

CAPACIDAD DE FIJACION DE NITROGENO DE LOS FICOBIONTES
AISLADOS DE LIQUENES DEL GENERO LEPTOGIUM S. GRAY

Doraliza Tovar T.*

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la capacidad de fijación del nitrógeno atmosférico de los ficobiontes *Nostoc commune* Vaucher, *Nostoc pruniforme* Agardh, *Nostoc muscorum* Agardh; aislados de los líquenes *Leptogium menziesii*, *Leptogium mandonii*, *Leptogium ptylocarpum* y *Leptogium acutisporum*, respectivamente.

Se evaluó la capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico de los ficobiontes utilizando fuentes de nitrógeno ricas en nutrientes (BBM), pobres (STARR) y sin nutrientes (AGAR), considerando los siguientes parámetros:

- Análisis cuantitativo del crecimiento colonial
- Evaluación de la cantidad de heterocistos
- Determinación del nitrógeno total (proteína total) por el método Micro Kjeldahl

Los resultados demuestran que todos los ficobiontes crecieron en medios sin nitrógeno, exhibiendo mejor crecimiento en el medio BBM y el más pobre crecimiento en el medio STARR con nitrógeno. La cantidad media de

* Pontificia Universidad Católica del Perú. Sección Química. Dpto. de Ciencias

heterocistos en medios sin nitrógeno (\bar{x} : 19.15) fue significativamente mayor que aquellos en medios con nitrógeno (\bar{x} : 1.63). Esta diferencia fue más evidente para el caso de los ficobiontes en medio AGAR sin nutrientes (\bar{x} : 25.75). El contenido promedio de proteína total fue mayor en *Nostoc commune* (\bar{x} : 34.46%) en relación a *N. pruniforme* (\bar{x} : 17.50%) y *N. muscorum* (\bar{x} : 18.77%). Los ficobiontes *Nostoc pruniforme* y *N. muscorum* tuvieron similar contenido de proteína en medios con y sin nitrógeno.

En base al crecimiento colonial del ficobionte, mayor cantidad de heterocistos y alto contenido de proteína total hallados en medios de cultivo sin nitrógeno, los ficobiontes aislados de los líquenes estudiados pueden ser considerados como organismos fijadores de nitrógeno atmosférico.

INTRODUCCION

Los líquenes del género *Leptogium* S. Gray están constituidos por hongo (micobionte) y alga (ficobionte) del género *Nostoc*, que viven en interacción morfofisiológica, considerándose como un sistema simbiótico. Los líquenes, en comparación a otros grupos de plantas, son muy resistentes a condiciones ambientales severas, resisten amplios períodos de desecación en estado latente y forman costras características en la superficie de diversos habitat, proporcionando muchos beneficios a los ecosistemas áridos y semiáridos, especialmente los líquenes fijadores de nitrógeno atmosférico que constituyen la fuente principal de ingreso de este elemento.

De las 18,000 especies de líquenes conocidos, sólo el 8% contienen algas azul-verdes fijadoras de nitrógeno atmosférico. Ahjadjian (1967) cita 8 géneros de cianofitas como ficobiontes. En las algas de los géneros *Nostoc* y *Calothrix* se ha demostrado que fijan nitrógeno mediante el uso de técnicas de incorporación de nitrógeno radiactivo o reducción del acetileno.

Fay et. al. (1973) propusieron la hipótesis de que los heterocistos (célula vegetativa de las cianofitas) son los lugares de fijación de nitrógeno y demostraron que el 30% de la proteína total del heterocisto es nitrogenasa (enzima que convierte el nitrógeno atmosférico en amonio) representando aproximadamente el 10% de la materia seca. La primera evidencia de la actividad enzimática de la nitrogenasa en heterocistos usando la técnica de reducción del acetileno fue reportada por Stewart (1973).

Las algas fijadoras de nitrógeno prefieren condiciones de baja tensión de oxígeno, y altos niveles de este gas inhiben la fijación. Además, en el talo del

liquen la respiración del hongo (micobionte) puede limitar la acumulación de oxígeno. Este fenómeno puede explicar parcialmente las altas velocidades de fijación de nitrógeno y otros procesos metabólicos producidos por el alga (ficobionte) en estado simbiótico.

La necesidad de la producción de alimentos, especialmente proteínas, incremento del costo de los fertilizantes nitrogenados, así como el mejoramiento de los suelos y conservación de los recursos naturales, constituyen factores que llevan a investigar en sistemas vivientes fijadores de nitrógeno, como es el caso de los líquenes.

PARTE EXPERIMENTAL

En el presente estudio se utilizaron ficobiontes del género *Nostoc* aislados de líquenes del género *Leptogium* S. Gray.

Los medios de cultivo empleados para el crecimiento de los ficobiontes, tuvieron la siguiente composición, según la Tabla 1.

Tabla 1 Composición de los medios de cultivo empleados para los ficobiontes de los líquenes del género *Leptogium* S. Gray

Basal de Bold (BBM)	Basal de Bold modif. (BBM sin N)	STARR	STARR modificado (STARR sin N)	AGAR
NaNO ₃ CaCl ₂ .2H ₂ O MgSO ₄ .7H ₂ O K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ NaCl EDTA.KOH FeSO ₄ .7H ₂ O H ₃ BO ₄ Micronutrientes* Agua destilada Agar - Agar pH 6.2	— CaCl ₂ .2H ₂ O MgSO ₄ .7H ₂ O K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ NaCl EDTA.KOH FeSO ₄ .7H ₂ O H ₃ BO ₄ Micronutrientes* Agua destilada Agar - Agar pH 6.35	KNO ₃ K ₂ HPO ₄ MgSO ₄ .7H ₂ O Citrato férrico de amonio Agua destilada Agar - Agar pH 6.9	— K ₂ HPO ₄ MgSO ₄ .7H ₂ O Citrato férrico Agua destilada Agar - Agar pH 7.2	Sin nutrientes Agua destilada Agar - Agar pH 6.8

Micronutrientes* = ZnSO₄.7H₂O; MnCl₂.4H₂O; MoO₃.CuSO₄.5H₂O; Co(NO₃)₂.6H₂O

Para evaluar la capacidad de fijación de nitrógeno, se consideró los siguientes parámetros:

- Crecimiento y desarrollo de la colonia del ficobionte. Para lo cual se describieron y midieron las colonias mediante un microscopio estereoscópico.
- Determinación de la cantidad de heterocistos de los tricomas de las colonias cultivadas en los diferentes medios de cultivo. Se evaluó por conteo el número de heterocistos por cada 100 células vegetativas en cultivos de un mes de crecimiento.
- Determinación de nitrógeno total, por el método Micro Kjeldahl.

Para analizar e interpretar los resultados obtenidos, se utilizó la técnica estadística de Análisis de la Varianza y las dúcimas adicionales de Rango Múltiple de Duncan y Tukey.

RESULTADOS

Las capacidad de fijación de nitrógeno de los ficobiontes se evaluó utilizando medios de cultivo con nitrógeno y sin nitrógeno de un mes de crecimiento, según los parámetros siguientes:

- Análisis cualitativo del crecimiento colonial (Fig. 1).
- Evaluación de la cantidad media de heterocistos (Tabla 2, Lámina 1).
- Determinación del nitrógeno total (Tabla 2, Lámina 2).

Los resultados obtenidos se discuten a continuación para cada ficobionte.

Nostoc commune Vaucher

Nostoc commune ficobionte de *Leptogium menziesii* (Fig. 2) presentó colonias de forma esférica u ovoide y de textura lisa en todos los medios de cultivo empleados, con excepción del medio STARR. En este medio las colonias son de menor tamaño, de forma irregular y de textura rugosa costrosa (Fig. 3).

En el medio *BBM* que tiene como fuente nitrogenada nitratos (NO_3^- : 0.0029M), además de otros nutrientes como hierro y molibdeno componentes de la enzima nitrogenasa (Fogg, 1973), el crecimiento colonial del *Nostoc commune* fue abundante y óptimo.

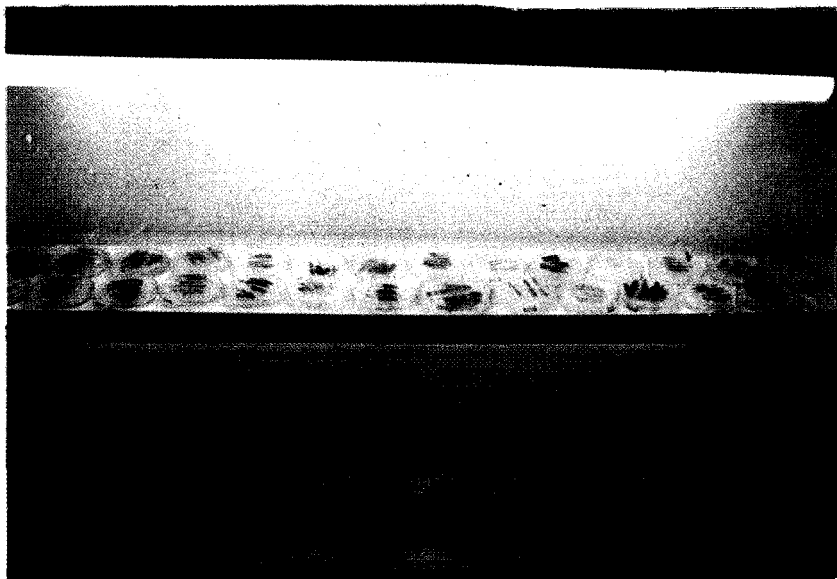


Fig. 1 Placas y tubos con cepas del ficobionte *Nostoc* aislado de líquenes del género *Leptogium*

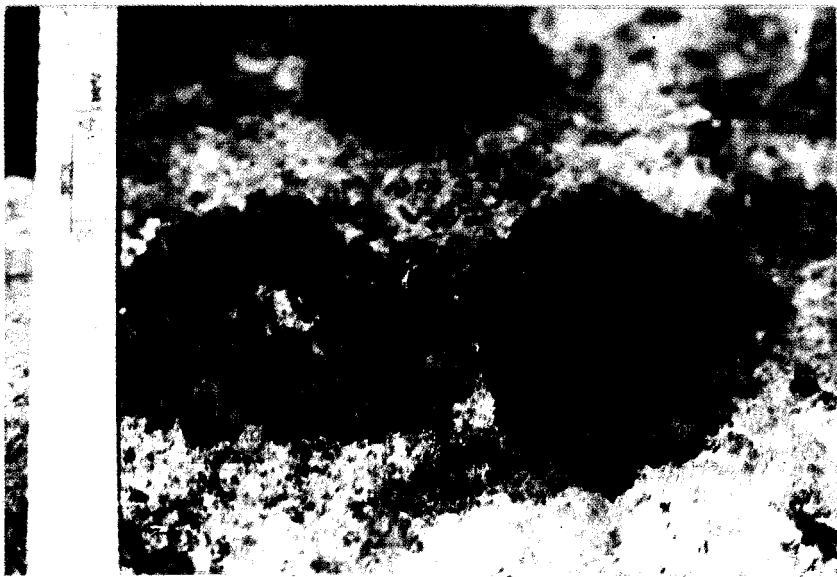


Fig. 2 *Leptogium menziesii* (Ach.) Mont. habitat natural: tierra musgosa

Los heterocistos de *Nostoc commune* fueron pequeños y escasos (\bar{x} : 2.6 (Tabla 2). Esta baja diferenciación de heterocistos se explica debido a que *N. commune* en este medio no necesita fijar nitrógeno atmosférico ya que le es suficiente el nitrógeno del medio de cultivo (Fig. 4).

El contenido medio de proteína total en el medio BBM fue de 40.327% (Tabla 3), valor que se considera alto en relación a los otros medios de cultivo. Estos resultados justificarían el mejor crecimiento y desarrollo algal de *N. commune* en el medio BBM.

En el medio **BBM sin nitrógeno**, el crecimiento colonial de *Nostoc commune* fue ligeramente menor que en el medio BBM. Al inicio del crecimiento (primera semana) las colonias mostraron un color amarillento que posteriormente se torna color verde.

Los heterocistos en este medio carente de nitrógeno son abundantes (\bar{x} : 19.6, Tabla 2, Fig. 5) y de mayores dimensiones, e incluso se observaron heterocistos en cadena. Estas características morfológicas se explican debido a que la deficiencia de nitrógeno en el medio en un principio causó una baja pigmentación de la colonia, la que posteriormente, con la mayor diferenciación de heterocistos retornó a su coloración verde -azulado. Por lo tanto, el nitrógeno atmosférico captado por los heterocistos sirve para suplir los requerimientos de síntesis de pigmentos y proteínas. El contenido medio de proteína total en el medio BBM sin nitrógeno fue de 29.56% (Tabla 3), menor que en el medio BBM con nitrógeno.

El buen crecimiento colonial, mayor cantidad de heterocistos y contenido de proteínas en este medio carente de nitrógeno, demuestra que el ficobionte *Nostoc commune* es eficiente y tiene la capacidad de sobrevivir obteniendo nitrógeno atmosférico.

En el medio **STARR** que contiene iones nitrato (0.049 M) y amonio (0.05M) *Nostoc commune* presentó un crecimiento colonial pobre. Las colonias fueron pequeñas, de aspecto costroso, irregulares y opacas (Fig. 3). Esto sugiere que la concentración elevada de nitrógeno en el medio puede producir inhibición en diversos procesos metabólicos, basándonos en que varios autores han postulado que el amonio origina un menor crecimiento algal debido a la inhibición de la fotorrespiración (Stewart 1973).

La cantidad media de heterocistos en el medio STARR fue baja, alcanzando sólo \bar{x} : 0.8 (Tabla 2), lo que explicaría que en este medio el ficobionte

Tabla 2 Cantidad de heterocistos (Nº de heretocistos/100 células) por medio de cultivo según tipo de ficobionte. (Un mes de crecimiento)

FICOBIONTE	MEDIOS DE CULTIVO					T	\bar{X}
	BBM		STARR		AGAR		
	con N	sin N	con N	sin N	sin nut.		
<i>Nostoc commune</i>	0	16	0	15	24	352	14.08
	1	19	0	17	26		
	3	20	1	18	30		
	4	22	1	20	32		
	5	21	2	22	33		
	\bar{x}	2.6	19.6	0.8	18.4		
<i>N. pruniforme</i>	0	14	0	17	18	329	13.16
	1	17	0	18	22		
	3	19	1	19	25		
	4	23	2	20	24		
	5	24	2	21	30		
	\bar{x}	2.6	19.4	0.8	19		
<i>N. muscorum</i> (a)	0	15	0	15	20	331	13.24
	1	16	0	18	24		
	2	18	1	20	25		
	3	20	2	23	26		
	4	23	3	22	30		
	\bar{x}	2	18.4	1.2	19.6		
<i>N. muscorum</i> (b)	0	14	0	14	21	334	13.36
	1	16	0	16	23		
	2	18	1	22	24		
	2	21	2	24	28		
	3	24	3	25	30		
	\bar{x}	1.6	18.6	1.2	20.2		
Totales (T)	44	380	21	386	515	1346	
		424		407	515		
Media (\bar{X})	2.2	19	1.05	19.3	25.75		
		10.6		10.18	25.75		16.825

\bar{x} Media aritmética.

N. muscorum (a) Ficobionte de *Leptogium phyllocarpum*.

N. muscorum (b) Ficobionte de *Leptogium acutisporum*.

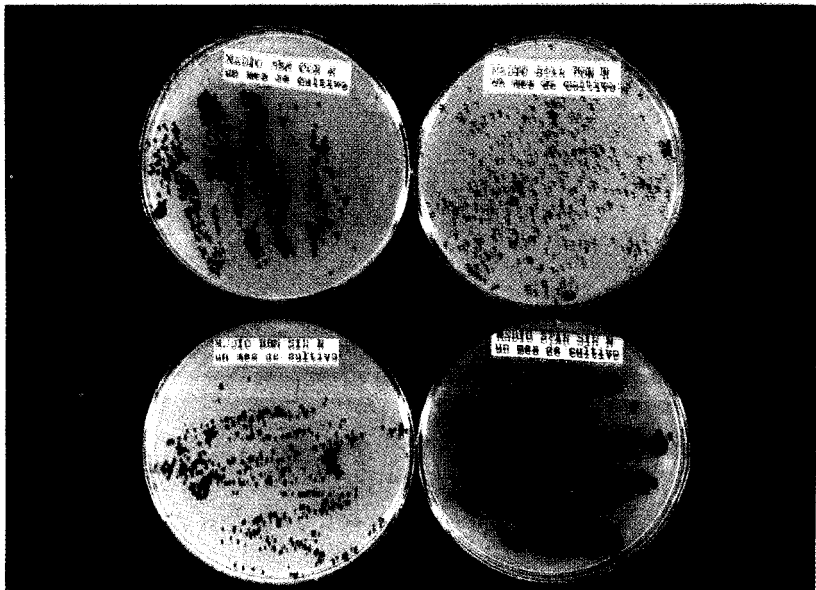


Fig. 3 *Nostoc commune*: colonias aisladas de *Leptogium menziesii* en diferentes medios

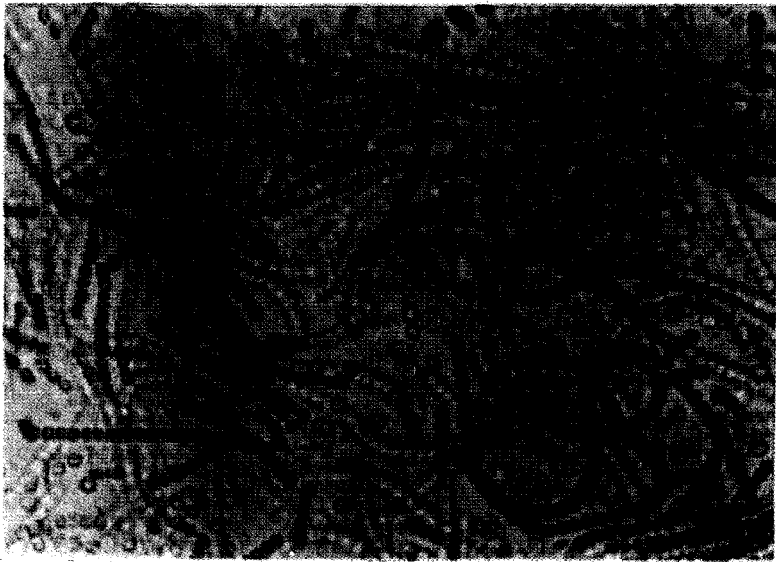
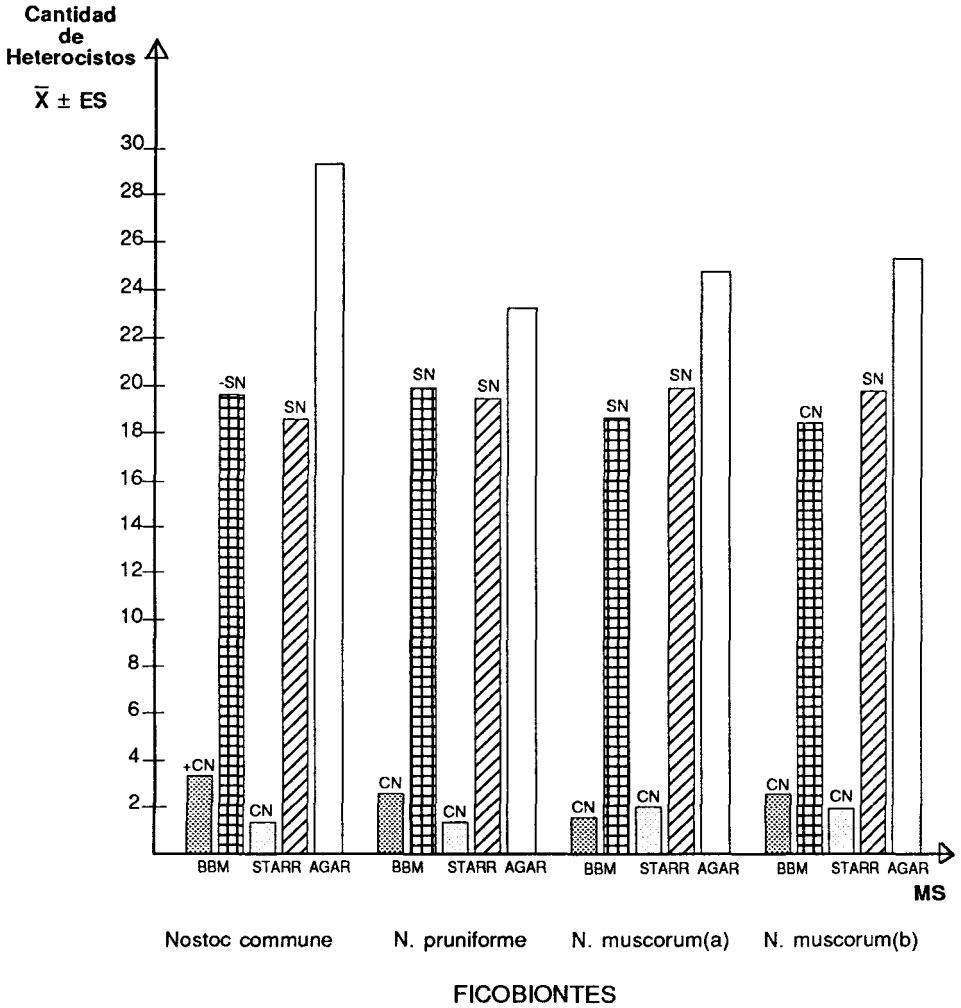


Fig. 4 *Nostoc commune*: tricomas con células vegetativas y algunos heterocistos (h) en medio BBM de 1 mes

Lámina I Cantidad media de heterocistos por medios de cultivo (BBM, STARR, AGAR) según tipo de ficobiontes



no necesita formar heterocistos para fijar nitrógeno atmosférico, ya que utiliza la fuente de nitrógeno del medio de cultivo. También este carácter puede ser atribuido a que los iones nitrato y amonio inhiben la formación de heterocistos (Lazaroff y Vishnic 1962; Grilli 1979).

El contenido medio de proteína total de *Nostoc commune* en el medio STARR fue de 29.49% (Tabla 3), estadísticamente semejante al hallado para el ficobionte creciendo en medio BBM sin nitrógeno, valor que justifica el pobre crecimiento colonial en este medio comparando con el medio BBM (40.327%).

En base a los resultados obtenidos en el medio STARR con una alta concentración de nitrógeno bajo la forma de nitratos y amonio, éste puede no ser un medio adecuado para el ficobionte *Nostoc commune*.

En el medio **STARR sin nitrógeno** se observa un buen crecimiento colonial de *Nostoc commune* (Fig. 3). Al inicio las colonias son de color amarillento para luego tornarse de color verde azulado. Los heterocistos en este medio son abundantes y se presentan en cadenas (\bar{x} : 18.4, Tabla 2). El mejor crecimiento colonial en el medio STARR sin nitrógeno con respecto al medio STARR con nitrógeno corrobora la afirmación dada anteriormente, de que los iones nitrato y amonio estarían inhibiendo el crecimiento colonial. El contenido medio de proteína total de 36.43% (Tabla 3) estimado en el medio STARR sin nitrógeno sustenta esta afirmación. En consecuencia, *Nostoc commune* es capaz de sobrevivir en medios no sólo pobres, sino carentes de nitrógeno, gracias a su mecanismo de captación de nitrógeno localizado en los heterocistos.

En medio **AGAR** en el cual no se adiciona nutrientes se observó un buen crecimiento colonial y la más alta diferenciación de heterocistos (\bar{x} : 29, Tabla 2, Fig. 6) en relación a lo obtenido para los medios de cultivo anteriormente indicados. Estos datos reflejan una compensación a la falta de nutrientes en el medio de cultivo y una forma de incrementar la eficiencia en la utilización de nitrógeno atmosférico, que se evidenció por el elevado contenido medio de proteína total de 36.47% (Tabla 3).

Nostoc pruniforme Agardh

Nostoc pruniforme ficobionte de *Leptogium mandonii* presentó en todos los medios de cultivo utilizados, forma esférica de borde entero o lobulado, de aspecto lustroso y de consistencia gelatinosa.

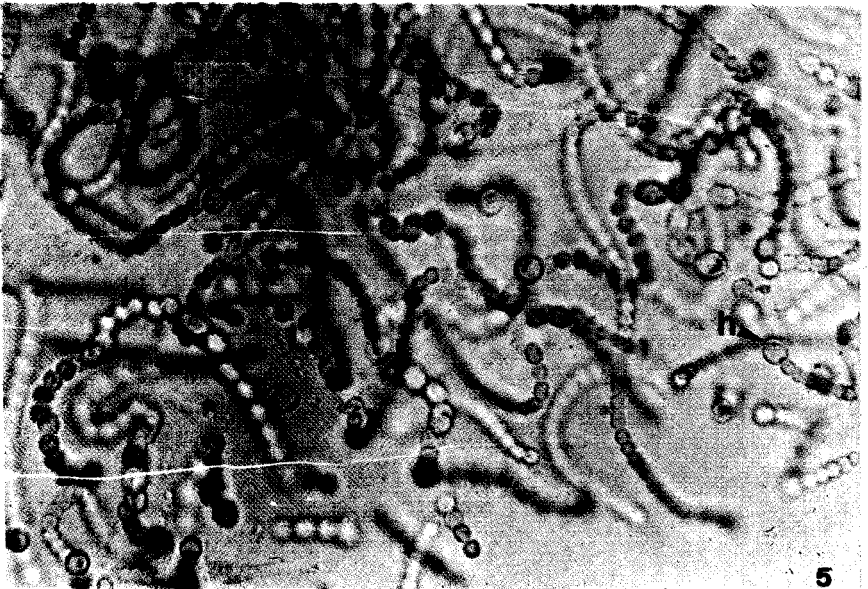


Fig. 5 *Nostoc commune*: tricomas con abundantes heterocistos en medio BBM sin nitrógeno

5

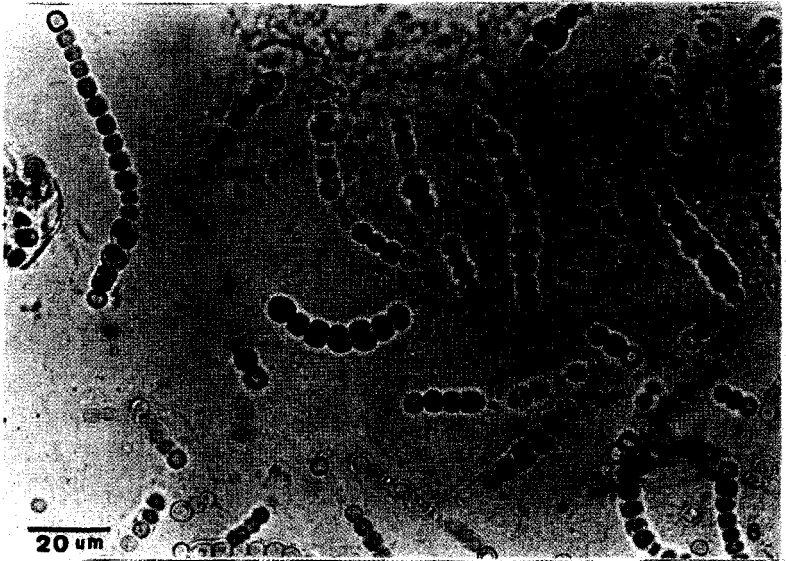


Fig. 6 *Nostoc commune*: formación de acinetos(a) en cadenas y numerosos heterocistos terminales en medio AGAR sin nutrientes

20 μ m

Nostoc muscorum Agardh

Nostoc muscorum ficobionte de los líquenes *Leptogium phylloclarpum* y *L. acutisporum*, en cultivo presentó forma esférica sólo al inicio de su crecimiento; posteriormente fueron irregulares, rugosas, tuberculadas de consistencia coriácea membranosa en todos los medios de cultivo.

N. muscorum mostró un crecimiento colonial similar en todos los medios, sin embargo en el medio STARR las colonias fueron más pequeñas.

La evaluación estadística de los resultados obtenidos en los ficobiontes aislados de los líquenes del género *Leptogium* nos indica:

- Que la cantidad media total de heterocistos es similar para los ficobiontes *Nostoc commune*, *N. pruniforme* y *N. muscorum* (Tabla 2, Lámina I).
- Que la cantidad media de heterocistos en medios con nitrógeno resulta ser significativamente inferior a la cantidad media de heterocistos en medios sin nitrógeno (Tabla 2, Lámina I).
- Que el contenido medio de proteína total es mayor en el ficobionte *Nostoc commune* con respecto a los demás ficobiontes (Tabla 3, Lámina II).
- Que los ficobiontes *Nostoc muscorum* (a) y *N. muscorum* (b) aislados de los líquenes *L. phylloclarpum* y *L. acutisporum* respectivamente, son estadísticamente similares en cuanto a la producción media de heterocistos y contenido medio de proteína total.

De acuerdo a estos resultados podemos decir que *N. commune*, *N. pruniforme* y *N. muscorum*, ficobiontes de *Leptogium menziesii*, *L. mandonii*, *L. phylloclarpum* y *L. acutisporum* respectivamente, crecen en todos los medios de cultivo utilizados y no necesitan especiales requerimientos nutricionales para cumplir su ciclo vital. La presencia de heterocistos en medios sin nitrógeno jugaría un rol importante en la fijación de nitrógeno y por tanto favorecería el desarrollo integral del ficobionte.

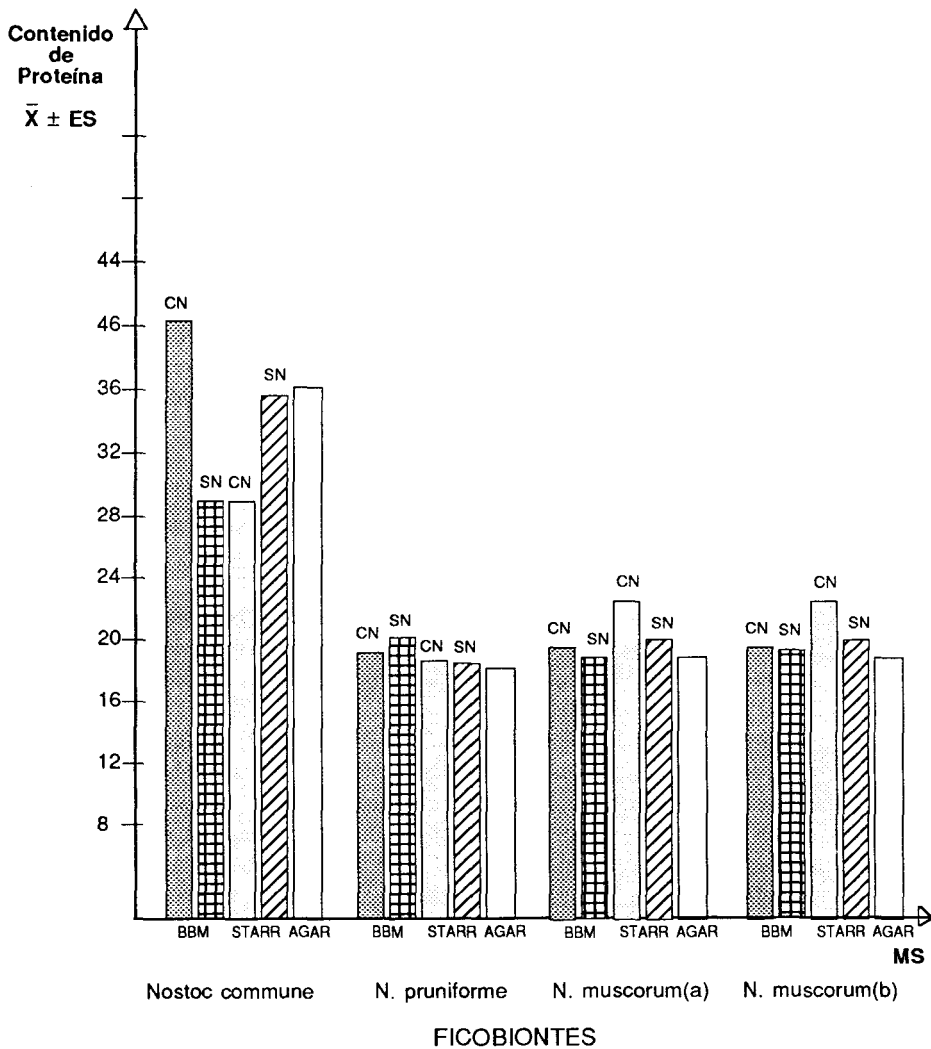
A juzgar por los resultados experimentales, las propiedades del ficobionte *Nostoc* y, en conjunto del líquen *Leptogium*, se podrían utilizar como una alternativa para el abonamiento de tierras estériles. Por otra parte, el contenido significativo de proteína total obtenido tanto en el ficobionte como en el líquen nos hace pensar que podrían utilizarse en la alimentación o como fuente de obtención de proteínas.

Tabla 3 Contenido de proteína total (g/100g de *Nostoc* seco) por medio de cultivo según tipo de ficobionte (Un mes de crecimiento)

FICOBIONTE	MEDIOS DE CULTIVO					T	\bar{X}
	BBM		STARR		AGAR		
	con N	sin N	con N	sin N	sin nutr.		
<i>N. commune</i>	40.33	29.31	29.13	36.75	36.31	516.84	34.456
	40.25	29.47	29.89	36.15	36.42		
	40.40	29.90	29.45	36.40	36.68		
	\bar{x}	40.33	29.56	29.49	36.47		
<i>N. pruniforme</i>	17.93	18.81	17.06	17.06	16.18	262.47	17.498
	18.20	18.54	17.45	17.23	16.25		
	17.65	18.08	17.60	17.65	16.78		
	\bar{x}	17.93	18.48	17.37	17.31		
<i>N. muscorum</i> (a)	18.46	16.62	22.31	18.81	17.06	279.42	18.628
	18.02	17.40	21.05	18.45	16.89		
	17.42	17.98	22.56	18.94	17.45		
	\bar{x}	17.97	17.33	21.97	18.73		
<i>N. muscorum</i> (b)	17.93	17.93	23.18	19.25	19.25	283.74	18.916
	18.10	17.76	22.31	19.17	17.28		
	17.65	17.62	21.05	18.20	17.06		
	\bar{x}	17.89	17.77	22.18	18.87		
TOTALES (T)	282.34	249.42	273.04	274.06	263.61	1342.47	
		531.76		547.1	263.61		
MEDIAS	23.5283	20.785	22.7533	22.8383	21.9675		
		22.1567		22.7958	21.9675		

\bar{X} = Media aritmética

Lámina II Contenidos medio de proteína total (g/100g de *Nostoc* seco) por medios de cultivo (BBM, STARR, AGAR) según tipo de ficobiontes



CONCLUSIONES

- El medio de cultivo Basal de Bold (BBM) resultó ser adecuado para el crecimiento del ficobionte *Nostoc*, a diferencia del medio STARR que mostró ser el menos eficiente.
- En medios de cultivo sin nitrógeno todos los ficobiontes crecieron y mostraron diferenciación de heterocistos.
- La frecuencia de heterocistos varía dentro de una misma especie de acuerdo a la presencia o ausencia de fuente de nitrógeno en el medio de cultivo.
- El valor promedio de heterocistos (\bar{x} : 19.25) en medios sin nitrógeno es significativamente mayor que aquél estimado para los medios con nitrógeno (x : 1.63). En el medio AGAR sin nutrientes (\bar{x} : 25.75) la cantidad media de heterocistos es altamente significativo si se compara con los otros medios de cultivo (BBM: 10.6), STARR: 10.18). Por consiguiente, los heterocistos son estructuras fijadoras de nitrógeno atmosférico que favorecen el crecimiento del ficobionte *Nostoc* en medios pobres o carentes de nitrógeno.
- El valor medio porcentual de proteína total fue mayor en el ficobionte *Nostoc commune* (\bar{x} : 34.47%), comparado con el obtenido para *Nostoc pruniforme* (\bar{x} : 17.50) y *Nostoc muscorum* (\bar{x} : 18.77).
- El contenido medio de proteína total similar en medios con y sin nitrógeno para los ficobiontes *Nostoc pruniforme* y *Nostoc muscorum* indican que estas especies son eficientes fijadoras de nitrógeno atmosférico.

Por las conclusiones, se puede considerar la potencialidad que significa el recurso natural de los líquenes, en la recuperación de tierras infértiles y aun estériles para los cultivos, así como tener una nueva fuente para la obtención de proteínas. Estas aplicaciones en forma conjunta permitirán un incremento en la producción y consecuentemente aliviar en algo el problema alimentario.

REFERENCIAS

1. Ahjadjian, V. (1967). A guide to the algae occurring as lichen symbionts: isolation, culture, cultural physiology, and identification. *Phycologia*, 6 (2/3): 128-155.
2. Fay, P. (1973). The Heterocyst. En **The Biology of Blue Green Algae**, N.G. Carr & B.A. Whitton, eds. 9: 239-259. Bot. Monograph, University of California.
3. Grilli Caiola M. (1979). The influence of different nitrogen compounds on Nostoc morphology. *Ann. Microbiol.* 29: 49-59.
4. Lazaroff'N., and Vishniac W. (1962). The participation of filament anastomosis in the developmental cycle of Nostoc muscorum, a Blue Green Alga. *J. Gen. Microbiol.* 28: 203-210.
5. Stewart, W. (1973). Nitrogen Fixation. En **The Biology of Blue Green Algae**. N.G. Carr & B.A. Whitton eds. 9: 261-277. Bot. Monograph. University of California.

REFERENCIAS COMPLEMENTARIAS

1. Asahina, Y. and S. Shira (1954). **Chemistry of Lichen Substances**. A. Asher and Co Ltd., Valls-Amsterdam. 96 pp.
2. Awasthi D., P. Akhtar (1977). The genus Leptogium (Sect. Mallotium). *India. Norw. J. Bot.* 24: 59-71.
3. Bateman, J. (1970). **Nutrición Animal. Manual de Métodos Analíticos**. Herrero Hermanos S.A., México, 151-181.
4. Robinson, B. and J. Miller (1970). Photomorphogenesis in the blue green alga Nostoc commune. *Physiologia Plantarum*, 23, 461-472.
5. Bornet, E. et. Ch. Flahault (1959). Revision des Nostocacees Heterocystees. *Ann. Sci. Nat. París, Ser 7.7*, 180-223.
6. Burris, R. (1974). The Biology of Nitrogen Fixation. En **Methodology**. A. Quispel, ed. 2: 10-33 North, Holland American.

7. Calzada Benza J. (1970). **Métodos Estadísticos para Investigación.** Jurídica S.A. Lima, 365 pp.
8. Culberson, C. (1969). **Chemical and Botanical Guide to Lichen Products.** Univ. of North Carolina Press, Chapel Hill. 320 pp.
9. Fogg, F., W. Stewart, P. Fay, and Walsby (1973). **The Ecology of Nitrogen Fixation by Algal in the blue-green Algae.** Academic Press. London 16: 323-348.
10. Grilli, M. and S. Pellegrini (1980). The effects of various light intensities on *Nostoc punctiforme* (Kützing). *Caryologia*. 33(1), 69-81.
11. Grilli, M. and L. de Vecchi (1980). Akinete ultrastructural of *Nostoc* species isolated from cycad caralloid roots. *Can. J. Bot.* 58, 2513-2519.
12. Henssen, A., and H. Jahns (1974). **Lichenes, Eine Einführung in die Flechtenkunde.** Georg. Thieme ed. 281 pp.
13. Horwitz, M., Chichilo P., Reynolds H. (1970). **Officials Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.).**
14. Johansen, D. (1940). **Plant Microtechnique.** Mc Graw Hill Book Co. New York. 336 pp.
15. Jahns, H. (1982). **Guía de Campo de los Helechos, Musgos y Líquenes de Europa.** Omega S.A. Barcelona. 239 pp.
16. Vicente, C. (1975). **Fisiología de las Sustancias Liquénicas.** Alhambra S.A. España, 157 pp.
17. Whitton, B., Donaldson, A., Potts, M. (1979). Nitrogen Fixation by *Nostoc* colonies in terrestrial enviroments of alibaba atoll. Indian Ocean. *Phycology*. 18, (3): 278-287.
18. Zahlbruckner, A. (1922-1940). **Catalogus Lichenum Universalis, Bd. I-X** Borntraeger-Lipzig.
19. Tovar T.D. (1991). Líquenes del género *Leptogium*. **RIMAQ 1**, Escuela de Post Grado, UNEGyV.