Zuñiga-González, R. A., Álvarez-Barajas, I. L., Corral-Avitia, A. Y., Flores-Margez, J. P., Enríquez-Anchondo, I. D., & Quiñónez-Martínez, M. (2021). Diversity, ecology and potential use of epiphytic lichens from Chihuahua. *Science on the Frontier: UACJ Journal of Science and Technology*, 16(2), 19-32. <http://cathi.uaci.mx/bitstream/handle/20.500.11961/21370/Articulo%202021%20Liquenes%20epifitos%20de%20chihuahua%20ciencia%20en%20la%20frontera.pdf?sequence=1&isAllowed=y>