

AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS ASOCIADOS A LA SIMBIOSIS LIQUÉNICA EN ESPECIES DEL ESTADO DE GUANAJUATO

Bajonero Arroyo María Fernanda (1), Álvarez Mejía César (2), López Ramírez Varinia (3)

1 [Coordinación de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato] | [marifer1995com2@gmail.com]

2 [Coordinación de Ingeniería Ambiental, Instituto Tecnológico Superior de Abasolo] | [cesar.alvarez@tecabasolo.edu.mx]

3 [Coordinación de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato] | [valopez@itesi.edu.mx]

Resumen

Los líquenes son organismos caracterizados por la relación simbiótica existente entre tres microorganismos que los constituyen: un hongo, un alga o cianobacteria y una levadura; éstos se encuentran distribuidos alrededor del mundo, incluso en ambientes contaminados ya que toleran algunos contaminantes. México es un país que cuenta con una gran variedad de líquenes; se han reportado 90 especies en el estado de Guanajuato, por lo que, el estudio de los mismos permitirá conocer aquellas especies tolerantes a condiciones ambientales adversas, así como la microbiota asociada. En el presente trabajo, se realizó el aislamiento de distintos microorganismos presentes en líquenes de los géneros *Usnea*, *Parmelia*, *Hypogymnia*, *Melanelixia*, *Pseudevernia* y *Teloschistes*, que fueron obtenidos del área natural de Charco Azul en Xichú, Guanajuato. Se aplicaron distintas técnicas de lavado y macerado, para así determinar el método más adecuado de obtención de microorganismos, y las muestras fueron sembradas en medios de cultivo con distinta especificidad. Se obtuvieron un total de 32 aislados de hongos, 7 de bacterias y uno de alga. Actualmente, se está trabajando en la identificación molecular de las distintas especies a partir de la amplificación, secuenciación y análisis de la región ITS, los genes 16S rDNA y *rbcL*.

Abstract

Lichens are organisms whose main characteristic is the symbiotic relationship between the three microorganisms: a fungus, an alga and a yeast. Lichens are widely distributed all over the world because they can grow even in contaminated environments. México is a country with a widely variety of lichen species and particularly the state of Guanajuato has, approximately, 90 distinct species. In this research, we performed the isolation of the microorganisms related to the symbiosis in 6 different lichens samples: *Usnea*, *Parmelia*, *Hypogymnia*, *Melanelixia*, *Pseudevernia* and *Teloschistes*; the lichens were sampled at the natural area of Charco Azul at Xichú, Guanajuato. We obtained a total of 20 fungal cultures, 5 bacterial cultures and 1 algae culture. Now we are working on the molecular identification of the microorganisms.

Palabras clave

Líquenes; Simbiosis; Levaduras; Micobiontes; Fotobiontes.

INTRODUCCIÓN

Los líquenes son organismos que presentan una relación simbiótica entre los 3 elementos que los componen: un hongo (micobionte), un alga o cianobacteria (fotobionte) y una levadura dicha relación simbiótica es considerada de tipo mutualista, pues entre las fracciones, especialmente el hongo y el alga o cianobacteria, existe un constante intercambio de metabolitos los cuales permiten y aseguran la supervivencia del líquen. [1]

Este constante intercambio de metabolitos ha permitido que los líquenes se desarrollen en una amplia variedad de ecosistemas, lo que los convierte en organismos cosmopolitas; incluso se ha observado que algunas especies liquénicas son capaces de sobrevivir en ambientes que han sido contaminados por sustancias tales como metales pesados. Los líquenes han sido utilizados como bioindicadores de los ecosistemas, y su capacidad de bioacumular o metabolizar metales pesados ha sido de especial interés. [2] [3] [4]

De tal forma que, en el presente trabajo, se buscó aislar las fracciones constituyentes de la simbiosis para así ampliar el conocimiento sobre los mismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras: Las muestras de líquenes fueron colectadas en Charco Azul, en el municipio de Xichú, Guanajuato. La cuáles se removieron de su sustrato con una navaja, para evitar el daño de las mismas y, posteriormente, fueron depositadas en un sobre de papel manila y en la parte frontal superior del mismo se colocaron las coordenadas (latitud y longitud) del sitio de muestreo; los sobres fueron almacenados a temperatura ambiente.

Identificación de especies liquénicas: Se realizó a partir del análisis morfológico de las muestras mediante el uso de un estereoscopio digital Leica® con un zoom de 50-500X. Por otra parte, se realizó

la identificación química de las especies. Para ello empleamos KOH al 10% (K); HNO₃ al 50%; lugol al 10% e hipoclorito de sodio comercial (C). Para la realización de dichas pruebas se colocó un trozo pequeño de la muestra y se le agregó una o dos gotas de cada reactivo anteriormente mencionado, así como diversas combinaciones de los mismos (KC, CK) y posteriormente se evaluó si existía una respuesta colorimétrica del líquen con las sustancias antes mencionadas. Una vez realizadas las pruebas en todas las muestras se procedió a la identificación de cada una mediante el uso de distintas guías dicotómicas y bases de datos públicas internacionales [5].

Aislamiento de organismos simbiotes: El aislamiento consistió en la aplicación de dos distintas estrategias: la primera se basó en la metodología propuesta por Biosca *et al.*, 2016 [6]; con modificaciones respecto a la composición de soluciones empleadas, así como los tiempos de lavado y macerado, tal como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de soluciones de lavado y macerado

		Soluciones para el lavado		
		1 mL etanol (0.5 min)	500 µL etanol (1 min)	20 µL jabón & 1 mL agua destilada (1 min)
Soluciones para macerar	Buffer PBS	T1.1	T2.1	T3.1
	NaCl 0.9% (w/w)	T1.2	T2.2	T3.2

Una vez que se maceraron las muestras, se sembraron 100 µL de dicha solución en agar nutritivo, PDA, YPD, Dextrosa-Sabouraud y BG11 (de los cuales todos, excepto el agar nutritivo y BG11, contenían Moxifloxacino como antibiótico (100 µL/mL).

La segunda estrategia se basó en la aplicación de distintos enjuagues con los cuales se buscaba

asegurar la desinfección de las muestras; dichos enjuagues se realizaban en el siguiente orden:

1. 1 mL de NaClO al 10% durante 1 minuto.
2. 1 mL de agua destilada estéril con 20 μ L de jabón durante 1 minuto.
3. 1 mL de agua destilada estéril durante un minuto (3 veces).

De tal forma que la muestra enjuagada y sin macerar se colocó en agar nutritivo, PDA, YPD y Dextrosa Sabouraud (de los cuales todos, excepto el agar nutritivo, contenían antibiótico).

En ambas estrategias se dejaron crecer los cultivos a 30°C por aproximadamente dos semanas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se colectaron un total de 70 muestras de líquenes, las cuales fueron identificadas por sus características morfológicas y su reactividad química, lográndose identificar solo 60 de las mismas y determinando que pertenecían a los géneros *Cladonia sp.*, *Usnea sp.*, *Teloschistes sp.*, *Evernia sp.*, *Pseudevernia sp.*, *Hypogymnia sp.*, *Punctelia sp.*, *Parmelia sp.*, *Amandinea sp.*, *Phlyctis sp.*, *Lepraria sp.*, *Pleurosticta sp.*, *Ochrolechia sp.*, *Peltigera sp.*, *Phycia sp.*, *Thelomma sp.*, *Aspicilia sp.*, *Lecidela sp.*, *Pseudocyphellaria sp.*, *Sticta sp.*, *Diploschistes sp.*, *Chroothrix sp.*, *Lecanora sp.*, *Candelaria sp.* y *Umbilicaria sp.*; además dos de las muestras recolectadas pertenecían a la especie de alga *Trentepohlia aurea*.

De tal forma que se seleccionaron 6 muestras pertenecientes a los géneros o especies *Usnea subfloridana*, *Hypogymnia physodes*, *Parmelia sulcata*, *Pseudevernia*, *Melanelixia* y *Teloschistes*, cada una de las cuales fue sometida procesos de lavado y desinfección o, en su caso, macerado. De dichas muestras, se obtuvieron distintos cultivos tanto bacterianos como también fúngicos, los cuales, presentaron variaciones relacionadas con el procedimiento previo a la siembra (lavado, desinfección y macerado) al cual habían sido sometidos.

De forma general, se obtuvieron un total de 32 cultivos de hongos, 7 de bacterias y 1 de algas, sin hasta el momento haberse obtenido algún cultivo de levaduras.

En la Figura 1, se pueden observar algunos cultivos fúngicos obtenidos a partir de la muestra perteneciente a *H. physodes*, donde pueden observarse diferencias fenotípicas en el micelio; es necesario mencionar que algunos de estos aislados podrían corresponder a hongos epífitos y no líquénicos, tal como algunos ejemplos descritos por Etayo & López (2009) [7].

En las Figuras 2-6, se pueden observar los cultivos tanto fúngicos como bacterianos obtenidos a partir de las muestras pertenecientes a *P. sulcata*, *U. subfloridana*, *Melanelixia*, *Teloschistes* y *Pseudevernia* respectivamente; en todos ellos se presentan cultivos, sobre todo fúngicos, con claras diferencias morfológicas (tal como se había mencionado en los cultivos pertenecientes a *H. physodes*).

Respecto a los cultivos bacterianos obtenidos en algunas muestras, la presencia de los mismos concuerda con hallazgos realizados por Biosca *et al.* (2016) [6]; donde se planteaba que en muchas de las especies de líquenes existe presencia de bacterias, sin que aún se halla determinado si éstas se relacionan y/o desempeñan un papel importante en la simbiosis.

En la Figura 7 se muestran, en el panel A, tinciones Gram de un par de muestras bacteriana de *U. subfloridana* y en las cuales se observa la presencia de bacilos Gram positivo y negativo, sin que se haya determinado aún el género o especie de dichos aislados. En el panel B de la Figura 7, se observa la microfotografía del micelio obtenido de *P. sulcata*, donde pueden observarse ascas, lo cual indica que el hongo en cuestión es un ascomiceto, sin que hasta el momento se haya determinado la especie.

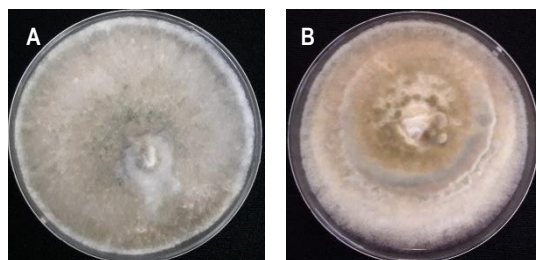


FIGURA 1: Cultivos fúngicos obtenidos de *H. physodes*, sembrados en A. agar PDA y B. agar Dextrosa-Sabouraud; sometidos a la segunda estrategia de procesamiento de muestras.

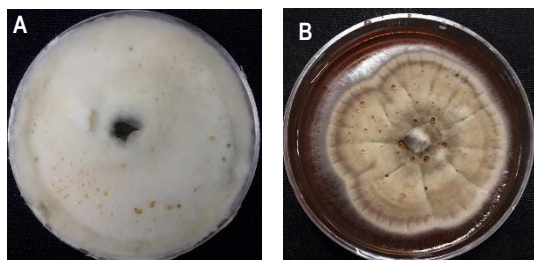


FIGURA 2: Cultivos fúngicos obtenidos de *P. sulcata*, sembrados en agar Dextrosa-Sabouraud sometidos a la primera estrategia de procesamiento de muestras, siendo A. T3.2 y B. T3.2.

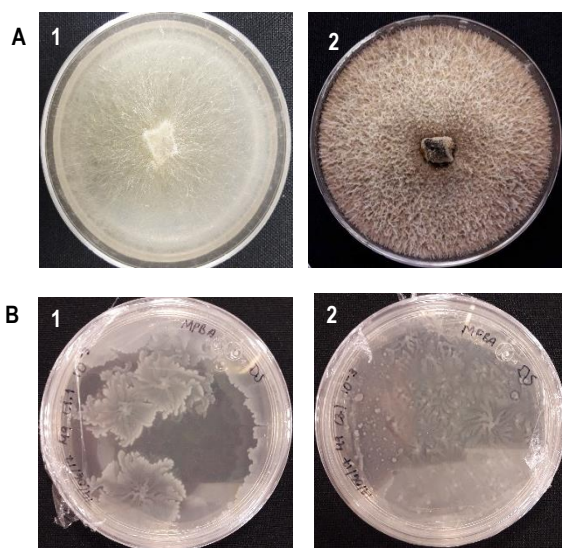


FIGURA 3: Cultivos fúngicos y bacterianos obtenidos de *U. subfloridana*, sembrados en 1A. agar nutritivo; 2A, 1B, y 2B agar Dextrosa-Sabouraud; sometidos a la primera estrategia de procesamiento de muestras, siendo 1A. T1.1 y 2A. T3.1, 1B. T1.1 y 2B. T3.1.

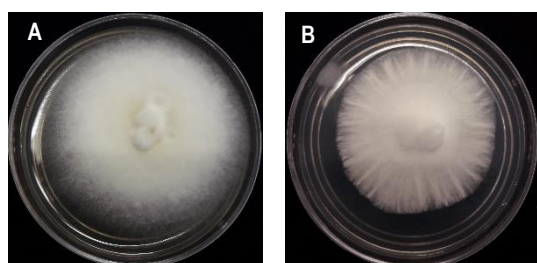


FIGURA 4: Cultivos fúngicos obtenidos de *Melanelixia*, sembrados en A. agar Dextrosa-Sabouraud y B. PDA; sometidos a la segunda estrategia de procesamiento de muestras.

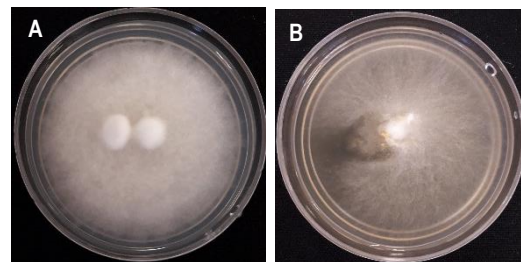


FIGURA 5: Cultivos fúngicos obtenidos de *Teloschistes*, sembrados en A. PDA y B. agar nutritivo; sometidos a la segunda estrategia de procesamiento de muestras.

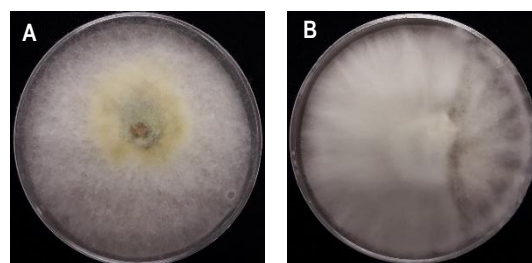


FIGURA 6: Cultivos fúngicos obtenidos de *Pseudevernia*, sembrados en A. agar Dextrosa-Sabouraud y B. agar nutritivo; sometidos a la segunda estrategia de procesamiento de muestras.

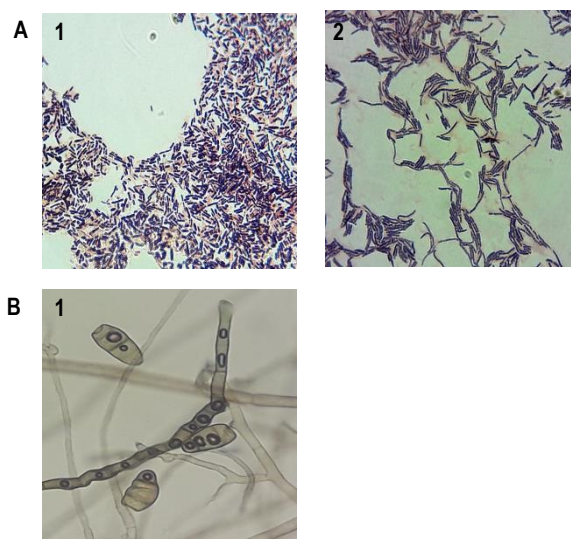


FIGURA 7: Tinción de Gram y microcultivos obtenidos de *U. subfloridana*, sembrados en Dextrosa-Sabouraud; sometidos a la primera estrategia de procesamiento de muestras, siendo 1A. 1.1 y 2A. T3.1, 1B. T3.2; observados con 1A y 2A objetivo 100x, 1B objetivo 40x.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, se logró inferir que el tipo de procesamiento (lavado, desinfectado y/o macerado) al cual se sometía la muestra, previo a la siembra; se encontró que aquellas muestras que habían sido lavadas con alcohol presentaban un menor crecimiento comparado con las otras estrategias y, además, no se presentaba crecimiento de células de algas; de tal forma que se determinó que de acuerdo con la primera estrategia de procesamiento el método más adecuado era aquel donde la muestra se lavaba de forma superficial con jabón, posteriormente se macera con solución de NaCl 0.9% (w/w) y, respecto a la segunda estrategia de procesamiento, ésta también mostró efectividad para la obtención de distintos cultivos.

Es necesario realizar la caracterización molecular de los aislados para así determinar la diversidad microbiana asociada a las distintas especies líquénicas objeto del presente trabajo y evaluar si estos aislados están involucrados en la regulación de procesos bioquímicos de los líquenes.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Varinia López Ramírez por haberme aceptado en su laboratorio y por siempre estar dispuesta a ayudarme y resolver mis dudas, así como al Dr. César Álvarez Mejía por la disposición para compartir su conocimiento; también a mis compañeros del Laboratorio de Diversidad e

Interacción Microbiana, por hacer más amenas las largas horas de trabajo.

REFERENCIAS

- [1] Herrera-Campos, M., Lücking, R., Pérez-Pérez, R., Miranda-González, R., Sánchez, N., Bárcenas, A., Carrizosa, A., Zambrano, A., Ryan, B., Nash, T. (2014). Biodiversidad de líquenes en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 82-99.
- [2] Cloquet, C., Estrade, N., Carignan, J. (2015). Ten years of elemental atmospheric metal fallout pb isotopic composition monitoring using lichens in northeastern France. *C.R. Geoscience*, 347, 257-266.
- [3] Van der Wat, L. & Forbes, P. (2015). Lichen as biomonitors for organic air pollutants. *Trends in Analytical Chemistry*, 64, 165-172.
- [4] Jiménez-Moreno, M., Barre, J., Perrot, V., Bérail, S., Rodríguez, R., Amouroux, D. (2015). Sources and fate of mercury pollution in Almaden mining district (Spain): evidences from mercury isotopic compositions in sediments and lichens. *Chemosphere*, 147, 430-438.
- [5] Hale, M. (1969). *How to know the lichens*. EUA: WM.C. Brown Company Publishers.
- [6] Biosca, E., Flores, R., Santander, R., Díez-Gil, J., Barreno, E. (2016). Innovative approaches using lichen enriched media to improve isolation and culturability of lichen associated bacteria. *PLoS ONE*, 11 (8).
- [7] Etayo, J. & López, M. (2009). Líquenes epífitos y hongos liquenícolas del Bosque Viejo de Munain-Okariz. *Nova Acta Científica Compostelana (Biloxia)*, 17, 11-29.