

**Análisis de la diversidad y el potencial bioactivo de bacterias asociadas a líquenes de
Páramo en el Parque Nacional Natural Chingaza.**

María Alejandra Sierra García

Trabajo de grado para optar por el título de **Bióloga**

DIRECTORA:

María Mercedes Zambrano Eder

Ph.D Microbiología Y Genética Molecular

Universidad Industrial De Santander

Facultad De Ciencias

Escuela De Biología

Bucaramanga

2018

Agradecimientos

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos:

A la Dra. María Mercedes Zambrano por su acompañamiento durante la dirección de mi tesis, la confianza en mi trabajo y enseñanzas académicas y personales.

A la Corporación CorpoGen por abrirme las puertas y contribuir a mi formación científica.

A Juan Manuel Anzola por su paciencia y asesoría en los análisis bioinformáticos.

A mis compañeros de laboratorio, Adán Ramírez, Leonardo Posada, Erika Cifuentes, Dayanna Calderón y Angela Cantillo, por brindarme su ayuda y consejos durante el desarrollo de mi proyecto.

A la Universidad Industrial de Santander, especialmente a la escuela de Biología y a todos quienes la conforman por aportar en mi formación profesional como Bióloga.

A mi familia, Mi padre Juan Carlos por siempre enseñarme el valor de la perseverancia, responsabilidad y disciplina; Mi madre Rossemmary por enseñarme a ser una persona de principios y valores; Mis hermanos Juan Felipe y María Juliana por ser el motivo de inspiración para cada día llegar más lejos; y a mi sobrina Lucianita por convertirse en un motivo más de felicidad en mi vida.

A Tito Sandoval, por ser mi novio, amigo, consejero y guía en el camino de la vida y de la ciencia. Por darme siempre el amor y las palabras indicadas.

A Dios por ponerme en el camino de la Biología y hacer cumplir mis sueños de niña: Ser científica.

Tabla de Contenido

	Pag.
Introduction	1
1 Objetivos	5
1.1 General	5
1.2 Específicos	5
2 Marco Teórico	6
2.1 Líquenes	6
2.1.1 Talos crustáceos.	7
2.1.2 Talos foliosos.	7
2.1.3 Talos fruticosos.	7
2.2 Bacterias asociadas a líquenes y su importancia	8
2.3 Actinobacterias y antibióticos.	10
2.4 Ambientes extremos: Páramos	11
2.5 Análisis de diversidad: Microbiota	13
3 Metodología	15
3.1 Toma de muestras	15
3.2 Identificación morfológica de líquenes	15
3.3 Construcción de librería del gen 16S rRNA y secuenciación	16
3.4 Análisis de diversidad	17
3.5 Aislamiento de bacterias	18
3.6 Identificación de actinobacterias aisladas	19
3.7 Evaluación del potencial antimicrobiano de metabolitos producidos por actinobacterias aisladas	20

4 Resultados	21
4.1 Muestreo e identificación de las muestras	21
4.2 Análisis de secuencias de 16S ARNr: Estructura y diversidad de comunidades bacterianas	22
4.3 Aislamiento de microorganismos e identificación de actinobacterias	28
4.4 Evaluación del potencial antimicrobiano de metabolitos producidos por actinobacterias aisladas	30
5 Discusión	31
6 Conclusiones	35
Referencias	36
Apéndices	55

Índice de figuras

Figura 1	Mapa Parque Nacional Natural Chingaza.	16
Figura 2	Zonas de muestreo dentro del PNN Chingaza.	21
Figura 3	Líquenes recolectados	21
Figura 4	Índices de diversidad: Shannon y Simpson	23
Figura 5	Abundancia relativa de bacterias asociadas a líquenes	24
Figura 6	Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) de las comunidades de Bacteria	25
Figura 7	Heatmap de abundancia y similaridad entre muestras	26
Figura 8	Árbol de Neighbor-Joining	27
Figura 9	Cepas de Actinobacteria aisladas a partir de líquenes.	28
Figura 10	Cepas de Actinobacteria con actividad antimicrobiana	30

Índice de tablas

Tabla 1 - Líquenes recolectados.	22
Tabla 2 - Aislamientos realizados a partir de líquenes.	29

Lista de Apéndices

Apéndice A- Figuras	55
Apéndice B- Tablas	58

Resumen

TÍTULO: ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD Y EL POTENCIAL BIOACTIVO DE BACTERIAS ASOCIADAS A LÍQUENES DE PÁRAMO EN EL PARQUE NACIONAL NATURAL CHINGAZA.

AUTOR: MARÍA ALEJANDRA SIERRA GARCÍA ^{1 2}

PALABRAS CLAVE: PÁRAMO, LIQUENES, ACTINOBACTERIA, DIVERSIDAD, COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS, PARQUE NACIONAL NATURAL CHINGAZA.

Descripción:

En este trabajo se estudió por primera vez en Colombia, la diversidad y estructura de comunidades de bacterias asociadas a líquenes en ecosistema de Páramo en el Parque Nacional Natural Chingaza. Este análisis se realizó mediante secuenciación masiva del gen 16S ARNr en Illumina MiSeq. Se observó una gran diversidad de bacterias de phyla como Proteobacteria, Acidobacteria, Verrucomicrobia, Bacteroidetes y Actinobacteria. Se estudiaron diferentes géneros de líquenes como *Cora*, *Hypotrachyna*, *Cladonia*, *Usnea*, *Sticta*, *Yoshimuriella*, *Peltigera*, entre otros. En algunos líquenes como *Cora*, *Cladonia*, *Sticta* y *Usnea* las comunidades de bacteria fueron más similares entre géneros de líquenes, indicando una posible especificidad con el género de su hospedero.

Adicionalmente hemos explorado los líquenes como una nueva fuente para el descubrimiento de bacterias de potencial biotecnológico por la producción de compuestos antimicrobianos, especialmente del phylum Actinobacteria, donde se aislaron organismos con actividad antimicrobiana contra patógenos de importancia médica por su multiresistencia a antibióticos como lo son *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Los resultados anteriores coinciden con estudios previos sobre comunidades de bacterias asociadas a líquenes en diferentes ambientes, y además reafirma el potencial biotecnológico de bacterias como Actinobacterias.

Este trabajo es el punto de partida para futuros estudios de diversidad microbológica y bioprospección en Colombia, especialmente en ambientes poco estudiados como los Páramos.

¹Tesis de Pregrado. Realizada en la Corporación CorpoGen

²Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Directora: PhD, María Mercedes Zambrano Eder

Abstract

TITLE: DIVERSITY ANALYSIS AND BIOACTIVE POTENTIAL OF BACTERIA ASSOCIATED WITH LICHENS FROM PARAMO IN THE NATIONAL NATURAL PARK CHINGAZA.

AUTHOR: María Alejandra Sierra García ^{1 2}

KEYWORDS: PARAMO ECOSYSTEM, LICHEN, ACTINOBACTERIA, DIVERSITY, ANTIMICROBIAL COMPOUNDS, NATURAL NATIONAL PARK CHINGAZA.

DESCRIPTION:

In this work we studied for the first time in Colombia, the diversity and structure of Bacteria associated with lichens from Paramo Ecosystem in the National Natural Park Chingaza. This analysis was performed through Next-generation sequencing of 16S rRNA gene with Illumina MiSeq. It was possible to observe a great diversity of bacteria from Proteobacteria, Acidobacteria, Verrucomicrobia, Bacteroidetes and Actinobacteria phyla. We studied different lichen genera such as *Cora*, *Hypotrachyna*, *Cladonia*, *Usnea*, *Sticta*, *Yoshimuriella*, *Peltigera*. In some lichens like *Cora*, *Cladonia*, *Sticta* and *Usnea* the bacteria communities were more similar between the same lichen genera, indicating a possible bacterial-specificity with the host genus.

Additionally we explored the lichens as a novel source for the discovery of bacteria with biotechnological potential for the production of antimicrobial compounds, especially from the phylum Actinobacteria. We isolated organisms from this phylum and found some bioactive strains against pathogens like *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. These results are consistent with previous studies on bacterial communities associated with lichens in different environments, and also, it reaffirms the biotechnological potential of relevant bacteria such as Actinobacteria.

This work represents the starting point for future studies of microbiological diversity and bioprospection in Colombia, especially in understudied environments like Paramos.

¹Undergraduate Thesis. Made at CorpoGen Corporation

²Science Faculty. School of Biology. Director: PhD, María Mercedes Zambrano Eder

Introducción

Colombia es uno de los países con mayor diversidad biológica por contener en su territorio más del 10 % de la biota total del planeta en una extensión continental de 1'141.748 km², que representa el 0.7 % de la superficie continental mundial (Arbeláez-cortés, 2015; IUCN, 2017; Romero & Montenegro, 2008). La biodiversidad se ha constituido en una fuente de desarrollo para la nación, dados sus potenciales aplicaciones en campos como la salud, la agricultura y la biotecnología (Camacho, 2014; Rangel-Ch, 2006). Pese a los esfuerzos que ha realizado Colombia por conocer su biodiversidad, aún existe un déficit de conocimiento (Calderón-Patrón et al., 2012). La falta de información es aún más notoria al tratarse de diversidad microbológica en ambientes naturales, a pesar de la vital importancia de los microorganismos en el mantenimiento de los ecosistemas, en la regulación de los ciclos biogeoquímicos y el ciclaje de nutrientes, en transformación y descomposición de materia orgánica y en la regulación del cambio climático (Madsen, 2005; Wolters et al., 2000; Arbeláez-Cortés, 2013). Dada la importancia de los microorganismos en los ecosistemas, la recuperación y estudio de comunidades microbianas en ambientes poco estudiados pueden brindar información nueva e importante sobre su componente funcional, su potencial biotecnológico y su papel en los ecosistemas.

Recientemente, la Organización Mundial de la Salud difundió un informe sobre el aumento de la resistencia antimicrobiana y emitió una alerta sobre la necesidad de encontrar nuevos fármacos para combatir este inminente problema de salud pública (Woolhouse & Farrar, 2014). Con el redescubrimiento de compuestos bioactivos ya conocidos,

la continua búsqueda de microorganismos con potencial antibiótico a partir de nuevas fuentes, representa una estrategia eficaz hacia el descubrimiento de nuevos fármacos. La identificación de nuevos nichos ecológicos como sedimentos marinos, plantas y simbiosis con otros organismos, ha proporcionando acceso a nuevas bacterias y nuevas moléculas bioactivas (Bull & Stach, 2007; Kim et al., 2014; Li et al., 2014).

En este contexto, las simbiosis microbianas con organismos sésiles son de particular interés, ya que cada vez hay más evidencia de que las moléculas microbianas como los antibióticos, podrían ser moléculas de señalización y estar involucradas en la comunicación entre microbio-microbio y microbio-hospedero (Parrot et al., 2015; Yim & Wang, 2007; Yoon & Nodwell, 2014).

Los líquenes son organismos sésiles producto de una simbiosis bien identificada y autosuficiente entre un hongo y un alga o una cianobacteria, formando una estructura simbiote única llamada talo (De Bary, 1879; Honegger, 1991; Lutzoni et al., 2001). El talo del liquen, o cuerpo vegetativo, está adaptado a una amplia variedad de ecosistemas que a menudo, incluyen condiciones ambientales extremas (Brodo, 1973; Shukla et al., 2010). Estudios recientes han demostrado que los líquenes brindan un nicho ecológico inusual y de larga duración a diversas comunidades de bacterias (Parrot et al., 2015; Yamamura et al., 2017; Cardinale et al., 2011; Grube et al., 2009), incluyendo a microorganismos productores de moléculas potencialmente bioactivas como las actinobacterias (Aschenbrenner et al., 2016; Liba et al., 2006). La diversidad de actinobacterias asociadas a líquenes ha llamado particularmente la atención ya que estas bacterias son conocidas

por contener gran variedad de compuestos antibióticos (Parrot et al., 2015; Davies & Davies, 2010; González et al., 2005).

En los ambientes de Páramo, los líquenes juegan un papel muy importante en la formación de suelo, fijación de minerales y retención de agua (Syers & Iskandar, 1973; Pike, 1978; Rangel, 2005; Vargas & Pedraza, 2004). Estos ecosistemas han sido reportados como los "hot-spots" de biodiversidad con la tasa más rápida de diversificación (Madriñán et al., 2013; Myers et al., 2000). Se encuentran en el norte de los Andes tropicales y son considerados como ambientes extremos por poseer condiciones determinadas por la altitud y latitud (Castaño, 2002; Vargas & Pedraza, 2004). Estas condiciones imponen una presión selectiva para el desarrollo de microorganismos con mecanismos de adaptación inusuales (Madriñán et al., 2013; Miles et al., 2012; Ruiz-Pérez et al., 2016). La noción que las bacterias ante estos ambientes extremos son capaces de sobrevivir en condiciones y entornos poco convencionales, ha llevado a suponer que también las propiedades de sus compuestos bioactivos se han optimizado para estas condiciones (Picard & Daniel, 2013; Van den Burg, 2003); Colombia cuenta con 36 de estos ecosistemas, lo que lo cataloga como el país con mayor número de páramos en el mundo (Ramírez, 2011; Hofstede et al., 2003).

Dentro de este sistema de páramos, se encuentra el Parque Nacional Natural Chingaza (PNN Chingaza), el cual forma parte de las reservas más importantes de la Provincia Andina (Hernández-Camacho, 1992). El PNN Chingaza es un lugar único y estratégico no sólo para la conservación de la flora y fauna de los páramos y bosques circundantes

a la Sabana de Bogotá y de la cordillera Oriental, sino fundamentalmente para el sostenimiento del recurso hídrico actual y futuro de la capital Colombiana (Van der Hammen & Otero-García, 2007). Además, su cercanía a Bogotá lo convierte en uno de los sitios más importantes de investigación y conservación (Vargas & Pedraza, 2004).

Por lo tanto, el estudio de las comunidades bacterianas en nichos ecológicos inusuales como líquenes, y ambientes extremos y poco estudiados como los páramos, puede dilucidar una diversidad única de microorganismos. De especial interés, es el estudio y recuperación de las actinobacterias por su potencial bioactivo antimicrobiano.

1. Objetivos

1.1. General

Estudiar la diversidad y estructura de comunidades microbianas y el potencial bioactivo de bacterias asociadas a líquenes de Páramo en el Parque Nacional Natural Chingaza.

1.2. Específicos

- ▶ Estimar la riqueza y estructura de las comunidades bacterianas asociadas a líquenes del Páramo de Chingaza mediante secuenciación del gen ribosomal 16S rRNA.
- ▶ Aislar microorganismos del phylum Actinobacteria a partir de líquenes del Páramo de Chingaza.
- ▶ Evaluar el potencial antimicrobiano de metabolitos producidos por actinobacterias recuperadas a partir de líquenes del Páramo de Chingaza.

2. Marco Teórico

2.1. Líquenes

Los líquenes son conocidos como una simbiosis autosuficiente y mutualista entre un hongo (micobionte) y una o varias cianobacterias y/o algas verdes (fotobiontes) (Ahmadjian, 1993). El micobionte proporciona un hábitat adecuado para el fotobionte y a su vez proporciona carbón fijado fotosintéticamente como fuente de energía para el sistema (De Bary, 1879). El resultado de esta asociación es una estructura simbiótica única, denominada talo (Honegger, 1991; Lutzoni et al., 2001). El talo del líquen está bien adaptado a una amplia variedad de ecosistemas, que a menudo, incluyen condiciones ambientales extremas, como desecación periódica, altos niveles de radiación ultravioleta (UV), temperaturas extremas y crecimiento en sustratos extremadamente pobres (Suzuki et al., 2015).

En el mundo existen cerca de 18.500 especies de líquenes descritas (Feurerer & Hawksworth, 2007; Boustie & Grube, 2005), siendo Colombia uno de los países con mayor riqueza, teniendo documentadas 1.674 especies (González & Gradstein, 2016; Ceron & Quintero, 2009). Los líquenes se pueden encontrar en climas cálidos ó fríos (desde el nivel del mar hasta aproximadamente 4.700 m.s.n.m) y desde los ambientes más secos como la Guajira, hasta los más húmedos como los bosques andinos o los pantanos de los páramos (Merchán, 2009).

Los líquenes exhiben una amplia variedad morfológica que depende de su hábito

de crecimiento y a la unión que se establece entre los simbioses (de Valencia, 2002; Ahmadjian, 1993; Barreno & Rico, 1984). Estos pueden ser:

2.1.1. Talos crustáceos. Se caracteriza por presentar una unión íntima con el sustrato. Carecen de córtex inferior y no se pueden separar de él sin destruirlos; se adhieren al sustrato por medio de la médula o hipotalo. Este tipo de líquen es muy común en las rocas de ambientes con condiciones extremas, pero también es posible encontrarlo sobre suelos o madera. Ejemplos de talos crustáceos se encuentran en géneros como *Lepraria*, *Lecidea*, *Bacidia*, entre otros.

2.1.2. Talos foliosos. Tienen forma laminar con una estructura más compleja. Forman lóbulos aplanados con simetría dorsiventral y márgenes enteros, crenados u ondulados. Están parcialmente adheridos al sustrato, por lo que se pueden separar fácilmente de él. Ejemplo de talos foliosos se encuentran en géneros como *Parmotrema*, *Xanthoria*, *Peltigera*, *Sticta*, entre otros.

2.1.3. Talos fruticosos. Talos ramificados con forma de pequeños arbustos, con simetría radial o dorsiventral; algunos son péndulos, erectos o extendidos. Se sujetan al sustrato por una mínima superficie. En algunos casos el talo tiene una superficie basal crustácea y una parte vertical fruticulosa, que se denominan podocios (ramificados) o escifos (en forma de trompeta). Dependen de la humedad relativa del aire para su hidratación, por eso pueden ser más abundantes donde las nieblas son frecuentes. Ejemplo de talos foliosos se encuentran en géneros como *Cladonia*, *Usnea*, *Stereocaulon*, entre otros.

2.2. Bacterias asociadas a líquenes y su importancia

La visión clásica del líquen como una simbiosis dual entre un hongo y un alga y/o cyanobacteria empezó a verse controvertida a principios del siglo XX, donde caracterizaciones fenotípicas demostraron la presencia de géneros bacterianos asociados al talo. Entre éstos géneros se encontraron *Azotobacter*, *Pseudomona*, *Beijerinckia* y algunos géneros del phylum Firmicutes (Uphof, 1925; Iskina, 1938; Panosyan & Nikogosyan, 1966). Varias décadas después, mediante métodos de cultivo, se pudo identificar la presencia de phyla comunes en diferentes líquenes, como Firmicutes, Actinobacteria, y Proteobacteria (Cardinale et al., 2006; Genilloud et al., 2011; Selbmann et al., 2010). No obstante, los métodos cultivo-dependientes representan una mínima parte de la diversidad de microorganismos en la naturaleza (Amann et al., 1995).

Con el avance de nuevas técnicas cultivo-independientes y herramientas bioinformáticas, se ha dilucidado la gran abundancia y diversidad de comunidades de bacterias asociadas a los líquenes (Grube & Berg, 2009; Bjelland et al., 2011). Además, se ha podido analizar los posibles roles metabólicos dentro del talo (Grube et al., 2015; Liu et al., 2017), y brindar claves sobre la evolución de esta simbiosis (Hodkinson et al., 2012).

Se ha planteado el rol de estas bacterias dentro del líquen como una compleja red simbiótica con múltiples funciones: suministro nutricional, específicamente de nitrógeno, azufre y fósforo (Cardinale et al., 2006; Liba et al., 2006; Grube & Berg, 2009; Seneviratne & Indrasena, 2006); la producción de hormonas, actividad lítica (Liu et al., 2017)

y la producción de compuestos antimicrobianos, en especial del phylum Actinobacteria (Parrot et al., 2015; Suzuki et al., 2015; Davies et al., 2005; González et al., 2005).

Las actinobacterias son de gran importancia en el área de la biotecnología como productores de una gran cantidad de metabolitos secundarios bioactivos con amplias aplicaciones en la industria, medicina y agricultura (Okoro et al., 2009a; Barka et al., 2016). Estos organismos son capaces de colonizar la rizosfera a través de su característica competitiva y antagonista con otros microorganismos del suelo (Bulgarelli et al., 2013). Pueden promover el crecimiento de las plantas indirectamente mediante mecanismos de biocontrol contra patógenos de la planta, con la biosíntesis de antibióticos y otros metabolitos secundarios (Fenton et al., 1992), o directamente abasteciendo la planta con componentes útiles para su crecimiento, facilitando la absorción de nutrientes del suelo, fijando nitrógeno, sintetizando sideróforos y fitohormonas, y solubilizando minerales del suelo (Glick, 1995).

De igual manera, se ha demostrado que las actinobacterias son colonizadores comunes en macroalgas y pueden influenciar su crecimiento mediante la secreción de compuestos bioactivos (Braña et al., 2015). Se ha demostrado que comunidades bacterianas asociadas a organismos como corales, esponjas, algas y plantas son influenciadas no sólo por factores ambientales fisicoquímicos sino también por sus interacciones ecológicas con su hospedero (Singh et al., 2011; Armstrong et al., 2001; Olson & Kellogg, 2010).

2.3. Actinobacterias y antibióticos.

Las actinobacterias producen aproximadamente 40 % de los antibióticos y el 38 % de los metabolitos microbianos bioactivos actuales (Bérdy, 2012). Representan una de las unidades taxonómicas más grandes dentro del dominio Bacteria, incluyendo cinco subclases, seis órdenes y catorce subórdenes (Barka et al., 2016). Son bacterias Gram-positivas cuyos genomas tienen un alto contenido Guanina y Citosina (G+C) y exhiben una gran diversidad en términos morfológicos, fisiológicos y capacidades metabólicas, lo que les permite establecerse en diversos ambientes (Genilloud, 2005; Macagnan et al., 2006; Okoro et al., 2009b).

Los primeros antibióticos descubiertos en Actinobacteria fueron la actinomicina de un cultivo de *Streptomyces antibioticus* en 1940 (Waksman & Woodruff, 1940), la estreptotricina de *Streptomyces lavendulae* en 1942 (Waksman & Woodruff, 1942) y estreptomicina de *Streptomyces griseus* en 1944 (Schatz & Waksman, 1944). El género *Streptomyces* ha sido la mayor fuente de antibióticos de uso clínico y es responsable por cerca del 80 % de todos los antibióticos de origen actinobacterial (Ilic et al., 2007). Consecuentemente, este género es de gran importancia en la lucha contra patógenos resistentes a antibióticos (Bennett, 1998; Hopwood et al., 1994).

Aunque el número de nuevas cepas de Actinobacteria empezó a disminuir en 1990 (Bérdy, 2012), el aumento de la investigación de microorganismos ambientales en ecosistemas inusuales y poco estudiados sugiere que existen actinobacterias aún por descubrir,

y por ende, nuevas moléculas bioactivas (Parrot et al., 2015). Tal es el caso de *Davies et. al.*, quienes descubrieron un nuevo compuesto antibiótico de origen bacteriano, denominado Uncialamicina, efectivo incluso a muy bajas concentraciones a partir del liquen *Cladonia uncialis* (Davies et al., 2005). Del mismo modo, *Afredo et al.* hallaron dos especies de *Streptomyces* capaces de producir compuestos antibióticos, antitumorales y anti-inflamatorios en macroalgas y corales del mar Cantábrico (Braña et al., 2015). Así mismo, los resultados de *Okoro et al.* demuestran que los ambientes extremos como el desierto de Atacama en Chile, constituye un largo e inexplorado reservorio de nuevas bacterias con potencial biotecnológico (Okoro et al., 2009b). Por lo tanto, la diversidad y el potencial bioactivo de las comunidades bacterianas asociadas a líquenes en ambientes poco explorados son claves para el descubrimiento de nuevos microorganismos que puedan llevar al hallazgo de nuevas moléculas antimicrobianas, especialmente en un país megadiverso y con ambientes únicos como Colombia.

2.4. Ambientes extremos: Páramos

Los ambientes de alta montaña andina, más conocidos como Páramos, han sido reportados como "hot-spots" de biodiversidad (Madriñán et al., 2013; Myers et al., 2000). En Colombia este ecosistema abarca cerca de 30.000 km^2 , siendo el país con mayor área de páramos en el mundo (50 % de ecosistemas paramunos) (Ramírez, 2011). Estos son considerados como ambientes extremos por poseer condiciones determinadas por la altitud y latitud (Castaño, 2002), como lo son la baja disponibilidad de oxígeno en el aire (debido a la baja presión atmosférica); cambios abruptos de temperatura (condiciones de

frío intenso durante la noche y un aumento de temperatura de hasta 10°C durante el día); alta acidez en los suelos, a tal punto de impedir la eficaz absorción radicular de las plantas; la desmineralización de los suelos debido a la acidez; lenta descomposición de la biomasa muerta; los fuertes vientos con bajas temperaturas ocasionando quemaduras a las plantas, y la alta radiación ultravioleta, pues su impacto sobre las cumbres de montaña es mucho más intenso sobre la franja tropical (Buytaert et al., 2006).

El Parque Nacional Natural Chingaza (PNN Chingaza) se localiza en la cordillera Oriental al nororiente de la capital de Colombia, cuenta con un área actual de 76.600 hectáreas, y está compuesto por ecosistemas de Páramo y Bosque Alto Andino. La importancia del Páramo de Chingaza deriva de sus características bióticas, abióticas y ecológicas únicas (Vargas & Pedraza, 2004). La heterogeneidad ambiental (climática, geológica, biótica), ha producido una gran variabilidad en los tipos de suelos. A su vez, estos suelos presentan grandes sectores de herencia glacial, lo que le confiere la característica de suelos negros de baja mineralización. El Páramo de Chingaza presenta una alta diversidad climática con sectores semi-húmedos, húmedos y muy húmedos y presenta un régimen de precipitación a lo largo de todo el año. La riqueza biológica de la alta montaña del PNN Chingaza es grande, en donde se destacan 19 familias, 33 géneros y 100 especies de líquenes (Schmidt-Mumm & Vargas Ríos, 2012), siendo las familias Parmeliaceae y Cladoniaceae las más representativas con 27 y 20 especies respectivamente. Por lo anterior, los líquenes del Páramo de Chingaza representan un nicho ecológico llamativo para el estudio de comunidades bacterianas en vista de las condiciones bióticas y abióticas de este ecosistema único en el mundo.

2.5. Análisis de diversidad: Microbiota

La secuenciación de la subunidad del gen 16S ARNr en Bacteria y Archaea, y 18S ARNr en Eukarya, es aplicada ampliamente como un método para estudiar la composición, organización y patrones espacio-temporales de las comunidades microbianas debido a su ubicuidad a lo largo de todos los dominios en la naturaleza (Olsen et al., 1986). Adicionalmente, el gen 16S ARNr provee información filogenética valiosa que puede ser comparada con otros organismos en las bases de datos (Curtis et al., 2006).

El gen 16S ARNr de las bacterias contienen nueve regiones hipervariables separadas por regiones conservadas (Neefs et al., 1993), lo que permite diseñar primers para amplificar y secuenciar regiones específicas según la información taxonómica que se desee (Caporaso et al., 2012; Claesson et al., 2010). En este contexto, la región hipervariable V3-V4 ha sido catalogada como la región que recupera secuencias de la mayoría de los taxones de Bacteria y Archaea (Eloe-Fadrosh et al., 2016; Thompson et al., 2017; Caporaso et al., 2011). Por lo que fue estandarizada dentro de los protocolos de análisis de diversidad del proyecto Earth Microbiome Project donde se busca caracterizar la vida microbiana del planeta (<http://www.earthmicrobiome.org>).

Dentro de las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento (HTS por sus siglas en inglés), Illumina es actualmente la más innovadora para secuenciar amplicones del gen 16s ARNr (Sinclair et al., 2015; Claesson et al., 2010). Esta tecnología es útil especialmente cuando se trabaja con muestras ambientales complejas de procesar y analizar, en donde

existe una gran diversidad de microorganismos, y además, taxa denominadas *raras* por su baja abundancia relativa (Neufeld et al., 2008; Pedrós-Alió, 2007; Sogin et al., 2006).

Una vez secuenciados los amplicones de 16S ARNr, las secuencias se agrupan en unidades taxonómicas operativas (OTUs) basado en su similaridad. Luego los OTUs son comparados con las bases de datos para así identificar los microorganismos presentes en el microbioma (Cao et al., 2017). Una de las principales ventajas de utilizar secuencias de amplicones del gen 16S ARNr es la disponibilidad de varias herramientas bioinformáticas libres y de fácil uso, diseñadas para realizar análisis de comunidades microbianas a partir de grandes conjuntos de secuencias y el cálculo de medidas de alpha y beta diversidad. Los software utilizados comúnmente para analizar datos de muestras ambientales son QIIME (Caporaso et al., 2010), USEARCH (Edgar, 2010) y MOTHUR (Schloss et al., 2009).

3. Metodología

3.1. Toma de muestras

Se recolectaron líquenes en tres puntos de muestreo en el ala occidental del PNN Chingaza (Fig. 1), catalogados como Punto 1 (N 4.71470° W 73.82208°), Punto 2 (N 4.68166° W 73.78699°) y Punto 3 (N 4.62418° W 73.72583°). Se tomaron líquenes de diferentes tipos de sustratos: Cortícolas (madera), saxícolas (rocas) y terrícolas (tierra); además de una muestra de material cercano a cada líquen como control (sustrato y/o material vegetal). Las muestras se recolectaron con pinzas estériles y se depositaron en bolsas plásticas ziploc. Los líquenes adheridos a roca fueron recuperados con una espátula estéril y depositados en un tubo Eppendorf de 1.5mL estéril. Las muestras se transportaron a temperatura ambiente hasta el laboratorio de CorpoGen y fueron procesadas dentro de las siguientes 48 horas. Estas fueron divididas en tres: Muestras para aislamientos de bacterias, para extracción de ADN y para la identificación del líquen.

3.2. Identificación morfológica de líquenes

La identificación morfológica de los líquenes fue realizada con la asesoría de la profesora Bibiana Moncada PhD. de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas comparando las muestras con ejemplares del herbario de la universidad.

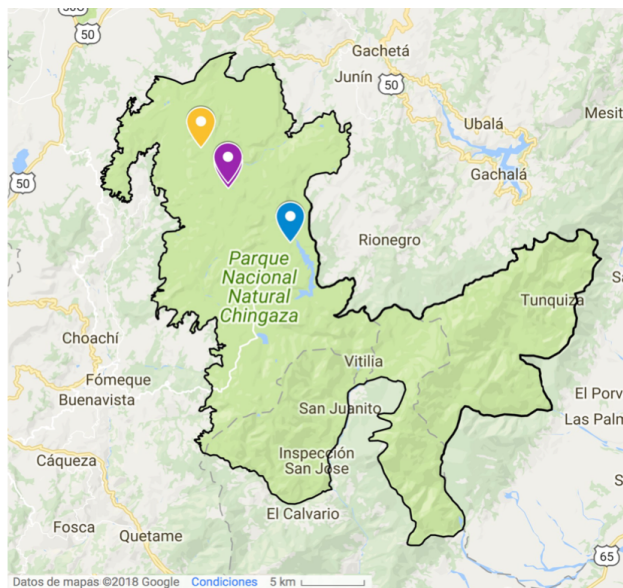


Figura 1: Mapa PNN Chingaza. Se encuentran señalados los tres puntos de muestreo: Punto 1 (Amarillo), Punto 2 (Morado) y Punto 3 (Azul).

3.3. Construcción de librería del gen 16S rRNA y secuenciación

El ADN genómico bacteriano de cada muestra de líquen y su control fue extraído usando el PowerSoil DNA Isolation Kit (Mobio Laboratories, Carlsbad, CA; USA), con algunas modificaciones: Se agregaron aproximadamente 200mg de muestra de líquen al PowerBead Tube, se realizaron dos ciclos de FastPrep-24 (Biomedicals) de 20 segundos a 4m/s y se centrifugó 30 segundos a 10.000g. De cada extracción se amplificó la región hipervariable V3-V4 del gen ARNr 16S para estimar la riqueza y la estructura de las comunidades bacterianas en los distintos líquenes y sitios de muestreo (Woese & Fox, 1977). Se usaron los primers V3F: 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3' V4R:5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3', con adaptadores para celdas de flujo de Illumina, como se describe en los protocolos del Earth Microbiome Project (Thompson et al., 2017; Gilbert et al., 2014). Los amplificados fueron secuenciados en Illumina MiSeq en Harvard Medical School, USA.

3.4. Análisis de diversidad

Una vez obtenidas las secuencias, la calidad de las lecturas se evaluó con el software FastQC (Babraham, 2011). Las secuencias se editaron con el software Trimmomatic (Bolger et al., 2014) eliminando regiones correspondientes a primers y secuencias con longitudes por fuera del rango de 200pb. Las lecturas editadas fueron luego analizadas en Mothur (v 1.30) (Kozich et al., 2013), utilizando el procedimiento operativo estándar (SOP) (https://www.mothur.org/wiki/MiSeq_SOP): Se ensamblaron las lecturas en contigs y se eliminaron las secuencias con ambigüedades y longitudes fuera del rango de 430pb, se unificaron en secuencias únicas idénticas, se alinearon con la base de datos de referencia SILVA (gen 16S rRNA) (Quast et al., 2012), y se le asignó clasificación taxonómica a cada una por el método de Wang (Wang et al., 2007) (https://www.mothur.org/wiki/Classify_seqs). Seguidamente se eliminaron posibles taxa correspondientes a Cloroplasto, Mitrocondria, Archea y Eukarya, y se cuantificó el número de OTUs presente con un porcentaje de identidad del 97 %.

Para analizar la diversidad alpha entre cada una de las muestras se estimaron los índices de diversidad Shannon y Simpson, tomando en cuenta riqueza y abundancia (Ruiz-Pérez et al., 2016) con el paquete Phyloseq en Rstudio (McMurdie & Holmes, 2013). Para analizar la diversidad beta y comparar entre géneros de líquenes y punto de muestreo, se generó un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) en Mothur y se graficó con Phyloseq en Rstudio. También se graficó un mapa de calor (Heatmap) para analizar la abundancia relativa de los OTUs y la similaridad entre las muestras de

líquenes. Finalmente, se construyó un árbol mediante el método de Neighbor-Joining (Lozupone et al., 2011) en Mothur y se editó con el software FigTree (v1.3.1) (Rambaut, 2009).

3.5. Aislamiento de bacterias

Para el aislamiento de microorganismos se siguieron protocolos ya reportados (González et al., 2005), con algunas modificaciones: Cada talo de liquen se lavó brevemente con agua destilada estéril para remover trazos de sedimentos y microorganismos no adheridos. Después, en tubos Falcon de 50mL se agregó agua destilada hasta cubrir la muestra y perlas de vidrio de 4mm (MARIENFELD). Se homogenizó la muestra en vortex hasta garantizar que el liquen estuviese completamente fragmentado; este tiempo se optimizó para cada muestra individualmente.

Se realizaron diluciones seriadas del homogeneizado hasta 10^{-3} en agua destilada (González et al., 2005). Se tomaron $100\mu\text{L}$ de cada dilución y se sembraron en diferentes medios de cultivo que favorecen el crecimiento de actinobacterias. Actinomycete Isolation Agar (AIA), International *Streptomyces* Project medium-2 (ISP2), complementados con Nistatina (150mg/L) y ácido nalidíxico (50mg/L) para inhibir el crecimiento de hongos y bacterias Gram-negativas respectivamente; Gause Agar (G) y Gause Oligotrófico (GO) (Wang et al., 2014), complementados con Dicromato de potasio (80mg/L) para inhibir el crecimiento de bacterias y hongos. Se homogenizó la siembra en el medio con perlas de vidrio estériles de 4mm.

Las muestras se incubaron a temperatura ambiente hasta obtener colonias visibles. Las colonias se repicaron en el mismo tipo de medio sólido hasta obtener cultivos puros.

Los cultivos se monitorearon durante 30 días hasta no observar nuevas colonias. Una vez los aislamientos se encontraron puros, se preservaron a -80°C en el medio de cultivo donde fueron aislados con 30 % v/v de glicerol (Tebben et al., 2011).

3.6. Identificación de actinobacterias aisladas

Se realizaron extracciones de ADN de cada uno de los aislamientos mediante el protocolo de fenol-cloroformo con algunas modificaciones (Wilson, 2001): Se realizó una lisis mecánica con perlas de vidrio de 0.4mm en tubos de 2mL, agregando 500 μL de Buffer Tris-HCl pH 8.0, 34 μL de SDS 0.8 % y se llevó a cabo un ciclo de disrupción en FastPrep-24 (Biomedicals) por 20 segundos a 4m/s. Luego se agregó 200 μL de NaCl (2.8M) y se realizó un segundo ciclo de disrupción.

Seguidamente se realizó una amplificación con los primers T7-pA 5'-TAATACGACTCACTATAGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y 16Sac1114r 5'-GAGTTGACCCCGGCRG T-3' específicos para Actinobacteria (Wang & Ren, 2017), con el fin de descartar los aislamientos no correspondientes a este phylum. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador BioRad C1000, usando una reacción de 25 μL que contenía 12.5 μL Mezcla PCR 100 2X (CorpoGen), 0.5 μL de cada primer (25 μM), 9.5 μL de agua destilada, y 1 μL de muestra. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: Desnaturalización a 94°C por 3 minutos; 30 ciclos a 94°C por 45 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por

90 segundos; y una elongación final de 7 minutos a 72°C. Las amplificaciones positivas fueron catalogadas como actinobacterias y se seleccionaron para realizar las pruebas de actividad antimicrobiana. El ADN extraído fue preservado a -80°C para una futura identificación molecular mediante secuenciación.

3.7. Evaluación del potencial antimicrobiano de metabolitos producidos por actinobacterias aisladas

Cada Actinobacteria se sembró en medio Mueller-Hinton Agar (Martin & Lewis, Martin & Lewis; Oskay et al., 2004; Selvin et al., 2009) y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta no observar mayor crecimiento (aproximadamente 10 días). Las pruebas de antagonismo se realizaron usando doble capa de agar (Hockett & Baltrus, 2017), contra siete patógenos: cinco bacterias Gram-negativas *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, una bacteria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* y una levadura *Candida albicans*. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 24 horas. Las actinobacterias que presentaron un halo de inhibición se consideraron como productoras de compuestos antimicrobianos.

4. Resultados

4.1. Muestreo e identificación de las muestras

Se recolectaron 33 muestras de líquenes de tres puntos de muestreo principales (Fig. 2).

Estos tres puntos de muestreo se dividieron a su vez en 14 subpuntos (Tabla 1).



Figura 2: Zonas de muestreo dentro del PNN Chingaza Se observan los tres puntos de muestreo principales: (A) Punto 1, (B) Punto 2 y (C) Punto 3.

Se pudieron identificar morfológicamente 14 géneros y en algunos se logró llegar a nivel de especie. De estos, en 8 géneros se logró recolectar al menos una réplica, los cuales corresponden a *Hypotrachyna*, *Usnea*, *Cora*, *Peltigera*, *Sticta*, *Cladonia*, *Yoshimuriella* y *Stereocaulon* (Fig. 3). Para los 6 géneros restantes no se lograron recolectar réplicas.



Figura 3: Líquenes recolectados: (A) *Hypotrachyna*, (B) *Peltigera*, (C) *Sticta*, (D) *Usnea*, (E) *Cora*, (F) *Yoshimuriella*, (G) *Stereocaulon*, (H) *Cladonia*.

Puntos muestreo	Código de muestreo	Género	Especie	Sustrato	Código de trabajo
Punto 1	A1	<i>Stereocaulon</i>	<i>tomentosum</i>	SAX	L_Stc_A
	A2	<i>Lepraria</i>	N.N	SAX	L_Lpr_A
	A3	<i>Cora</i>	<i>bysoidea</i>	SAX	L_Co_A
	A4	<i>Cladonia</i>	<i>squamusa</i>	SAX	L_Cla_A
	A5	<i>Sticta</i>	<i>andina</i>	COR	L_Stt_A
Punto 2	B1	<i>Hypotrachyna</i>	<i>imbricatula</i>	COR	L_Hy_B
	B2	<i>Sticta</i>	<i>andina</i>	COR	L_Stt_B
	C1	<i>Yoshimuriella</i>	<i>subdisecta</i>	COR	L_Ysh_C
	C2	<i>Sticta</i>	<i>pseudolobaria</i>	COR	L_Stt_C
	C3	<i>Peltigera</i>	N.N	COR	L_Ptg_C
	D1	<i>Yoshimuriella</i>	<i>subdisecta</i>	COR	L_Ysh_D
	E1	<i>Usnea</i>	<i>papillata</i>	COR	L_Us_E
	E2	<i>Sticta</i>	<i>pseudolobaria</i>	COR	L_Stt_E
	F1	<i>Sticta</i>	<i>pseudolobaria</i>	COR	L_Stt_F
	G1	<i>Lobariella</i>	N.N	COR	L_Lb_G
G2	<i>Everniastrum</i>	<i>vexans</i>	COR	L_Ev_G	
G3	<i>Usnea</i>	<i>columbiana</i>	COR	L_Us_G	
G4	<i>Parmotrema</i>	<i>sorediferum</i>	COR	L_Prm_G	
Punto 3	H1	<i>Cora</i>	N.N	COR	L_Co_H.1
	H2	<i>Cora</i>	<i>bysoidea</i>	COR	L_Co_H.2
	H3	<i>Hypotrachyna</i>	N.N	TER	L_Hy_H
	I1	<i>Cora</i>	N.N	TER	L_Co_I
	J1	<i>Dibaeis</i>	<i>columbiana</i>	SAX	L_Di_J
	J2	<i>Stereocaulon</i>	<i>tomentosum</i>	SAX	L_Stc_J
	K1	<i>Cladonia</i>	N.N	TER	L_Cla_K.1
	K2	<i>Usnea</i>	<i>crenulata</i>	COR	L_Us_K
	K3	<i>Cladonia</i>	<i>andesita</i>	TER	L_Cla_K.2
	L1	<i>Cladonia</i>	<i>coccifera</i>	TER	L_Cla_L
L2	<i>Cora</i>	N.N	TER	L_Co_L	
L3	<i>Stereocaulon</i>	<i>pomiferum</i>	TER	L_Stc_L	
M1	<i>Hypotrachyna</i>	<i>elongata</i>	SAX	L_Hy_M	
N3	<i>Hypotrachyna</i>	<i>subsaxatilis</i>	SAX	L_Hy_N	
N4	<i>Peltigera</i>	<i>rufescens</i>	SAX	L_Ptg_N	

Tabla 1: **Líquenes recolectados.** Código de muestreo representa los subpuntos de colecta. Especímenes que no se pudieron identificar se representan con N.N. Los sustratos donde se colectaron las muestras se representan con las iniciales SAX: Saxícola (Colectado en roca), COR: Cortícola (Colectado en madera) y TER: Terrícola (Colectado en tierra). El código de trabajo se utilizó para los análisis de diversidad.

Las muestras N1 y N2 fueron identificadas por la Dra. Moncada como un alga perteneciente al género *Trentepohlia*, por lo que no se tuvieron en cuenta en el análisis.

4.2. Análisis de secuencias de 16S ARNr: Estructura y diversidad de comunidades bacterianas

Una vez construída la librería de la región V3-V4 del gen ribosomal 16S (Ver anexos Fig A.5), la composición de comunidades microbianas asociadas a líquenes, fue analizada usando 64 muestras de ADN aisladas de 14 subpuntos de muestreo: 33 muestras de líquenes y 31 controles. De los líquenes A2 y G4 no se pudo recolectar control por su morfología crustácea y lugar de crecimiento.

Fueron obtenidas entre 10 y 11 millones de secuencias. Después de ser procesadas en Mothur, se llegó a un total de 3'502.163 de secuencias de alta calidad, aproximadamente 54.000 secuencias por muestra. Se asignaron OTUs con el 97% de similaridad y se obtuvieron 40.235 unidades taxonómicas. Se graficaron curvas de rarefacción con el total de secuencias obtenidas y el número de OTUs (Anexos: Fig A.1), y se evidenció que en la mayoría de las muestras no se alcanzó la saturación de diversidad, sin embargo se observó un alto número de OTUs y de secuencias por muestra, lo que nos evidencia la gran riqueza de las muestras colectadas (Anexos: Tabla1).

En la Alpha-Diversidad, los índices de Shannon y Simpson mostraron una mayor heterogeneidad de diversidad en los líquenes que en los controles, y que no existe una aparente relación con el sustrato de donde fueron muestreados (Fig. 4).

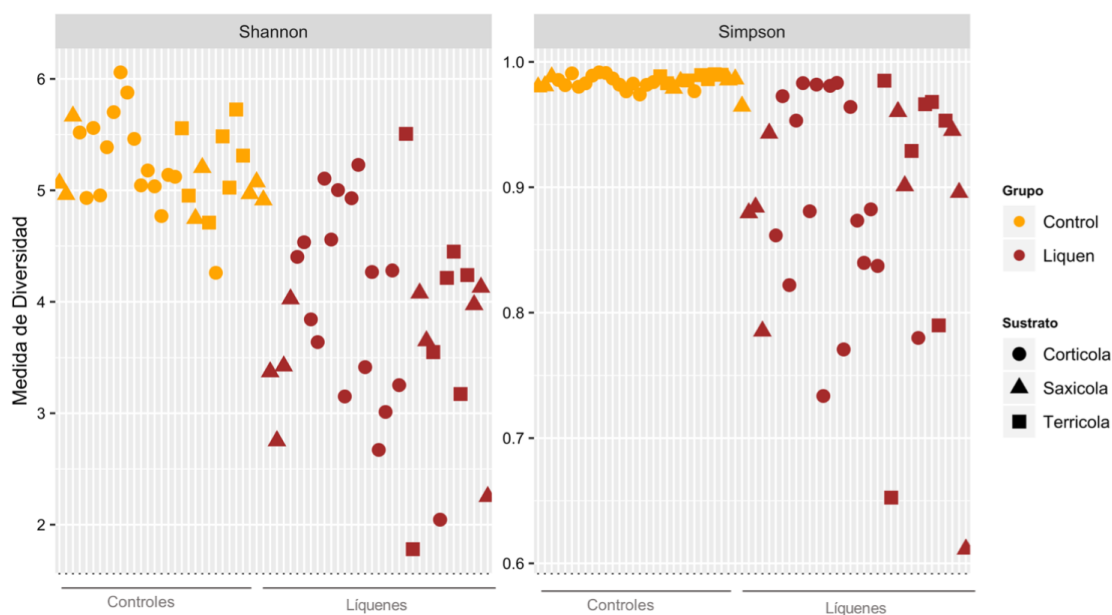


Figura 4: Índices de diversidad: Shannon y Simpson. Se observan los controles en amarillo y los líquenes en rojo. Las diferentes formas representan el sustrato de donde fueron muestreados.

El análisis de las secuencias del gen 16S ARNr reveló las diversas estructuras de las comunidades de bacterias en controles y líquenes (Fig. 5). Se observan algunos phyla de mayor abundancia como Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Cyanobacteria, Verrucomicrobia y Bacteroidetes. Además, se observan diferencias evidentes en taxa como Cyanobacteria, donde en general los líquenes poseen una mayor abundancia relativa que los controles. Por el contrario, las actinobacterias parecen ser más abundantes en los controles (en su mayoría correspondiente a suelo), aunque en ciertos líquenes como *Hypotrachyna* y *Sticta* se observa una abundancia relativa de actinobacterias homogénea dentro de los géneros .

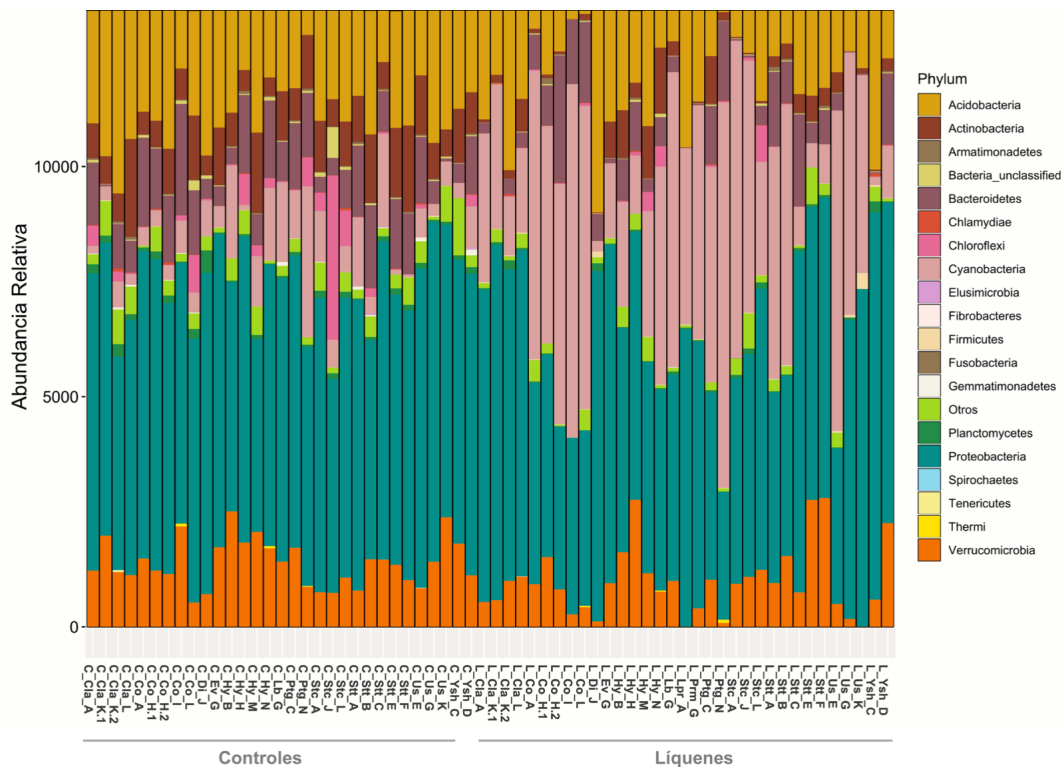


Figura 5: **Abundancia relativa de bacterias asociadas a líquenes** En la parte inferior se encuentran los códigos de cada muestra, donde C representa control, L representa Liquen; las letras siguientes representan el género del liquen y la última letra el punto de muestreo.

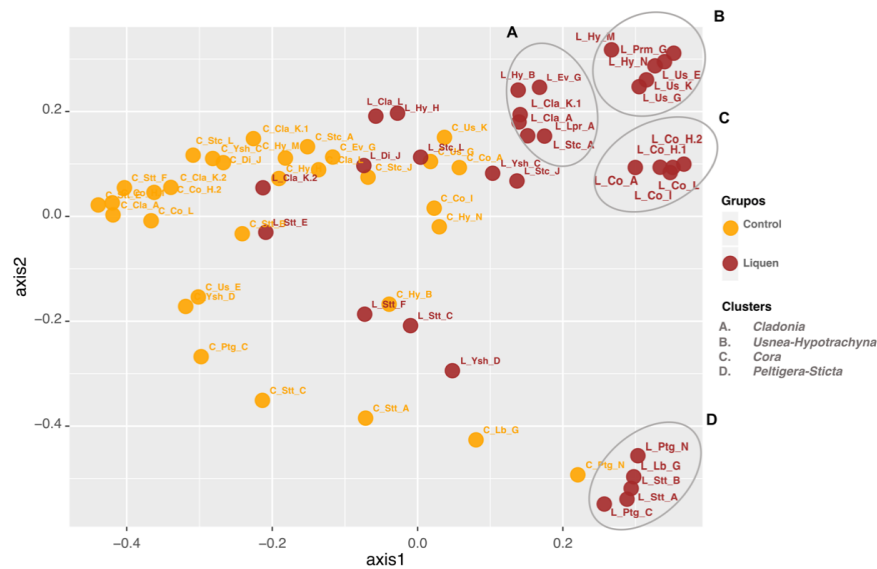


Figura 6: Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) de las comunidades de Bacteria. Se observan los controles en amarillo y los líquenes en rojo.

Para analizar la Beta-Diversidad se realizó un PCoA con el fin de representar las muestras en un espacio dimensional, donde la distancia relativa de todos los puntos representa la disimilaridad entre la estructura de las comunidades de cada muestra según el índice de Yue & Clayton (Yue & Clayton, 2005) (Fig. 6). El resultado, fueron cuatro clusters de líquenes alejados de los controles y de algunos otros líquenes. De manera interesante, dentro de los clusters se encuentran agrupadas réplicas de varios líquenes como: *Cladonia*; *Hypotrachyna* y *Usnea*; *Cora*; *Peltigera* y *Sticta*, indicando una mayor similitud en la estructura de comunidades de bacterias dentro de estos géneros.

Con el fin de observar gráficamente la abundancia relativa de los OTUs presentes en cada una de las muestras y la similitud entre ellas, se generó un heatmap de los 50 OTUs de mayor abundancia relativa, en donde la mayor saturación de los colores indica una mayor abundancia de un determinado OTU (Fig. 7). El dendrograma en el heatmap

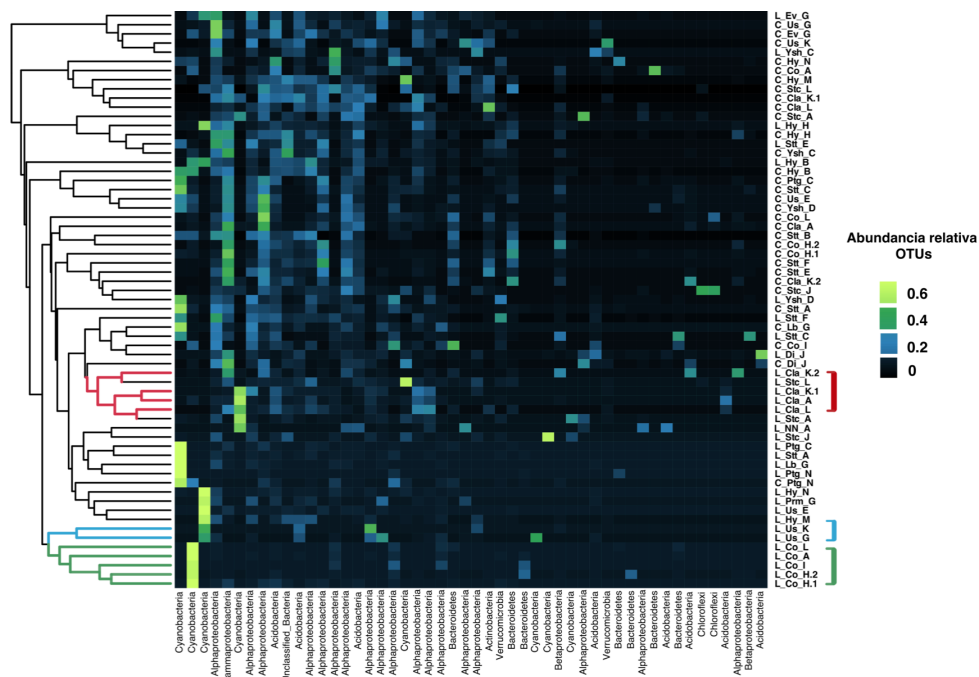


Figura 7: Heatmap de los 50 OTUs más predominantes entre las muestras de líquenes. En el eje X se muestran los OTUs nombrados por el phylum al que pertenecen; en el eje Y de la derecha encuentran las muestras catalogadas como (L) pertenecientes a líquenes y (C) pertenecientes a control; en el eje Y de la izquierda se observa un dendrograma agrupando las muestras jerárquicamente mediante el criterio de similitud de Bray-Curtis, donde se señala en rojo el cluster formado por *Cladonia*, en azul *Usnea* y en verde *Cora*. El color negro dentro del heatmap indica la ausencia de OTU dentro de la muestra, el color azul indica una abundancia media, mientras que el color verde indica una alta abundancia.

recupera tres de los clusters vistos en el análisis de PCoA: Las cinco réplicas de *Cora* se agrupan en un mismo cluster (señalado en el dendrograma en verde), lo que indica una evidente similitud en las comunidades de bacterias. De igual manera las cuatro réplicas de *Cladonia* se agruparon en un mismo cluster (señalado en el dendrograma en rojo), sin embargo dos muestras de *Stereocaulon* fueron incluidas dentro de este. Finalmente dos de tres muestras de *Usnea* formaron un cluster muy cercano a *Cora* (señalado en el dendrograma en azul).

En general, los controles se diferenciaron de los líquenes agrupándose en tres grandes clusters en la parte superior del heatmap. Aquí los OTUs con mayor abundancia se

identificaron como secuencias pertenecientes a los phyla de Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria y algunas a Cyanobacteria; mientras que en los líquenes la mayoría de los OTUs correspondieron a Cyanobacteria y algunos a Proteobacteria.

Finalmente, se generó una topología por el método de Neighbor-Joining (NJ) con la matriz de distancia generada según el índice de Yue & Clayton (Fig. 8).



Figura 8: **Árbol de Neighbor-Joining.** Se observan tres clusters de líquenes correspondientes a *Sticta*, *Cora* y *Cladonia*.

Del mismo modo que en los análisis anteriores, se obtienen clusters de *Cora* y *Cladonia*; y adicionalmente se agrupan dos réplicas de *Sticta*. Es de resaltar que los controles en general tienden a agruparse clusters independientes a los líquenes de donde fueron

recolectados, y además provenientes de diferentes puntos de muestreo.

4.3. Aislamiento de microorganismos e identificación de actinobacterias

Después del muestreo de líquenes, fueron sembradas diluciones seriadas del homogeneizado de líquen en los diferentes medios (correspondiente a bacterias de la superficie y dentro del talo) : Actinomycete Isolation Agar, International *Streptomyces* Project medium-2, Gause Agar y Gause Oligotrófico (Tabla 2). Se tuvieron en cuenta colonias con morfología única y que no estuviesen repetidas en las demás diluciones ó en otras muestras. Se recuperaron colonias de la mayoría de los líquenes, sin embargo de algunos géneros como *Usnea*, *Dibaeis* y *Lepraria* no se lograron aislamientos.

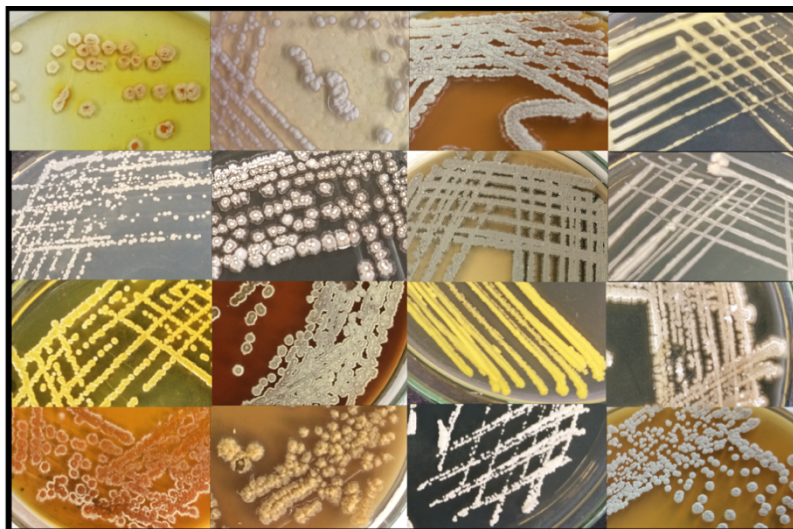


Figura 9: Cepas de Actinobacteria aisladas a partir de líquenes. Se observan 16 de las 61 cepas aisladas.

La amplificación de las muestras con primers de actinos confirmaron la presencia de 61 actinobacterias de un total de 76 aislamientos (Ver anexos: Fig. A.2) (Fig. 9). Los aislamientos que no correspondieron a actinobacterias se amplificaron con primers de

Puntos de muestreo	Género Liqen	Medios ¹	Aislamientos ²
A	<i>Stereocaulon</i>	ISP2	1
	<i>Cora</i>	AIA	1
		ISP2	1
	<i>Cladonia</i>	ISP2	1
		G	1
B	<i>Sticta</i>	ISP2	2
	<i>Hypotrachyna</i>	AIA	1
		ISP2	1
C	<i>Yoshimuriella</i>	ISP2	1
		G	2
		GO	1
	<i>Peltigera</i>	AIA	2
		ISP2	1
G		3	
D	<i>Yoshimuriella</i>	GO	1
		AIA	1
		ISP2	3
		G	1
		GO	2
E	<i>Sticta</i>	AIA	1
		ISP2	4
		G	2
G	<i>Lobariella</i>	AIA	3
	<i>Everniastrum</i>	AIA	1
		ISP2	2
H	<i>Cora</i>	ISP2	1
		AIA	2
	<i>Hypotrachyna</i>	AIA	4
		ISP2	7
		G	2
I	<i>Cora</i>	GO	1
	<i>Cladonia</i>	AIA	2
L	<i>Cora</i>	AIA	1
	<i>Stereocaulon</i>	AIA	3
		ISP2	5
N	<i>Hypotrachyna</i>	AIA	1
	<i>Peltigera</i>	AIA	3
ISP2		2	

Tabla 2: Aislamientos realizados a partir de líquenes. ¹Medios de aislamientos: AIA: Actinomycete Isolation Agar, ISP2: International *Streptomyces* Project medium-2, G: Gause Agar, GO Gause Oligotrófico. ²Numero de Aislamientos por muestra y medio de cultivo.

hongos (ITS4-ITS5), donde se detectó la presencia de 11 hongos (Ver anexos: Fig A.3).

Los 4 aislamientos restantes se comprobaron como bacterias-no actinobacterias tras ser amplificadas con primers universales de bacteria (27F y 1492R) (Ver anexos: Fig A.4). El ADN de las Actinobacterias se presevió a -80°C para una futura identificación molecular.

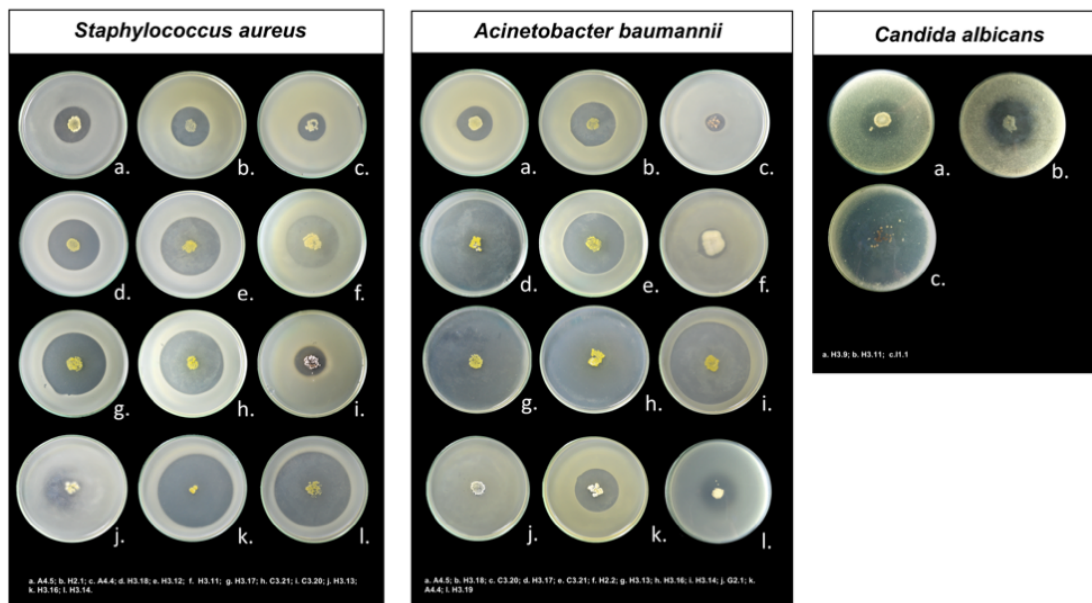


Figura 10: Cepas de Actinobacteria con actividad antibiótica. Cada cepa se catalogó con el código del líquen de donde fue recuperada y el número de aislamiento.

4.4. Evaluación del potencial antimicrobiano de metabolitos producidos por actinobacterias aisladas

Se obtuvo un total de 18 actinobacterias con actividad antimicrobiana contra los diferentes patógenos (Fig.10). Esto representa cerca del 30 % de las actinobacterias aisladas. La mayor actividad antagonista se presentó contra los patógenos *A. baumannii* y *S. aureus*, donde el 23 % y 21 % de las actinobacterias tuvieron actividad; además el 6 % tuvo actividad contra *C.albicans*. No se observó actividad en contra de *E. coli*, *S. enterica*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*.

Estas actinobacterias con actividad antimicrobiana provienen de diferentes géneros de líquenes. Aislamientos provenientes de *Hypotrachyna* presentaron la mayor actividad, seguido de *Cora*, *Cladonia* y *Everniastrum* (Ver anexos. Tabla 6).

Adicionalmente, 4 cepas correspondientes a hongos tuvieron actividad antimicrobiana contra *A. baumannii* y *S. aureus* y/o *C.albicans*. Asimismo, un aislamiento correspondiente a Bacteria (No Actinobacteria), tuvo actividad contra *A. baumannii* y *S. aureus*.

5. Discusión

En este trabajo utilizamos secuencias de ADN para estudiar la composición y estructura de comunidades de bacterias asociadas a líquenes de un ambiente extremo como lo es el Páramo, y adicionalmente métodos de cultivo para destacar el potencial biotecnológico de ciertas bacterias aisladas por su actividad antibiótica. A la fecha, este trabajo representa el primer estudio en Colombia sobre comunidades de Bacteria asociadas a líquenes.

Las secuencias de Bacteria estudiadas en 33 líquenes se encontraban dominadas en su mayoría por Cyanobacteria como era esperado (Ryan et al., 2004). Sin embargo algunos géneros como *Dibaeis*, *Sticta* y *Yoshimuriella* obtuvieron muy bajos valores de Cyanobacteria, lo que sería atribuido a la naturaleza de sus fotobiontes correspondientes a algas verdes (Moncada et al., 2013; Ihlen, 1998).

Además de Cyanobacteria, el phylum Proteobacteria representa uno de los grupos más abundantes. Esto corrobora los hallazgos realizados por Cardinale *et al.* (Cardinale et al., 2006, 2008; Grube et al., 2009), donde Alphaproteobacteria fue el taxón dominante de todas las especies de líquenes estudiadas. Según algunos estudios, los líquenes pueden beneficiarse de las funciones complementarias de las comunidades bacterianas, a las cuales se les podría catalogar como "microsimbiontes". De acuerdo a Grube *et al.* (Grube

et al., 2009), organismos pertenecientes a Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria y Firmicutes pueden complementar potencialmente la demanda de nitrógeno en conjunto con el fotobionte.

Nuestros datos demuestran la gran diversidad de comunidades de bacterias en líquenes. La presencia de numerosos OTUs de baja abundancia en nuestro estudio, demuestra el poder de la secuenciación de Illumina para detectar comunidades bacterianas en los líquenes (Tawfik et al., 2018). Se podría sugerir, que esta diversidad incluso puede ser mayor, ya que las curvas de rarefacción no llegaron al nivel de saturación. (Yang et al., 2015). Adicionalmente, la estructura de estas comunidades demuestra cierto grado de especificidad con el hospedero como se pudo observar en los clusters formados para algunos géneros como *Cora*, *Cladonia*, *Sticta* y *Usnea*. Estos resultados coinciden con estudios recientes en géneros como *Cladonia*, *Lecanora*, *Lobaria* y *Umbilicaria*. (Grube et al., 2015; Hodkinson et al., 2012; Hodkinson & Lutzoni, 2009; Bates et al., 2011). Sin embargo, es necesario tener en cuenta un mayor número de réplicas por cada género para poder obtener resultados más robustos.

Se han hipotetizado diferentes roles de las bacterias dentro del talo, como en el ciclo de nutrientes, señalización, resistencia ante estrés biótico y abiótico (Grube et al., 2012). Bacteroidetes por ejemplo, fue otro de los phyla de mayor representación en algunos líquenes. Una de las clases más abundantes fue Sphingobacteriia quienes se caracterizan por producir esfingofosfolípidos que tienen importancia biológica por el papel de señalización celular que desempeñan (Minamino et al., 2003). Algunas clases encontradas de menor abundancia fueron Cytophagia caracterizada por tener un metabolismo quimioorganótrofo (Holt et al., 1989), Bacteroidia representada por organismos sacarolí-

ticos y Flavobacteriia caracterizada por contener organismos con capacidad de crecer a temperaturas de 0°C y en ambientes extremos como suelos polares. (Männistö & Häggblom, 2006; Barbeyron et al., 2001; Descamps et al., 2006; Elifantz et al., 2005; Murray & Grzymiski, 2007). Miembros de este phylum han logrado ser aislados a partir de líquenes marinos y litorales (Parrot et al., 2015; Sigurbjörnsdóttir et al., 2014).

De igual manera, organismos de Acidobacteria mostraron una gran abundancia en este estudio. Miembros de este phylum han sido catalogados como diversos y abundantes en líquenes de ecosistemas alpinos, donde se cree que podrían tener un rol importante en la descomposición de polisacáridos (Pankratov, 2012; Grube et al., 2015).

En el phylum Actinobacteria, los análisis de diversidad mostraron varios miembros de diferentes familias como Thermomonosporaceae, Conexibacteraceae, Microbacteriaceae, Frankiaceae, aún sin clasificar. Estas secuencias podrían corresponder a nuevas bacterias y por ende no fueron asignadas a linajes conocidos. También se podría plantear que estas secuencias pertenecen a linajes poco estudiados y por lo tanto tienen pocas o ninguna secuencia representativa en las bases de datos (Yang et al., 2015). Las actinobacterias en simbiosis con organismos sésiles han llamado la atención por el número de compuestos bioactivos que pueden producir, muchos de estos con potencial biotecnológico (Suzuki et al., 2015; Parrot et al., 2015; González et al., 2005; Parrot et al., 2015; Phongsopitanun et al., 2016; Yamamura et al., 2011).

Estos resultados de diversidad demuestran que existen actinobacterias aún por descubrir, lo que se podría traducir en nuevas moléculas bioactivas. Esto se pudo complementar con los análisis cultivo-dependientes, en donde los diferentes aislamientos con actividad antagonista contra patógenos de importancia médica como *Acinetobacter*

baumannii, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* demuestra que los líquenes son una fuente alternativa de gran diversidad de actinobacterias potencialmente bioactivas.

Por otro lado, los líquenes son conocidos por producir una variedad biológica de compuestos activos como polisacáridos, ácidos, quinonas y glicopéptidos (Podterob, 2008; Shukla et al., 2010; Müller, 2001). La combinación de estos compuestos podrían estar actuando como un factor de selección de bacterias tolerantes a dichos compuestos y en la evolución de las comunidades en diferentes géneros de líquenes como microsimbiontes. Estos microsimbiontes podrían al mismo tiempo contribuir a la adaptación, longevidad, y persistencia de los líquenes a hábitats pobres en nutrientes y hostiles con una fuerte fluctuación de parámetros abióticos como lo son los Páramos.

Finalmente, es necesario realizar estudios complementarios que puedan brindar mayor información sobre las comunidades bacterianas en líquenes de diferentes géneros en variedad de ambientes, lo que podría dilucidar de una manera más clara la existencia de comunidades hospedero-específicas ó por el contrario comunidades generalizadas en todos los líquenes. Teniendo en cuenta que Colombia alberga el 10% de las especies de líquenes en el mundo, es importante realizar estudios adicionales que nos brinden un mayor entendimiento sobre la diversidad de estas comunidades, su rol biológico dentro del hospedero y las vías de expresión de compuestos bioactivos. Estos resultados abren una ventana hacia la generación de nuevo conocimiento, donde será necesario implementar enfoques moleculares y bioinformáticos como las ciencias ómicas.

6. Conclusiones

- ▶ Se estudió la diversidad y estructura de comunidades bacterianas asociadas a líquenes de páramo, donde se observó una gran diversidad de phyla de Bacteria, algunas de gran abundancia como Cyanobacteria, Proteobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, Verrugomicrobia y Actinobacteria.
- ▶ Las comunidades de bacterias asociadas a líquenes podrían tener especificidad según el género del hospedero, como se evidenció en *Cora*, *Cladonia*, *Sticta* y *Usnea*.
- ▶ Se aislaron actinobacterias asociadas a líquenes, donde el 30 % presentó actividad antimicrobiana contra alguno de los patógenos evaluados. Lo que demuestra que los líquenes representan una fuente promisorio para el descubrimiento de bacterias con potencial biotecnológico por la producción de compuestos antimicrobianos.

Referencias

- Ahmadjian, V. (1993). *The lichen symbiosis*. John Wiley and Sons.
- Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K.-H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59(1), 143–169.
- Arbeláez-Cortés, E. (2013). Describiendo especies: Un panorama de la biodiversidad colombiana en el ámbito mundial. *Acta Biológica Colombiana*, 18(1), 165.
- Arbeláez-cortés, E. (2015). Colombian frozen biodiversity: 16 years of the tissue collection of the humboldt institute. *Acta Biológica Colombiana*, 20(2), 163–173.
- Armstrong, E., Yan, L., Boyd, K. G., Wright, P. C., & Burgess, J. G. (2001). The symbiotic role of marine microbes on living surfaces. *Hydrobiologia*, 461(1-3), 37–40.
- Aschenbrenner, I. A., Cernava, T., Berg, G., & Grube, M. (2016). Understanding microbial multi-species symbioses. *Frontiers in Microbiology*, 7(FEB), 1–9.
- Babraham, B. (2011). Fastqc: A quality control tool for high throughput sequence data.
- Barbeyron, T., L'Haridon, S., Corre, E., Kloareg, B., & Potin, P. (2001). *Zobellia galactanovorans* gen. nov., sp. nov., a marine species of flavobacteriaceae isolated from a red alga, and classification of [*cytophaga*] *uliginosa* (zobell and upham 1944) reichenbach 1989 as *zobellia uliginosa* gen. nov., comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(3), 985–997.

- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1–43.
- Barreno, E. & Rico, V. (1984). Sobre la biología de los líquenes. i. anatomía, morfología y estructuras vegetativas. In *Anales de Biología*.
- Bates, S. T., Cropsey, G. W. G., Caporaso, J. G., Knight, R., & Fierer, N. (2011). Bacterial communities associated with the lichen symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1309–1314.
- Bennett, J. (1998). Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *Journal of biotechnology*, 66(2-3), 101–107.
- Bjelland, T., Grube, M., Hoem, S., Jorgensen, S. L., Daae, F. L., Thorseth, I. H., & Øvreås, L. (2011). Microbial metacommunities in the lichen – rock habitat. *Environmental Microbiology Reports*, 3, 434–442.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120.
- Boustie, J. & Grube, M. (2005). Lichens—a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 3(02), 273–287.
- Braña, A. F., Fiedler, H.-P., Nava, H., González, V., Sarmiento-Vizcaíno, A., Molina, A., Acuña, J. L., García, L. A., & Blanco, G. (2015). Two streptomyces species producing antibiotic, antitumor, and anti-inflammatory compounds are widespread among inter-

- tidal macroalgae and deep-sea coral reef invertebrates from the central cantabrian sea. *Microbial ecology*, 69(3), 512–524.
- Brodo, I. M. (1973). *Substrate ecology*, (pp. 401–441). Elsevier.
- Bulgarelli, D., Schlaeppli, K., Spaepen, S., van Themaat, E. V. L., & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual review of plant biology*, 64, 807–838.
- Bull, A. T. & Stach, J. E. (2007). Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *Trends in microbiology*, 15(11), 491–499.
- Buytaert, W., Célleri, R., De Bièvre, B., Cisneros, F., Wyseure, G., Deckers, J., & Hofstede, R. (2006). Human impact on the hydrology of the andean páramos. *Earth-Science Reviews*, 79(1-2), 53–72.
- Bérdy, J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *The Journal of antibiotics*, 65(8), 385.
- Calderón-Patrón, J. M., Moreno, C. E., & Zuria, I. (2012). La diversidad beta: medio siglo de avances. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 83(3), 879–891.
- Camacho, H. M. A. J. J. (2014). Biotechnology profile analysis in colombia. *Scientometrics*, (November 2013), 1789–1804.
- Cao, Y., Fanning, S., Proos, S., Jordan, K., & Srikumar, S. (2017). A review on the applications of next generation sequencing technologies as applied to food-related microbiome studies. *Frontiers in microbiology*, 8, 1829.

- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Pena, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., et al. (2010). Qiime allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, 7(5), 335.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S. M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., et al. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the illumina hiseq and miseq platforms. *The ISME journal*, 6(8), 1621.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., & Knight, R. (2011). Global patterns of 16s rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the national academy of sciences*, 108(Supplement 1), 4516–4522.
- Cardinale, M., Grube, M., & Berg, G. (2011). Frondihabitans cladoniiphilus sp. nov., an actinobacterium of the family microbacteriaceae isolated from lichen, and emended description of the genus frondihabitans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(12), 3033–3038.
- Cardinale, M., Puglia, A. M., & Grube, M. (2006). Molecular analysis of lichen-associated bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 57(3), 484–495.
- Cardinale, M., Vieira De Castro, J., Müller, H., Berg, G., & Grube, M. (2008). In situ analysis of the bacterial community associated with the reindeer lichen cladonia arbuscula reveals predominance of alphaproteobacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 66(1), 63–71.

- Castaño, C. (2002). *Páramos y ecosistemas alto andinos de Colombia en condición hotspot & global climatic tensor*. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales.
- Ceron, B. W. & Quintero, A. L. P. (2009). Estructura de una comunidad de líquenes y morfología del género *sticta* (stictaceae) en un gradiente altitudinal. *Acta Biológica Colombiana*, 14(3), 157–170.
- Claesson, M. J., Wang, Q., O'sullivan, O., Greene-Diniz, R., Cole, J. R., Ross, R. P., & O'toole, P. W. (2010). Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16s rrna gene regions. *Nucleic acids research*, 38(22), e200–e200.
- Curtis, T. P., Head, I. M., Lunn, M., Woodcock, S., Schloss, P. D., & Sloan, W. T. (2006). What is the extent of prokaryotic diversity? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 361(1475), 2023–2037.
- Davies, J. & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*, 74(3), 417–433.
- Davies, J., Wang, H., Taylor, T., Warabi, K., Huang, X.-H., & Andersen, R. J. (2005). Uncialamycin, a new enediyne antibiotic. *ACS Letters*.
- De Bary, A. (1879). *Die erscheinung der symbiose*. Verlag von Karl J. Trübner.
- de Valencia, M. C. (2002). *Hongos liquenizados*, volume 8. Univ. Nacional de Colombia.
- Descamps, V., Colin, S., Lahaye, M., Jam, M., Richard, C., Potin, P., Barbeyron, T., Yvin,

- J.-C., & Kloareg, B. (2006). Isolation and culture of a marine bacterium degrading the sulfated fucans from marine brown algae. *Marine biotechnology*, 8(1), 27–39.
- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than blast. *Bioinformatics*, 26(19), 2460–2461.
- Elifantz, H., Malmstrom, R. R., Cottrell, M. T., & Kirchman, D. L. (2005). Assimilation of polysaccharides and glucose by major bacterial groups in the delaware estuary. *Applied and environmental microbiology*, 71(12), 7799–7805.
- Eloe-Fadrosh, E. A., Ivanova, N. N., Woyke, T., & Kyrpides, N. C. (2016). Metagenomics uncovers gaps in amplicon-based detection of microbial diversity. *Nature Microbiology*, 1(4), 15032.
- Fenton, A., Stephens, P., Crowley, J., O'callaghan, M., & O'gara, F. (1992). Exploitation of gene (s) involved in 2, 4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a pseudomonas strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(12), 3873–3878.
- Feurerer, T. & Hawksworth, D. L. (2007). Biodiversity of lichens, including a world-wide analysis of checklist data based on takhtajan's floristic regions. *Biodiversity and Conservation*, 16(1), 85–98.
- Genilloud, O. (2005). New pcr primers for the screening of nrps and pks-i systems in actinomycetes : Detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microbial Ecology*, 49, 10–24.

- Genilloud, O., González, I., Salazar, O., Martín, J., Tormo, J. R., & Vicente, F. (2011). Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 38(3), 375–389.
- Gilbert, J. A., Jansson, J. K., & Knight, R. (2014). The earth microbiome project: successes and aspirations. *BMC biology*, 12(1), 69.
- Glick, B. R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian journal of microbiology*, 41(2), 109–117.
- González, R. G. B. & Gradstein, S. R. (2016). *Catálogo de plantas y líquenes de Colombia*. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Instituto de Ciencias Naturales.
- González, I., Ayuso-Sacido, A., Anderson, A., & Genilloud, O. (2005). Actinomycetes isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS microbiology ecology*, 54(3), 401–415.
- Grube, M. & Berg, G. (2009). Microbial consortia of bacteria and fungi with focus on the lichen symbiosis. *Fungal Biology Reviews*.
- Grube, M., Cardinale, M., de Castro, J. V., Müller, H., & Berg, G. (2009). Species-specific structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbioses. *The ISME Journal*, 3(9), 1105–1115.
- 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(2), 412–424.
- Grube, M., Köberl, M., Lackner, S., Berg, C., & Berg, G. (2012). Host–parasite interaction and microbiome response: effects of fungal infections on the bacterial community of the alpine lichen *solorina crocea*. *FEMS microbiology ecology*, 82(2), 472–481.
- Hernández-Camacho, J. I. (1992). Centros de endemismo en colombia. *Acta Zoologica Mexicana, Volumen es*(Cuadro 1), 175–190.
- Hockett, K. L. & Baltrus, D. A. (2017). Use of the soft-agar overlay technique to screen for bacterially produced inhibitory compounds. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (119).
- Hodkinson, B. P., Gottel, N. R., Schadt, C. W., & Lutzoni, F. (2012). Photoautotrophic symbiont and geography are major factors affecting highly structured and diverse bacterial communities in the lichen microbiome. *Environmental Microbiology*, 14, 147–161.
- Hodkinson, B. P. & Lutzoni, F. (2009). A microbiotic survey of lichen-associated bacteria reveals a new lineage from the rhizobiales. *Symbiosis*, 49(2), 163–180.
- Hofstede, R., Segarra, P., Mena, V., et al. (2003). *The páramos of the world*. Global Peatland Initiative/NC-IUCN/EcoCiencia.
- Holt, J. G., Williams, S. T., & Holt (1989). *Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 4*. Lippincott Williams & Wilkins.

- Honegger, R. (1991). Functional aspects of the lichen symbiosis. *Annual review of plant biology*, 42(1), 553–578.
- Hopwood, D., Chater, K., & Bibb, M. (1994). *Genetics of antibiotic production in Streptomyces coelicolor A3 (2), a model streptomycete*, (pp. 65–102). Elsevier.
- Ihlen, P. (1998). The lichenicolous fungi on species of the genera baeomyces, dibaeis, and icmadophila in norway. *The Lichenologist*, 30(1), 27–57.
- Ilic, S., Konstantinovic, S., Todorovic, Z., Lazic, M., Veljkovic, V., Jokovic, N., & Radovanovic, B. (2007). Characterization and antimicrobial activity of the bioactive metabolites in streptomycete isolates. *Microbiology*, 76(4), 421–428.
- Iskina, R. (1938). On nitrogen fixing bacteria in lichens. *Izv Biol Inst Permsk*, 11, 133–139.
- IUCN (2017). The iucn red list of threatened species.
- Kim, K. H., Ramadhar, T. R., Beemelmans, C., Cao, S., Poulsen, M., Currie, C. R., & Clardy, J. (2014). Natalamycin a, an ansamycin from a termite-associated streptomyces sp. *Chemical science*, 5(11), 4333–4338.
- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., & Schloss, P. D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the miseq illumina sequencing platform. *Applied and environmental microbiology*, AEM-01043.
- Li, J., Jia, H., Cai, X., Zhong, H., Feng, Q., Sunagawa, S., Arumugam, M., Kultima, J. R.,

- Prifti, E., & Nielsen, T. (2014). An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nature biotechnology*, 32(8), 834.
- Liba, C. M., Ferrara, F. I. S., Manfio, G. P., Fantinatti-Garboggini, F., Albuquerque, R. C., Pavan, C., Ramos, P. L., 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.
- 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.
- Lozupone, C., Lladser, M. E., Knights, D., Stombaugh, J., & Knight, R. (2011). Unifrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *The ISME journal*, 5(2), 169.
- Lutzoni, F., Pagel, M., & Reeb, V. (2001). Major fungal lineages are derived from lichen symbiotic ancestors. *Nature*, 411(6840), 937.
- Macagnan, D., Romeiro, R. d. S., de Souza, J. T., & Pomella, A. W. (2006). Isolation of actinomycetes and endospore-forming bacteria from the cacao pod surface and their antagonistic activity against the witches' broom and black pod pathogens. *Phytoparasitica*, 34(2), 122–132.
- Madriñán, S., Cortés, A. J., & Richardson, J. E. (2013). Páramo is the world's fastest evolving and coolest biodiversity hotspot. *Frontiers in genetics*, 4, 192.

- Madsen, E. L. (2005). Identifying microorganisms responsible for ecologically significant biogeochemical processes. *Nature Reviews Microbiology*, 3(5), 439.
- Männistö, M. K. & Häggblom, M. M. (2006). Characterization of psychrotolerant heterotrophic bacteria from finnish lapland. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(3), 229–243.
- Martin, T. & Lewis, M. Mueller hinton agar.
- McMurdie, P. J. & Holmes, S. (2013). phyloseq: an r package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS one*, 8(4), e61217.
- Merchán, M. M. (2009). Briófitos y líquenes de los páramos de moyas y los pozos de aquitania, boyacá-colombia. *CIENCIA EN DESARROLLO*, 2(2).
- Miles, L., Lopera, C., González, S., de García, M. C., Franco, A., & Restrepo, S. (2012). Exploring the biocontrol potential of fungal endophytes from an andean colombian paramo ecosystem. *BioControl*, 57(5), 697–710.
- Minamino, M., Sakaguchi, I., Naka, T., Ikeda, N., Kato, Y., Tomiyasu, I., Yano, I., & Kobayashi, K. (2003). Bacterial ceramides and sphingophospholipids induce apoptosis of human leukaemic cells. *Microbiology*, 149(8), 2071–2081.
- Moncada, B., Lücking, R., & Betancourt-Macuase, L. (2013). Phylogeny of the lobariaceae (lichenized ascomycota: Peltigerales), with a reappraisal of the genus lobariella. *The Lichenologist*, 45(2), 203–263.

- Müller, K. (2001). Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(1-2), 9–16.
- Murray, A. E. & Grzymalski, J. J. (2007). Diversity and genomics of antarctic marine microorganisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 362(1488), 2259–2271.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., da Fonseca, G. A. B., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853–858.
- Neefs, J.-M., Van de Peer, Y., De Rijk, P., Chapelle, S., & De Wachter, R. (1993). Compilation of small ribosomal subunit rna structures. *Nucleic acids research*, 21(13), 3025–3049.
- Neufeld, J. D., Li, J., & Mohn, W. W. (2008). Scratching the surface of the rare biosphere with ribosomal sequence tag primers. *FEMS microbiology letters*, 283(2), 146–153.
- Okoro, C. K., Brown, R., Jones, A. L., Andrews, B. A., Asenjo, J. A., Goodfellow, M., & Bull, A. T. (2009a). Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the atacama desert, chile. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 95(2), 121–133.
- Okoro, C. K., Brown, R., Jones, A. L., Andrews, B. A., Asenjo, J. A., Goodfellow, M., & Bull, A. T. (2009b). Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the atacama desert, chile. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 95(2), 121–133.
- Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Pace, N. R., & Stahl, D. A. (1986). Microbial ecology and evolution: a ribosomal rna approach. *Annual reviews in microbiology*, 40(1), 337–365.

- Olson, J. B. & Kellogg, C. A. (2010). Microbial ecology of corals, sponges, and algae in mesophotic coral environments. *FEMS microbiology ecology*, 73(1), 17–30.
- Oskay, A. M., Üsame, T., & Cem, A. (2004). Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of turkey. *African journal of Biotechnology*, 3(9), 441–446.
- Pankratov, T. (2012). Acidobacteria in microbial communities of the bog and tundra lichens. *Microbiology*, 81(1), 51–58.
- Panosyan, A. & Nikogosyan, V. (1966). The presence of azotobacter in lichens. *Akad Nauk Armian SSR, Biol Zhurn Armen*, 19, 3–11.
- Parrot, D., Antony-Babu, S., Intertaglia, L., Grube, M., Tomasi, S., & Suzuki, M. T. (2015). Littoral lichens as a novel source of potentially bioactive actinobacteria. *Scientific Reports*, 5(1), 15839–15839.
- Pedrós-Alió, C. (2007). Dipping into the rare biosphere. *SCIENCE-NEW YORK THEN WASHINGTON-*, 5809, 192.
- Phongsopitanun, W., Matsumoto, A., Inahashi, Y., Kudo, T., Mori, M., Shiomi, K., Takahashi, Y., & Tanasupawat, S. (2016). Actinoplanes lichenis sp. nov., isolated from lichen. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(1), 468–473.
- Picard, A. & Daniel, I. (2013). Pressure as an environmental parameter for microbial life - a review. *Biophysical Chemistry*, 183, 30–41.
- Pike, L. H. (1978). The importance of epiphytic lichens in mineral cycling. *Bryologist*, 247–257.

- Podterob, A. (2008). Chemical composition of lichens and their medical applications. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 42(10), 582–588.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2012). The silva ribosomal rna gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, 41(D1), D590–D596.
- Rambaut, A. (2009). Figtree, version 1.3. 1. *Computer program distributed by the author, website: <http://treebioedacuk/software/figtree/>[accessed January 4, 2011].*
- Ramírez, M. (2011). Importancia de los microorganismos y la edofauna en los páramos.
- Rangel, J. O. (2005). La biodiversidad de colombia. *Palimpsestvs: Revista de la Facultad de Ciencias Humanas*, (5).
- Rangel-Ch, J. O. (2006). La biodiversidad de colombia. *Universidad Nacional de Colombia*, 292–304.
- Romero, M. H. & Montenegro, E. (2008). *Informe sobre el estado de la biodiversidad en Colombia*. Instituto Humbolt.
- Ruiz-Pérez, C. A., Restrepo, S., & Zambrano, M. M. (2016). Microbial and functional diversity within the phyllosphere of espeletia species in an andean high-mountain ecosystem. *Applied and environmental microbiology*, 82(6), 1807–1817.
- Ryan, B. D., Lumbsch, H., Messuti, M., Printzen, C., Oeliwa, I., Nash, T., Diederich, P., Gries, C., & Bungartz, F. (2004). Lichen flora of the greater sonoran desert region. *Lichens Unlimited*, 357.

- Schatz, A. & Waksman, S. A. (1944). Effect of streptomycin and other antibiotic substances upon mycobacterium tuberculosis and related organisms. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 57(2), 244–248.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., et al. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, 75(23), 7537–7541.
- Schmidt-Mumm, U. & Vargas Ríos, O. (2012). Comunidades vegetales de las transiciones terrestre-acuáticas del páramo de chingaza, colombia. *Revista de Biología Tropical*, 60(1), 35–64.
- 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.
- Selvin, J., Shanmughapriya, S., Gandhimathi, R., Kiran, G. S., Ravji, T. R., Natarajaseenivasan, K., & Hema, T. (2009). Optimization and production of novel antimicrobial agents from sponge associated marine actinomycetes nocardiosis dassonvillei mad08. *Applied microbiology and biotechnology*, 83(3), 435.
- Seneviratne, G. & Indrasena, I. (2006). Nitrogen fixation in lichens is important for improved rock weathering. *Journal of biosciences*, 31(5), 639–643.

- Shukla, V., Joshi, G. P., & Rawat, M. S. M. (2010). Lichens as a potential natural source of bioactive compounds : a review. *Phytochemistry Reviews*, 303–314.
- Sigurbjörnsdóttir, M. A., Heiðmarsson, S., Jónsdóttir, A. R., & Vilhelmsson, O. (2014). Novel bacteria associated with arctic seashore lichens have potential roles in nutrient scavenging. *Canadian journal of microbiology*, 60(5), 307–317.
- Sinclair, L., Osman, O. A., Bertilsson, S., & Eiler, A. (2015). Microbial community composition and diversity via 16s rrna gene amplicons: evaluating the illumina platform. *PloS one*, 10(2), e0116955.
- Singh, R. P., Mantri, V. A., Reddy, C., & Jha, B. (2011). Isolation of seaweed-associated bacteria and their morphogenesis-inducing capability in axenic cultures of the green alga *Ulva fasciata*. *Aquatic Biology*, 12(1), 13–21.
- Sogin, M. L., Morrison, H. G., Huber, J. A., Welch, D. M., Huse, S. M., Neal, P. R., Arrieta, J. M., & Herndl, G. J. (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(32), 12115–12120.
- Suzuki, M. T., Parrot, D., Berg, G., Grube, M., & Tomasi, S. (2015). Lichens as natural sources of biotechnologically relevant bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(2), 583–595.
- Syers, J. & Iskandar, I. (1973). Pedogenetic significance of lichens. In *The lichens* (pp. 225–248). Elsevier.
- Tawfik, S. A., Azab, M. M., Ahmed, A. A. A., & Fayyad, D. M. (2018). Illumina mi-

- seq sequencing for preliminary analysis of microbiome causing primary endodontic infections in egypt. *International journal of microbiology*, 2018.
- Tebben, J., Tapiolas, D. M., Motti, C. A., Abrego, D., Negri, A. P., Blackall, L. L., Steinberg, P. D., & Harder, T. (2011). Induction of larval metamorphosis of the coral acropora millepora by tetrabromopyrrole isolated from a pseudoalteromonas bacterium. *PloS one*, 6(4), e19082.
- Thompson, L. R., Sanders, J. G., McDonald, D., Amir, A., Ladau, J., Locey, K. J., Prill, R. J., Tripathi, A., Gibbons, S. M., Ackermann, G., et al. (2017). A communal catalogue reveals earth's multiscale microbial diversity. *Nature*, 551(7681).
- Uphof, J. T. (1925). Purple bacteria as symbionts of a lichen. *Science*, 61(1568), 67–67.
- Van den Burg, B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 213–218.
- Van der Hammen, T. & Otero-García, J. (2007). Los páramos: archipiélagos terrestres en el norte de los andes. cap. 2, págs. 25-31. M. Morales, J. Otero, T. Van der Hammen, A. Torres, C. Cadena, C. Pedraza N. Rodríguez, C. Franco, JC Betancourth, E. Olaya, E. Posada & L. Cárdenas. *Atlas de páramos de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá[Links]*.
- Vargas, O. & Pedraza, P. (2004). Parque nacional natural chingaza. *Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia*.
- Waksman, S. A. & Woodruff, H. B. (1940). Bacteriostatic and bactericidal substances

- produced by a soil actinomyces. *Proceedings of the society for Experimental Biology and Medicine*, 45(2), 609–614.
- Waksman, S. A. & Woodruff, H. B. (1942). Selective antibiotic action of various substances of microbial origin. *Journal of bacteriology*, 44(3), 373.
- Wang, D. & Ren, H. (2017). Evaluation of antagonistic activity of actinobacteria in saxicolous lichens. *International Journal of Agriculture and Biology*, 19(2).
- Wang, D.-s., Xue, Q.-h., Ma, Y.-y., Wei, X.-l., Chen, J., & He, F. (2014). Oligotrophy is helpful for the isolation of bioactive actinomycetes. *Indian journal of microbiology*, 54(2), 178–184.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and environmental microbiology*, 73(16), 5261–5267.
- Wilson, K. (2001). Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current protocols in molecular biology*, 56(1), 2–4.
- Woese, C. R. & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(11), 5088–5090.
- Wolters, V., Silver, W. L., Bignell, D. E., Coleman, D. C., Lavelle, P., Van Der Putten, W. H., De Ruiter, P., Rusek, J., Wall, D. H., & Wardle, D. A. (2000). Effects of global changes on above-and belowground biodiversity in terrestrial ecosystems: Implications for ecosystem functioning: We identify the basic types of interaction between vascular plants and

- soil biota; describe the sensitivity of each type to changes in species composition; and, within this framework, evaluate the potential consequences of global change drivers on ecosystem processes. *AIBS Bulletin*, 50(12), 1089–1098.
- Woolhouse, M. & Farrar, J. (2014). Policy: An intergovernmental panel on antimicrobial resistance. *Nature*, 509(7502), 555–557.
- Yamamura, H., Ashizawa, H., Nakagawa, Y., Hamada, M., Ishida, Y., Ootoguro, M., & Tamura, T. (2017). *Actinomycetospora rishiriensis* sp. nov., isolated from a lichen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, (2011), 2621–2625.
- Yamamura, H., Ashizawa, H., Nakagawa, Y., Hamada, M., Ishida, Y., Ootoguro, M., Tamura, T., & Hayakawa, M. (2011). *Actinomycetospora rishiriensis* sp. nov., isolated from a lichen. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(11), 2621–2625.
- Yang, C., Li, Y., Zhou, B., Zhou, Y., Zheng, W., Tian, Y., Van Nostrand, J. D., Wu, L., He, Z., Zhou, J., et al. (2015). Illumina sequencing-based analysis of free-living bacterial community dynamics during an akashiwo sanguine bloom in xiamen sea, china. *Scientific reports*, 5, 8476.
- Yim, G. & Wang, H. H. (2007). Antibiotics as signaling molecules. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362(1483), 1195–1200.
- Yoon, V. & Nodwell, J. R. (2014). Activating secondary metabolism with stress and chemicals. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*.
- Yue, J. C. & Clayton, M. K. (2005). A similarity measure based on species proportions. *Communications in Statistics-theory and Methods*, 34(11), 2123–2131.

Apéndices

Apéndice A- Figuras

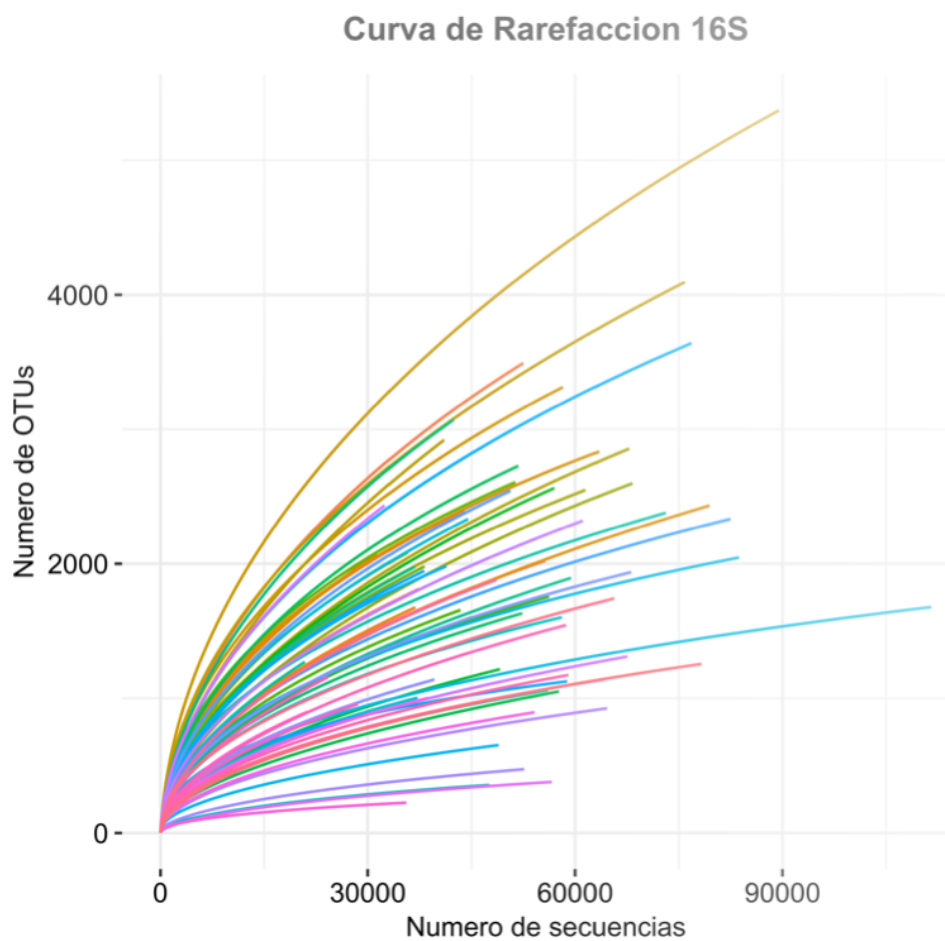


Figura A.1: **Curva de Rarefacción:** Los OTUs fueron def nidos al 3% de divergencia de las secuencias

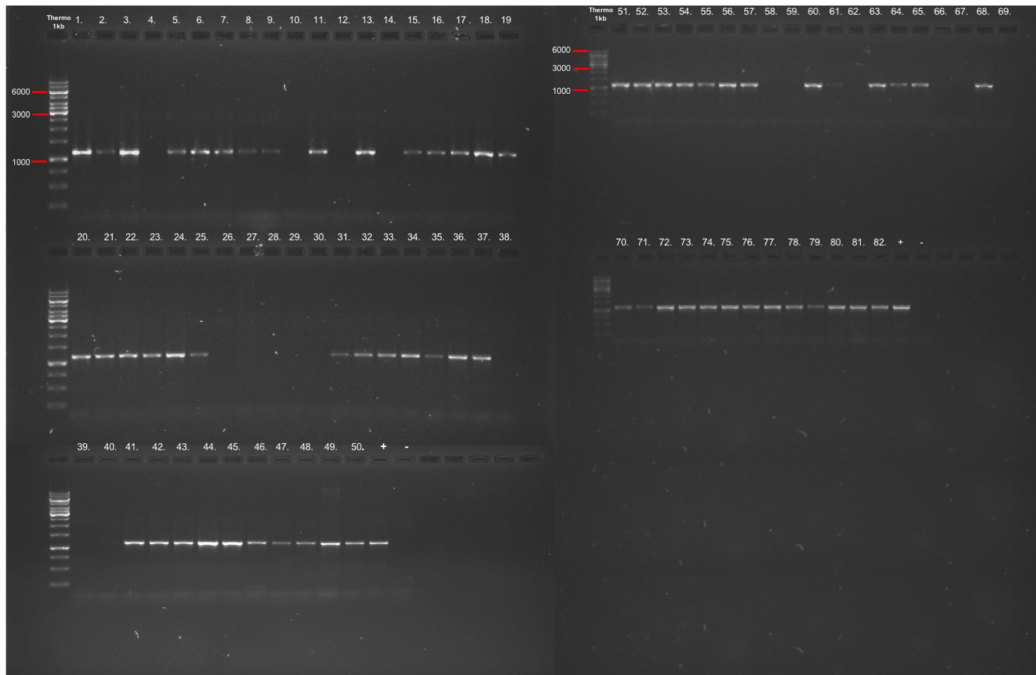


Figura A.2: **Amplificación de aislamientos: Primers Actinobacteria T7-pA - 16SAct1114R.** Electroforesis de agarosa al 1%. Se observan 61 amplificaciones correspondientes a actinobacterias incluyendo el control positivo; 5 aislamientos se encuentran repetidos en el gel. (Ver anexos: Tabla 2)

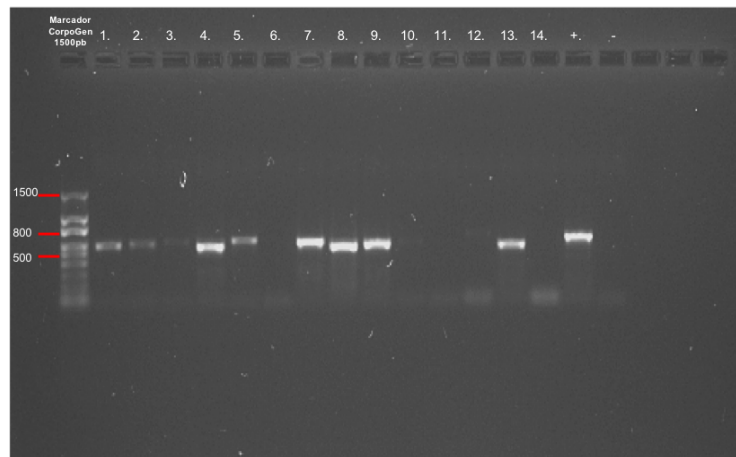


Figura A.3: **Amplificación de aislamientos: Primers hongos: ITS5-ITS4 .** Electroforesis de agarosa al 1%. Se observan 12 amplificaciones correspondientes a hongos incluyendo el control positivo. Las muestras 3, 10 y 12 se observan tenuemente. (Ver anexos: Tabla 3).

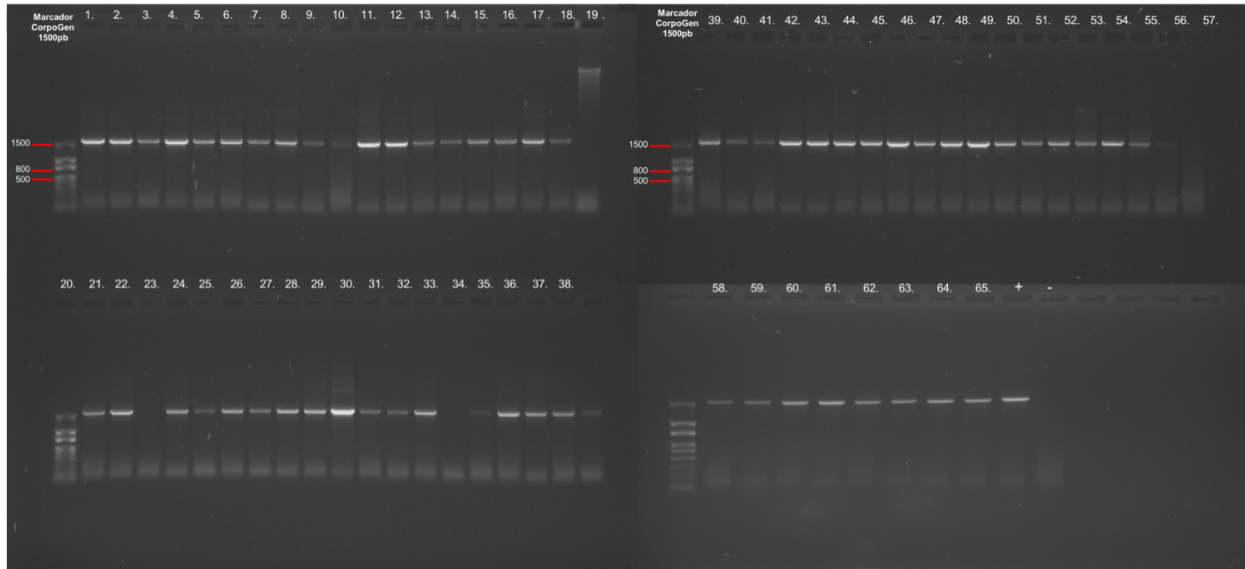


Figura A.4: **Amplificación 16SrRNA de aislamientos: Primers 27F y 1492R.** Electroforesis de agarosa al 1% de aislamientos correspondientes a Bacterias y Actinobacterias aisladas a partir de líquenes. (Ver Anexos:Tabla 4)

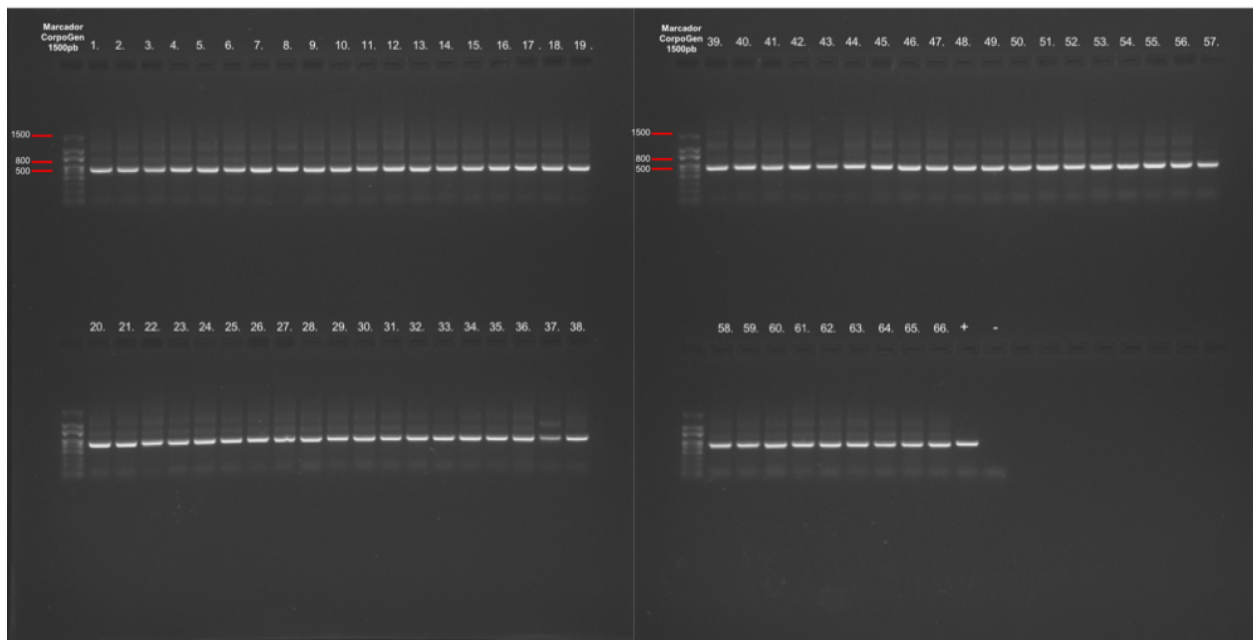


Figura A.5: **Librería de amplicones gen 16SrARN.** Electroforesis de agarosa a 1.5% de amplicones de la regiones hipervariables V3-V4 del gen ribosomal 16S. (Ver Anexos:Tabla 5)

Apéndice B- Tablas

Tabla 1: **Tabla de Diversidad y Riqueza generada en Mothur (v 1.30)**. La riqueza de las muestras se evidencia con el número de OTUs observados y el índice de Chao1. La diversidad se calculó con los índices de Shannon, Simpson y Cobertura.

Código PCR	Muestra ¹	PCR Actino	Código PCR	Muestra ¹	PCR Actino
1	A3.3	Positivo	42	L3.2	Positivo
2	A3.4	Positivo	43	L3.3	Positivo
3	A4.4	Positivo	44	L3.5	Positivo
4	A5.7	Negativo	45	L3.6	Positivo
5	A5.8	Positivo	46	L3.8	Positivo
6	B1.1	Positivo	47	L3.9	Positivo
7	B1.2	Positivo	48	N3.10	Positivo
8	C1.7	Positivo	49	N4.6	Positivo
9	C1.8	Positivo	50	N4.7	Positivo
10	C1.9	Negativo	51	A1.4	Positivo
11	C3.17	Positivo	52	A4.5	Positivo
12	C3.18	Negativo	53	B1.1*	Positivo
13	C3.18	Positivo	54	B1.2*	Positivo
14	C3.23	Negativo	55	C1.1	Positivo
15	C3.24	Positivo	56	C3.19	Positivo
16	C3.25	Positivo	57	C3.21	Positivo
17	D1.10	Positivo	58	C3.23*	Negativo
18	D1.5	Positivo	59	D1.8	Negativo
19	D1.6	Positivo	60	D1.11	Positivo
20	D1.7	Positivo	61	D1.12	Positivo
21	E2.3*	Positivo	62	E2.3	Negativo
22	E2.6	Positivo	63	E2.4	Positivo
23	E2.8	Positivo	64	E2.5	Positivo
24	E2.9	Positivo	65	E2.7	Positivo
25	G1.4	Positivo	66	G1.1	Negativo
26	G2.2	Negativo	67	G1.2	Negativo
27	H1.1	Negativo	68	G2.1	Positivo
28	H2.1	Negativo	69	G2.3	Negativo
29	H2.2	Negativo	70	H2.3	Positivo
30	H3.11	Negativo	71	H3.6	Positivo
31	H3.12	Positivo	72	H3.7	Positivo
32	H3.15	Positivo	73	H3.8	Positivo
33	H3.17	Positivo	74	H3.10	Positivo
34	H3.18	Positivo	75	H3.13	Positivo
35	H3.19	Positivo	76	H3.14	Positivo
36	H3.9	Positivo	77	H3.16	Positivo
37	I1.1	Positivo	78	N4.4	Positivo
38	L2.1	Negativo	79	N4.8	Positivo
39	L1.3	Negativo	80	N4.9	Positivo
40	L2.1	Positivo	81	N4.9*	Positivo
41	L3.10	Positivo	82	L3.7	Positivo

Tabla 2: Lista de aislamientos amplificados con primers de Actinobacteria. ¹Muestra: Nombre de los aislamientos codificados dependiendo del líquen del que fueron aislados. Los nombres con asterisco representan las muestras repetidas en el gel. En gris se destacan las muestras no amplificadas.

Código PCR	Muestra	PCR ITS
1	A5.7	Positivo
2	C1.9	Positivo
3	G1.1	Positivo
4	C3.18	Positivo
5	G1.2	Positivo
6	G1.4	Negativo
7	G2.3	Positivo
8	H1.1	Positivo
9	H2.2	Positivo
10	H3.11	Positivo
11	H3.18	Negativo
12	L1.2	Positivo
13	L1.3	Positivo
14	L2.1	Negativo

Tabla 3: Lista de aislamientos amplificados con primers de hongos. En gris se resaltan las muestras no amplificadas.

Código PCR	Muestra	PCR Actino	Código PCR	Muestra	PCR Actino
1	A1.4	Positivo	34	H3.12	Positivo
2	A3.3	Positivo	35	H3.13	Positivo
3	A3.4	Positivo	36	H3.14	Positivo
4	A4.4	Positivo	37	H3.15	Positivo
5	A4.5	Positivo	38	H3.17	Positivo
6	B1.1	Positivo	39	H3.18	Positivo
7	B1.2	Positivo	40	H3.19	Positivo
8	C1.1	Positivo	41	H3.6	Positivo
9	C1.7	Positivo	42	H3.7	Positivo
10	C1.8	Positivo	43	H3.8	Positivo
11	C3.19	Positivo	44	H3.9	Positivo
12	C3.20	Positivo	45	L3.10	Positivo
13	C3.21	Positivo	46	L3.2	Positivo
14	C3.24	Positivo	47	L3.3	Positivo
15	C3.25	Positivo	48	L3.5	Positivo
16	D1.10	Positivo	49	L3.6	Positivo
17	D1.11	Positivo	50	L3.7	Positivo
18	D1.12	Positivo	51	L3.9	Positivo
19	D1.5	Positivo	52	N3.10	Positivo
20	D1.6	Positivo	53	N4.4	Positivo
21	D1.8	Positivo	54	N4.7	Positivo
22	E2.3	Negativo	55	N4.8	Positivo
23	E2.4	Positivo	56	G1.4	Positivo
24	E2.5	Positivo	57	L2.1	Negativo
25	E2.6	Positivo	58	A5.8	Positivo
26	E2.7	Positivo	59	H3.16	Positivo
27	E2.8	Positivo	60	C3.17	Positivo
28	G2.1	Positivo	61	D1.7	Positivo
29	G2.2	Positivo	62	I2.1	Positivo
30	H2.1	Positivo	63	L3.8	Positivo
31	H2.3	Positivo	64	N4.9	Positivo
32	H3.10	Positivo	65	E2.9	Positivo
33	H3.11	Negativo			

Tabla 4: Lista de amplificados con primers universales de Bacteria. En gris se destacan las muestras no amplificadas.

Código PCR	Muestra	Código PCR	Muestra
1	Control A1	34	Liquen A3
2	Control A3	35	Liquen A4
3	Control A4	36	Liquen A5
4	Control A5	37	Liquen B1
5	Control B1	38	Liquen B2
6	Control B2	39	Liquen C1
7	Control C1	40	Liquen C2
8	Control C2	41	Liquen C3
9	Control C3	42	Liquen D1
10	Control D1	43	Liquen E1
11	Control E1	44	Liquen E2
12	Control E2	45	Liquen F1
13	Control F1	46	Liquen G1
14	Control G1	47	Liquen G2
15	Control G2	48	Liquen G3
16	Control G3	49	Liquen G4
17	Control H1	50	Liquen H1
18	Control H2	51	Liquen H2
19	Control H3	52	Liquen H3
20	Control I1	53	Liquen I1
21	Control J1	54	Liquen J1
22	Control J2	55	Liquen J2
23	Control K1	56	Liquen K1
24	Control K2	57	Liquen K2
25	Control K3	58	Liquen K3
26	Control L1	59	Liquen L1
27	Control L2	60	Liquen L2
28	Control L3	61	Liquen L3
29	Control M1	62	Liquen M1
30	Control N3	63	Liquen N1
31	Control N4	64	Liquen N2
32	Liquen A1	65	Liquen N3
33	Liquen A2	66	Liquen N4

Tabla 5: Librería del gen 16SARNr. Los líquenes A2, y G4, no tienen control por su morfología crustácea y lugar de crecimiento.

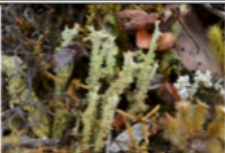





Liquen	Foto	Cepa	Patógeno		
			<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Cladonia</i>		A4.4	x	x	
		A4.5	x	x	
<i>Peltigera</i>		C3.20	x	x	
		C3.21	x	x	
<i>Everniastrum</i>		G2.1		x	
<i>Cora</i>		I1.1			x
<i>Cora</i>		H2.1	x		
		H2.2		x	
<i>Hypotrachyna</i>		H3.9			x
		H3.11	x		x
		H3.12	x		
		H3.13	x	x	
		H3.14	x	x	
		H3.16	x	x	
		H3.17	x	x	
		H3.18	x	x	
		H3.19	x	x	

Tabla 6: Aislamientos de líquenes con actividad antimicrobiana. Se marcan con una X los patógenos contra los cuales las cepas tuvieron actividad.