

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**“CUANTIFICACIÓN ESPECÍFICA DE BIOMASA EN BIOPELÍCULAS  
FÚNGICAS MIXTAS DE *Trichoderma reesei* y *Aspergillus* spp.  
MEDIANTE PCR CUANTITATIVA”**

Presentada por:

**ALONSO REYES CALDERÓN**

Tesis para Optar el Título Profesional de:

**BIÓLOGO**

Lima – Perú

**2022**

---

La UNALM es la titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación  
(Art. 24. Reglamento de Propiedad Intelectual)

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“CUANTIFICACIÓN ESPECÍFICA DE BIOMASA EN BIOPELÍCULAS  
FÚNGICAS MIXTAS DE *Trichoderma reesei* y *Aspergillus* spp.  
MEDIANTE PCR CUANTITATIVA”**

Presentada por:

**ALONSO REYES CALDERÓN**

Tesis para Optar el Título Profesional de:

**BIÓLOGO**

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

---

Dra. Doris Elizabeth Zúñiga Dávila  
PRESIDENTE

---

Dra. Rosa Amelia Espejo Joya  
MIEMBRO

---

M.Sc. Yvette Ludeña Hinojosa  
MIEMBRO

---

Ph.D. Gretty Katherina Villena Chávez  
ASESORA

---

Dra. Ilanit Samolski Klein  
Co Asesora

## **DEDICATORIA**

Se lo dedico a mi mamá Reina, quien nunca vaciló en apoyarme con su habitual, desvelado y diligente amor. También va para mi hermano Nicanor, que me enseñó que los linderos del cariño y del afecto son de papel. Y para todos mis amigos del LMB, cuyos consejos, compañía y ocurrencias colorearon indeleblemente mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú) por el financiamiento y apoyo brindado para la realización de esta tesis. Contrato N° 191-FINCYT-PNIC-BRI-2015.

A la Dra. Gretty Villena, Directora del Laboratorio de Micología y Biotecnología “Marcel Gutiérrez Correa” y asesora de esta tesis, por confiarme el trabajo y el placer de investigar y aprender en el LMB.

A la Dra. Ilanit Samolski, mi coasesora, por su amistad y enseñanzas que se extienden más allá de lo académico, y por todas las dudas resueltas hasta la consecución de este trabajo.

A mi jurado calificador, el Dr. Víctor Meza Contreras, la Dra. Rosa Espejo Joya y la Dra. Doris Zúñiga Dávila por darse el tiempo de revisar y corregir los contenidos de esta tesis.

A la Sra. María Mary Pasmíño Pezo, técnico del Laboratorio de Micología y Biotecnología de la UNALM, por apoyarme en todo.

Y finalmente al Profesor Marcel Gutiérrez Correa, que en paz descanse, por crear la idea original de esta tesis y por seleccionarme para desarrollarla.

# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	vii
ABSTRACT .....	viii
I. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. OBJETIVO GENERAL .....	2
1.2. ESPECÍFICOS.....	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
2.1. BIOMASA LIGNOCELULÓSICA (BLC).....	3
2.2. CELULASAS .....	4
2.3. HONGOS FILAMENTOSOS PRODUCTORES DE CELULASAS .....	4
2.3.1. <i>Aspegillus niger</i> .....	4
2.3.2. <i>Trichoderma reesei</i> .....	5
2.4. SISTEMAS DE CULTIVO PARA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS CON HONGOS FILAMENTOSOS .....	7
2.4.1. Fermentación por adhesión a superficies.....	7
2.4.2. Fermentación por biopelículas .....	8
2.5. SISTEMAS DE CULTIVOS MIXTOS DE HONGOS FILAMENTOSOS .....	11
2.6. METODOS DE CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA DE HONGOS .....	12
2.7. CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA MEDIANTE qPCR.....	14
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN .....	17
3.2. MICROORGANISMOS .....	17
3.3. FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS FÚNGICAS MIXTAS .....	17
3.4. DETERMINACIÓN DE PESO SECO DE BIOPELÍCULAS .....	18
3.5. DETERMINACIÓN DE LACTOSA RESIDUAL.....	18
3.6. CUANTIFICACIÓN DE ADN TOTAL DE BIOPELÍCULAS FÚNGICAS MEDIANTE EL MÉTODO DE DIFENILAMINA .....	19
3.7. EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE BIOPELÍCULAS FÚNGICAS .....	19

3.8. DISEÑO DE CEBADORES PARA qPCR .....	20
3.9. ELABORACIÓN DE CURVAS ESTÁNDAR DE qPCR.....	20
3.10. ELABORACIÓN DE CURVAS ESTÁNDAR DE EXTRACCIÓN DE ADN .....	21
3.11. CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA DE BIOMASA MEDIANTE qPCR .....	21
3.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS .....	22
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	23
4.1. FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS MIXTAS DE <i>T. reesei</i> Y <i>A. niger</i> .....	23
4.2. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE BIOPELÍCULAS MIXTAS DE <i>T. reesei</i> Y <i>A. niger</i> .....	27
4.3. CORRELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACION DE ADN Y CANTIDAD DE BIOMASA MEDIANTE EL MÉTODO DE DIFENILAMINA .....	29
4.4. DISEÑO Y SELECCIÓN DE CEBADORES PARA qPCR .....	30
4.5. CONSTRUCCIÓN DE CURVAS ESTÁNDAR DE EXTRACCIÓN DE ADN Y DE CALIBRACIÓN DE qPCR.....	36
4.5.1. CURVAS ESTÁNDAR DE qPCR .....	36
4.5.2. CURVAS ESTÁNDAR DE EXTRACCIÓN DE ADN .....	41
4.6. CUANTIFICACIÓN ESPECÍFICA DE BIOMASA MIXTA DE <i>A. niger</i> Y <i>T. reesei</i> MEDIANTE qPCR.....	43
V. CONCLUSIONES .....	48
VI. RECOMENDACIONES .....	49
VII. BIBLIOGRAFÍA .....	50
VIII. ANEXOS .....	68

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Curva estándar de qPCR para determinar la cantidad de ADN en biomasa fúngica .....	21
Tabla 2: Secuencias de cebadores usados en este trabajo. Se eligieron los cebadores que dieron positivo en la prueba de especificidad .....	34
Tabla 3: Curvas estándar de qPCR con diluciones de ADN de cinco ordenes de magnitud para determinación de biomasa fúngica .....	39
Tabla 4: Rendimientos de extracción de ADN a partir de micelio de biopelículas.....	42
Tabla 5: Porcentaje de abundancia relativa de <i>A. niger</i> y <i>T. reesei</i> en biopelículas mixtas .....	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cadenas de conidios de <i>A. niger</i> sobre un conidióforo .....	5
Figura 2. Conidióforos, fiálides y conidios de <i>T. reesei</i> .....	6
Figura 3. Comparación entre velocidad de agitación y soporte utilizado en biopelículas mixtas de <i>A. niger</i> y <i>T. reesei</i> a las 120 horas de crecimiento.. .....	24
Figura 4. Biopelículas mixtas de <i>A. niger</i> y <i>T. reesei</i> a 120 horas de crecimiento bajo el tratamiento (A) Tela, 120 rpm; (B) Fibra, 120 rpm; (C) Tela, 175 rpm y (D) Fibra, 175 rpm. Biopelículas individuales a 72 horas de crecimiento (Fibra, 120 rpm) en las que se puede apreciar la morfología de (E) <i>A. niger</i> y (F) <i>T. reesei</i> . .....	25
Figura 5. Consumo total de lactosa de biopelículas mixtas de <i>A. niger</i> y <i>T. reesei</i> a las 120 horas de crecimiento. Concentración inicial de lactosa, 10 g/L .....	26
Figura 6. Consumo total de lactosa de biopelículas mixtas de <i>A. niger</i> y <i>T. reesei</i> a las 120 horas de crecimiento. Concentración inicial de lactosa, 10 g/L.....	27
Figura 7. Biopelículas de <i>A. niger</i> (-A), <i>T. reesei</i> (-T) y mixtas (-M) desde 24 hasta 120 horas de crecimiento.....	28
Figura 8. Correlación entre datos de absorbancia a 595 nm. y peso seco de biopelículas fúngicas mixtas de <i>A. niger</i> y <i>T. reesei</i> .....	30
Figura 9. Sección del alineamiento de las secuencias del gen actina de <i>A. niger</i> (asp_act) y de <i>T. reesei</i> (trich_act).....	31
Figura 10. Sección del alineamiento de las secuencias del gen $\beta$ -tubulina de <i>A. niger</i> (asp_tubB) y de <i>T. reesei</i> (trich_tubB). .....	32
Figura 11. Curvas de disociación de los amplicones de los cebadores diseñados para genes de actina y $\beta$ -tubulina utilizando como molde ADN proveniente de biopelículas de <i>A. niger</i> (-), <i>T. reesei</i> (-), mixtas (-) y controles negativos (-).....	35



Figura 12. Curvas de disociación y electroforesis de los amplicones resultantes de cada punto de la curva estándar An_tubB2 diseñada con las proporciones (puntos 1-5) de la Tabla 3. ....	39
Figura 13. Curvas de disociación y electroforesis de los amplicones resultantes de cada punto de la curva estándar Tr_tubB1 diseñada con las proporciones (puntos 1-5) de la Tabla 3. ....	40
Figura 14. Curvas estándar de qPCR de los cebadores An_tubB2 (•) y Tr_tubB1 (•) realizadas a partir de diluciones seriadas de dos órdenes de magnitud. ....	40
Figura 15. Curvas estándar de qPCR de los cebadores An_act1 (•) y Tr_act1(•) realizadas a partir de diluciones seriadas de dos órdenes de magnitud. ....	41
Figura 16. Cinética de crecimiento biopelículas mixtas de <i>A. niger</i> y <i>T. reesei</i> (n=5). Biomasa adherida (■). ....	43
Figura 17. Abundancia relativa promedio de micelio de biopelículas mixtas de <i>A. niger</i> (■) y <i>T. reesei</i> (■), con respecto al peso registrado (■) cuantificado con el gen actina. ....	45
Figura 18. Abundancia relativa promedio de micelio de biopelículas mixtas de <i>A. niger</i> (■) y <i>T. reesei</i> (■), con respecto al peso registrado (■) cuantificado con el gen $\beta$ -tubulina. ....	45

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Composición de medios de cultivo.....	69
Anexo 2: Composición de buffers y soluciones usados en este trabajo.....	69
Anexo 3: Comparación estadística entre velocidad de agitación y soporte utilizado en biopelículas mixtas de <i>A. niger</i> y <i>T. reesei</i> a las 120 horas de crecimiento (n=3).....	69
Anexo 4: Comparación estadística del consumo de lactosa total de biopelículas mixtas de <i>A. niger</i> y <i>T. reesei</i> a las 120 horas de crecimiento (n=3).....	70
Anexo 5: Comparación estadística de la cinética de crecimiento biopelículas mixtas de <i>A. niger</i> y <i>T. reesei</i> (n=2).....	70
Anexo 6: Prueba de correlación de Pearson entre datos de cinéticas de crecimiento de biopelículas fúngicas mixtas de <i>A. niger</i> y <i>T. reesei</i> (n=2) medidas a partir del peso seco (g/L) y absorbancia de difenilamina. ....	71
Anexo 7: Curvas estándar de extracción de ADN a partir del micelio .....	72
Anexo 8: Parámetros de pureza de las muestras de ADN genómico empleadas. ....	73
Anexo 9: Gel de integridad del ADN genómico extraído a partir de las muestras de biopelículas mixtas de la cinética de crecimiento. ....	74
Anexo 10: Prueba de correlación de Pearson entre datos de cinética de crecimiento de biopelículas fúngicas mixtas de <i>A. niger</i> y <i>T. reesei</i> (n=5) medidas a partir del peso seco real (mg) y el peso seco calculado por qPCR utilizando cebadores para el gen actina (mg). ....	74
Anexo 11: Prueba de correlación de Pearson entre datos de cinética de crecimiento de biopelículas fúngicas mixtas de <i>A. niger</i> y <i>T. reesei</i> (n=5) medidas a partir del peso seco real (mg) y el peso seco calculado por qPCR utilizando cebadores para el gen $\beta$ -tubulina (mg). ....	75
Anexo 12: Prueba de correlación de Pearson entre datos de abundancia relativa en biopelículas mixtas de <i>A. niger</i> y <i>T. reesei</i> medidas con qPCR utilizando cebadores para el gen actina y $\beta$ -tubulina.....	75

## RESUMEN

La producción de celulasas mediante cultivos mixtos de *A. niger* y *T. reesei* muestra que los títulos enzimáticos de las celulasas totales, endoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas pueden ser superiores en comparación con los cultivos individuales. Si bien los cultivos mixtos representan un sistema de fermentación prometedor, no se ha evaluado en qué medida la proporción de biomasa mixta influye en este sinergismo enzimático. En este trabajo se ha cuantificado de manera específica la biomasa en biopelículas mixtas compuestas por *A. niger* y *T. reesei*, dos hongos filamentosos comúnmente usados en el ámbito industrial. Las biopelículas mixtas fueron colectadas desde las 48 hasta las 120 horas de crecimiento. De ellas se extrajo ADN para realizar ensayos de PCR cuantitativa (qPCR) con cebadores específicos para cada hongo. Estos cebadores fueron diseñados a partir de las zonas no conservadas de los genes actina y  $\beta$ -tubulina de *A. niger* y *T. reesei*. Se comprobó la especificidad de los cebadores tanto in silico como experimentalmente. Utilizando dichos cebadores, se obtuvo una correlación estadísticamente significativa entre la biomasa determinada mediante qPCR y la registrada mediante peso seco. La proporción de micelio de cada hongo en las biopelículas mixtas mostró un cambio con respecto al tiempo: a las 48 horas, 62% de *A. niger* y 38% de *T. reesei*; 72 horas, 53.5% y 46.5%; 96 horas, 84.5% y 15.5% y 120 horas, 95.9% y 4.1%, respectivamente, lo que sugiere una interacción competitiva entre estos dos hongos, al final de la cual el micelio de *A. niger* desplazó casi por completo al de *T. reesei*. En conclusión, es posible realizar una cuantificación específica de biomasa mediante qPCR en biopelículas de hongos filamentosos. Además, el método desarrollado podría ser aplicado a cualquier sistema mixto de cultivo, con el fin de estudiar las respuestas metabólicas que los hongos, o incluso otros microorganismos, experimentan al interactuar entre sí.

**Palabras clave:** biopelícula; cultivo mixto; qPCR; cuantificación específica; interacción fúngica

## ABSTRACT

Production of cellulases by mixed cultures of *A. niger* and *T. reesei* shows that enzymatic titers of total cellulases, endoglucanases and  $\beta$ -glucosidases can be higher in comparison with individual cultures. Although mixed cultures constitute a promising fermentation system, it has not been addressed how much of this enzymatic synergism depends on a certain proportion of fungal mixed biomass. In this work, biomass was specifically quantified in biofilms composed of *A. niger* and *T. reesei*, two filamentous fungi commonly used in the industrial field. Mixed biofilms were collected from 48 to 120 hours of growth and DNA was extracted for qPCR assays with specific primers for each fungus. These primers were designed from non-conserved regions of actin and  $\beta$ -tubulin genes of both *A. niger* and *T. reesei*. Specificity of these primers was tested both *in silico* and experimentally. Using these primers, a statistically significant correlation was obtained between qPCR-calculated biomass and dry weight biomass data. Mycelium proportion in biofilms did change over time: at 48 hours, 62% of *A. niger* and 38% of *T. reesei*; 72 hours, 53.5% and 46.5%; 96 hours, 84.5% and 15.5% and 120 hours, 95.9% and 4.1%, respectively, suggesting a competitive interaction between these two fungi, at the end of which *A. niger* replaced almost completely *T. reesei* mycelium. In conclusion, it is possible to perform a specific quantification of biomass by qPCR in mixed biofilms of filamentous fungi. In fact, the presented method could also be applied to any culture system, in order to study metabolic responses that fungi, or even other microorganisms, display when interact with each other.

**Keywords:** biofilm; mixed culture; qPCR; specific quantification; fungal interaction.

## I. INTRODUCCIÓN

La naturaleza finita de las reservas mundiales de petróleo y el abundante suministro de biomasa han generado un gran interés en la producción biológica de combustibles y solventes químicos (Zeng y Biebl, 2002), hecho que ha promovido la investigación en biotecnología industrial para el uso más rentable de fuentes energéticas como la biomasa vegetal. Pese a que la biomasa lignocelulósica (BLC) es el material orgánico más abundante sobre la Tierra, su aprovechamiento energético es ineficiente pues los pretratamientos físicos y fisicoquímicos para la remoción de moléculas lignocelulósicas complejas necesitan grandes cantidades de energía o sustancias químicas recalcitrantes (Taherzadeh y Karimi, 2008; Harmsen *et al.*, 2010). Por otro lado, el uso de enzimas para el pretratamiento y la obtención de azúcares fermentables (sacarificación) a partir de BLC aún es muy costoso debido a que la gran cantidad de enzimas requeridas para tal fin impacta seriamente en el costo-beneficio de esta tecnología (Yang *et al.*, 2011). En este sentido, resulta indispensable desarrollar nuevas tecnologías para la producción de enzimas lignocelulolíticas destinadas a rentabilizar el aprovechamiento de esta fuente de carbono.

Se ha demostrado previamente que la formación de biopelículas de *A. niger* en soportes de poliéster es un método que incrementa la producción de celulasas totales con respecto al cultivo por fermentación sumergida (Gamarra *et al.*, 2010). El crecimiento por adhesión a superficies representa el modo natural de crecimiento de los hongos filamentosos en el ambiente, comportamiento que obedece a cambios morfológicos, fisiológicos y genéticos determinantes de una mayor expresión de enzimas lignocelulolíticas (Gutiérrez-Correa y Villena, 2003; Villena y Gutiérrez-Correa, 2006; 2012). Asimismo, se ha visto que la interacción sinérgica entre *T. reesei* y *A. niger* en biopelículas mixtas incrementa incluso hasta un 70% la producción de celulasas con respecto a las biopelículas individuales de cada hongo (Villena, 2002; Gutiérrez-Correa *et al.*, 2012). No obstante, esta interacción es mucho más compleja que la simple suma de las contribuciones enzimáticas individuales. La sinergia enzimática obedece a cambios en los perfiles transcriptómicos de los hongos en cocultivo que son desencadenados principalmente por la competencia por nutrientes (Daly *et al.*, 2017). En este sentido, en las biopelículas mixtas, las interacciones sinérgicas dependen

de la abundancia relativa de cada hongo, es decir, la expresión de celulasas, enzimas accesorias, factores de transcripción y finalmente los títulos enzimáticos— se encuentran en correlación con la proporción de biomasa de *Trichoderma* y *Aspergillus*. Por este motivo, es importante el desarrollo de una técnica de cuantificación específica de biomasa que pueda usarse como herramienta para comprender las interacciones biológicas entre hongos en cocultivo. La información obtenida por medio de esta técnica podrá ser aplicada en la optimización de modelos de producción de enzimas a mayor escala basados en el manejo eficiente de la proporción miceliar de cada hongo.

En conclusión, con el fin de mejorar el sistema de producción de celulasas a partir de biopelículas mixtas de *T. reesei* y *A. niger* se requiere desarrollar un método que permita determinar con precisión qué proporción de biomasa del sistema mixto corresponde a cada hongo en particular. Con este propósito, se realizará la cuantificación específica de la biomasa de cada hongo en el sistema mixto mediante la cuantificación de ADN por medio de qPCR.

### **1.1. OBJETIVO GENERAL**

Cuantificar de manera específica la biomasa de *T. reesei* y *A. niger* en un sistema mixto de biopelículas mediante qPCR con el fin de determinar la abundancia relativa de cada hongo.

### **1.2. ESPECÍFICOS**

- Estandarizar un sistema óptimo de cultivo para la obtención de biopelículas mixtas de *T. reesei* y *A. niger*.
- Diseñar cebadores a partir de secuencias específicas (no conservadas) de *T. reesei* y *A. niger*. para la cuantificación de ADN por medio de qPCR en el sistema mixto de biopelículas.
- Obtener una correlación entre ADN y biomasa fúngica en el sistema mixto de biopelículas mediante qPCR.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. BIOMASA LIGNOCELULÓSICA (BLC)

La pared celular vegetal es la fuente renovable más abundante en la naturaleza. Está compuesta principalmente de tres polímeros: (i) celulosa, polímero cristalino formado por largas cadenas de glucosa unidas por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4; (ii) lignina, una compleja matriz de polifenoles que rodea a las microfibrillas de celulosa; (iii) hemicelulosa, que incluye a los polímeros de xilosa genéricamente llamados xilanos, manosa, arabinosa, entre otros. La celulosa y la hemicelulosa se conectan entre sí mediante la lignina, que otorga integridad, rigidez estructural e impermeabilidad a toda la pared celular (Taherzadeh y Karimi, 2008). Además, existen enlaces tipo éter, éster y puentes de hidrógeno que enlazan a los monómeros de cada uno de estos polímeros (enlaces intrapoliméricos) y también entre diferentes polímeros (enlaces interpoliméricos) lo que resulta en una complejidad estructural que dificulta el tratamiento químico e hidrólisis enzimática de la celulosa (Sun y Cheng, 2002; (Taherzadeh y Karimi, 2008; Harmsen et al., 2010). Por esta razón, los pretratamientos de la BLC tienen como objetivo remover la lignina y la hemicelulosa, reducir la cristalinidad de la celulosa y el incremento de la porosidad permeabilidad de los materiales (Irfan et al., 2011), con el fin de que la celulosa sea más accesible al ataque enzimático.

La abundancia relativa de la celulosa, hemicelulosa y lignina son, entre otros, factores clave al momento de determinar el método óptimo para la conversión de energía para cada tipo de BLC (Mckendry, 2002, citado por Bajpai, 2016). Es decir, el tipo y cantidad de enzimas necesarias para el total aprovechamiento de la BLC variará según la composición de la materia prima lignocelulósica elegida: cortezas, grass, bagazo, etc., (resumidos por Sun y Cheng, 2002). Esto conlleva a desarrollar técnicas de producción no solo de una celulosa en particular, sino de un cocktail de enzimas lignocelulolíticas con variada especificidad y actividad.

## 2.2. CELULASAS

Existen tres grupos principales de celulasas involucradas en el proceso de hidrólisis (Irfan et al., 2011): (i) endoglucanasas EG, endo-1,4-D-glucanohidrolasa, o EC 3.2.1.4, que ataca regiones internas de baja cristalinidad en la fibra de celulosa, creando extremos libres de cadena; (ii) exoglucanasas o celobiohidrolasas CBH, 1,4- $\beta$ -D-glucano celobiohidrolasa, o EC 3.2.1.91, que degrada aún más la molécula removiendo unidades de celobiosa de los extremos libres; y (iii)  $\beta$ -glucosidasa EC 3.2.1.21 que hidroliza la celobiosa para producir glucosa. Aunque *T. reesei* es uno de los mejores hongos productores de celulasas, su producción de  $\beta$ -glucosidasa es baja (Montenecourt, 1983, citado por Gutiérrez-Correa y Tengerdy, 1997; Fang et al., 2010; Rani, 2011); por otro lado, *A. niger* es un gran productor de  $\beta$ -glucosidasa, lo que explicaría el gran poder degradativo de lignocelulosas de los cultivos mixtos (Dueñas et al., 1995; Villena, 2002).

Las celulasas se usan en la industria textil, en detergentes, en la industria de la pulpa y del papel, para mejorar la digestibilidad de los alimentos animales en la industria alimentaria, etc. (Sukumaran *et al.*, 2005). Sin embargo, la sacarificación enzimática de materiales lignocelulósicos como el bagazo de la caña de azúcar, mazorcas del maíz, paja de arroz o *grass* por medio de celulasas para la producción de biocombustibles es tal vez la aplicación más popular en la que se está investigando actualmente (Kuhad *et al.*, 2011).

## 2.3. HONGOS FILAMENTOSOS PRODUCTORES DE CELULASAS

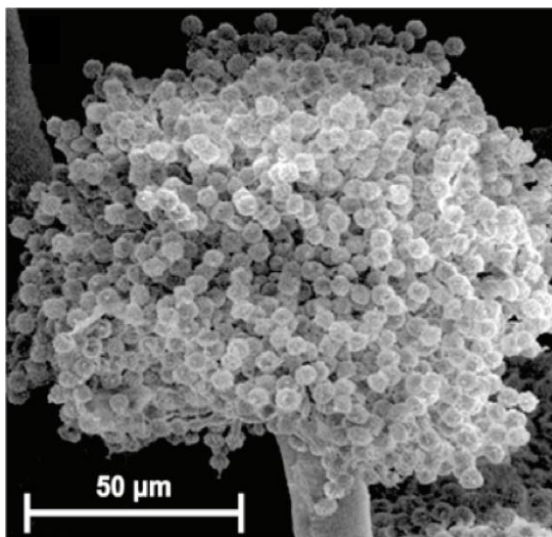
### 2.3.1. *Aspegillus niger*

*A. niger* es una de las especies de hongos filamentosos más importantes en el ámbito biotecnológico. Esta especie es ampliamente usada para la producción de ácidos orgánicos y enzimas extracelulares (Frisvad *et al.*, 2011), cuyas aplicaciones incluyen la clarificación de jugos de fruta, hidrólisis de lípidos durante la producción de quesos hasta la degradación de fitatos en la alimentación animal (Dijksterhuis y Wösten, 2013). También merece especial atención en la industria textil por ser fuente de amilasas y pectinasas para descudado o limpieza de las fibras de algodón (Madhu y Chakraborty, 2017), así como en el procesamiento de la pulpa de papel mediante el uso de xilanasas y celulasas (Kumar *et al.*, 2016, Imran *et al.*, 2019).

Es un hongo haploide, de esporas asexuales negras (conidios, Figura 1), que pertenece al orden *Eurotiales* y a la familia *Trichocomaceae* (*Ascomycota*) probablemente originario de



Budapest, Hungría (Paul *et al.*, 2017). Su carácter cosmopolita le permite crecer entre 6 y 47°C, pH entre 1.5 y 9.8 y con una actividad de agua por encima de 0.77 (Pitt y Hocking, 2009); particularidades que han impulsado su uso industrial hasta la actualidad.



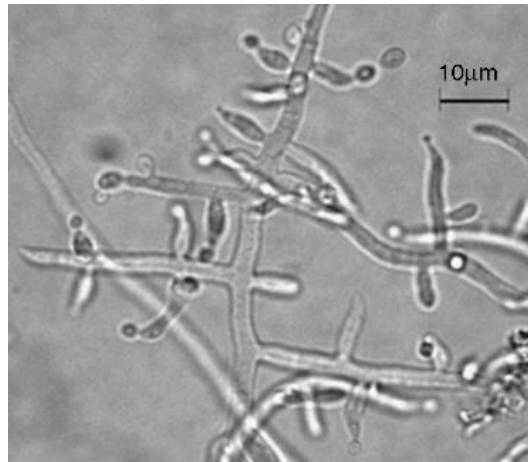
**Figura 1.** Cadenas de conidios de *A. niger* sobre un conidióforo  
**FUENTE:** Krijgsheld *et al.* (2013)

Entre las cepas de mayor importancia se encuentran CBS 513.88, ancestro cercano de las cepas usadas actualmente para la producción de enzimas y derivada de cepas productoras de glucoamilasa A (Pel *et al.*, 2007; Andersen *et al.*, 2011); ATCC 1015, cepa silvestre muy usada para la producción de ácido cítrico (Andersen *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2015) y NRRL 3, cepa también silvestre de importancia en la producción de ácido glucónico y lipasas extracelulares (Baker, 2006; Adham y Ahmed, 2009). La cepa ATCC 10864, utilizada en el presente trabajo, se ha descrito por su potencial aplicación industrial para la producción de enzimas celulolíticas en sistemas de fermentación tanto en sustrato sólido, sumergida y por biopelículas (Gutiérrez-Correa y Villena, 2003; 2012; Gamarra *et al.*, 2010; Ramage, *et al.*, 2011).

### 2.3.2. *Trichoderma reesei*

*T. reesei* se ha establecido como una de las principales factorías celulares fúngicas para la producción de enzimas industriales en los últimos 40 años (revisado por Paloheimo *et al.*, 2016). Esto debido a que produce de manera natural una gran cantidad de celulasas, posee fuertes promotores (*cbh1/cel7A*) que promueven una mayor secreción de enzimas, no es patagénico en humanos, puede crecer a partir de materiales baratos y accesibles, su producción es fácilmente escalable a nivel industrial y, además, existe abundante

información genómica, lo que permite el desarrollo de estrategias de mejora mediante edición génica (Paloheimo et al., 2016).



**Figura 2.** Conidióforos, fialides y conidios de *T. reesei*  
**FUENTE:** Torres-de la Cruz et al. (2015)

Se caracteriza por ser filamentoso, mesófilo, saprófito y, a diferencia de *A. niger*, se encuentra naturalmente solamente en un estrecho margen alrededor del ecuador (Kubicek *et al.*, 2008). Sus conidios son de color verde pálido, de forma elipsoide; las fialides – cilíndricas, algo ensanchadas– se agrupan por secciones alrededor de las hifas – conidióforos– (Kubicek y Harman, 1998) (Figura 2). Pertenece al orden *Hypocreales* y a la familia *Hypocreaceae* (*Ascomycota*). La cepa QM6a, utilizada en el presente trabajo, es el antecesor común de prácticamente todas las cepas productoras de celulasas industrialmente relevantes (Nevalainen *et al.*, 1994), tales como las cepas hipercelulolíticas QM9414 y RUT-C30, ambas obtenidas por mutagénesis química y por radiación (Peterson y Nevalainen, 2012). Aunque en los últimos años las cepas mejoradas han recibido más atención por parte de los investigadores, las cepas silvestres son una referencia en los estudios básicos, más aún cuando existe información genómica actualizada (Li *et al.*, 2017).

## **2.4. SISTEMAS DE CULTIVO PARA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS CON HONGOS FILAMENTOSOS**

### **2.4.1. Fermentación por adhesión a superficies**

En biotecnología, la producción de enzimas, metabolitos, solventes, biomasa, entre otros, desarrollada por células o por sus componentes individuales bajo condiciones controladas se conoce como fermentación. Esta es comúnmente clasificada según las condiciones de crecimiento de la célula como (i) fermentación sumergida (FS), que consiste en el crecimiento del microorganismo en medios líquidos definidos de producción; (ii) fermentación por adhesión a superficies (FAS), que implica el desarrollo de biomasa sobre una matriz orgánica (lignocelulosa) o inorgánica (metal, polímeros) y (iii) fermentación de células inmovilizadas (FCI), que se basa en la fijación de células (o enzimas) por medios artificiales a un soporte. Mientras que en esta última la adhesión se obtiene por métodos físicos o químicos, la FAS se basa en un verdadero proceso biológico que tiene su origen en la adhesión celular, evento que condiciona cambios morfológicos, fisiológicos y genéticos desencadenados en la célula (Gutiérrez-Correa et al., 2012). En esta categoría se distinguen dos tipos de fermentaciones, (i) la fermentación en sustrato sólido (FSS) y (ii) la fermentación por biopelículas (FB) (Gutiérrez-Correa y Villena, 2003).

La FSS conlleva el crecimiento del microorganismo adherido a un soporte sólido artificial o natural en ausencia de agua libre (Gamarrá et al., 2010). Dicho sistema exhibe varias ventajas frente a la FS, como mejores características del producto, mayor rendimiento y facilidad de recuperación del producto y un menor requerimiento energético (Gutiérrez-Correa y Villena, 2003; Viniegra-González *et al.*, 2003). Lo anterior podría explicarse considerando que el crecimiento por adhesión a superficies representa el modo natural de desarrollo de los hongos filamentosos en el ambiente, en contraste con los medios líquidos, que no constituyen un hábitat espontáneo para este tipo de organismos. Asimismo, a diferencia de la FS, la FSS se caracteriza por presentar gradientes de nutrientes, oxígeno, temperatura y disponibilidad de agua, lo cual se traduce en diferencias a nivel de regulación transcripcional (Iwashita, 2002; Farinas, 2015). Al carecer de medio líquido, las enzimas en la FSS podrían estar inmovilizadas en el sustrato y de esta manera solo actuarían sobre el sustrato que tienen cerca, limitando el efecto de represión ejercido por la glucosa (Hansen *et al.*, 2015). Esto concuerda con la hipótesis según la cual este sistema de fermentación actúa con tasas de oxigenación rápidas, pero con un lento suministro de azúcares (Viniegra-González *et al.*,

2003). Igualmente, Behera y Ray (2016) mencionan que, en el caso de *A. niger*, la represión catabólica parece limitar la producción enzimática en FS en comparación con FSS.

Otra característica biológica de la FSS es el cambio en la localización de la actividad de algunas enzimas. En FS, la actividad de ciertas enzimas se encuentra principalmente en la pared celular del micelio. Sin embargo, En FSS, estas actividades se observan en el medio y poca en la pared celular (Iwashita, 2002). Si bien se conoce que en los hongos filamentosos como *A. niger* la secreción de proteínas extracelulares ocurre principalmente en los ápices de crecimiento de las hifas y en los septos (donde sucede la síntesis de pared celular) (Weenink, 2008), el tipo y la cantidad de proteínas que se secretan dependen a su vez del sistema de cultivo o, dicho de otro modo, de la restricción de nutrientes que el método de cultivo implica (Oda *et al.*, 2006). Otro factor importante a favor de la FSS es la baja represión catabólica que, en *A. niger*, parece limitar la producción enzimática en FS (Behera y Ray, 2016). Es por todo lo anterior que la FSS genera mayores títulos enzimáticos que la FS. Además, el crecimiento en sustrato sólido promueve una mayor secreción de proteínas totales (posiblemente debido a la restricción de nutrientes) junto con una menor actividad proteasa (Viniegra-González *et al.*, 2003; Hansen *et al.*, 2015).

A pesar de estas ventajas, la implementación de FSS no se ha desarrollado a una escala industrial, principalmente a causa de la dificultad de monitorear y controlar las diferentes variables del proceso (Farinas, 2015). Si se opera sin control, las diferencias de temperatura entre regiones distintas del lecho sólido pueden ser tan grandes como de 20°C, lo que resulta en una baja productividad, crecimiento de contaminantes o el completo fracaso de toda la fermentación (Krishania *et al.*, 2018). Por esta razón, el uso de biopelículas fúngicas supone una alternativa a la FSS con la ventaja de que la tecnología desarrollada para la FS puede ser fácilmente aplicada (Gutiérrez-Correa y Villena, 2003).

#### 2.4.2. Fermentación por biopelículas

La fermentación con biopelículas (FB) utiliza microorganismos adheridos pasiva o activamente a matrices naturales o sintéticas. Las biopelículas se definen como una comunidad sésil derivada de hongos filamentosos y levaduriformes, caracterizada por células que están irreversiblemente adheridas a un sustrato y que desarrollan haces o capas de hifas embebidas en una matriz de polímeros extracelulares (PEC) producida y secretada por la misma biopelícula. Además, a diferencia del micelio vegetativo, presentan una expresión génica alterada y compartimientos internos a manera de canales en las capas de

hifas que permiten una mejor aireación y transferencia de masa, aspecto que podría explicar su gran producción de enzimas y metabolitos (Harding et al., 2009; Gutiérrez-Correa et al., 2012).

Muchas especies importantes de hongos tales como *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Coccidioides* y *Pneumocystis* son capaces de producir biopelículas (Fanning, 2012). Las biopelículas formadas por el género *Candida* son de importancia médica pues este tipo de crecimiento constituye una protección ante ambientes inhóspitos, aspecto que las convierte en un factor de virulencia con alta resistencia a antibióticos (Lohse et al., 2017). El hongo filamentoso *A. fumigatus* y la levadura *C. neoformans* también han sido reportados en casos relacionados con infecciones asociadas a biopelículas (Ramage et al., 2009; Gravelat, 2010). Por otra parte, *A. flavus* parece ser capaz de infectar internamente granos de maíz antes de la cosecha por medio de formación de biopelículas (Dolezal et al., 2013). En cuanto a la aplicación industrial, las biopelículas de hongos filamentosos han demostrado ser ventajosas en la utilización de residuos sólidos agroindustriales de lignocelulosa, granos, yuca, papa, arroz y pulpa de remolacha azucarera para la producción de enzimas celulolíticas (Wang y Chen, 2009). La formación de biopelículas de *Saccharomyces cerevisiae* sobre la superficie del Jerez durante el período de crianza es importante para el desarrollo del aroma y gusto característicos de este licor (Coi et al., 2017). La FB ha sido aplicada en la producción de enzimas, aminoácidos, ácidos orgánicos, alcohol, aromas, en procesos de bioconversión y en el tratamiento biológico de efluentes (Gutiérrez-Correa y Villena, 2003). Muchos basidiomicetos forman biopelículas en diferentes tipos de soportes y biorreactores han sido utilizados principalmente para la degradación de numerosas sustancias contaminantes y de desecho (*Trametes*, *Pleurotus*, *Lentinus*, *Phanerochaete*, *Thanephorus*), para la producción de ligninasas (*Bjerkandera*, *Phanerochaete*) y peroxidasas (*Coprinus*). Entre los zigomicetos es importante mencionar las biopelículas de *Rhizopus* usadas en la producción de ácido láctico, dextrano o lipasas; y también la obtención de ácido isopimárico, abiético y dehidroabiético usando biopelículas de *Mortierella isabellina*. Los hongos del filo *Ascomycota* como *Penicillium chrysogenum*, *P. frequentans*, *Fusarium moniliforme*, *Humicola lutea*, *Neurospora crassa* y *T. reesei* han sido utilizados respectivamente para producir penicilina, ácido giberélico, fosfatasas ácidas y celulasas por medio de FB (Gutiérrez-Correa et al., 2012). En el caso de *A. niger*, se ha visto que las biopelículas presentan una actividad enzimática celulolítica entre 50 y 70 por ciento mayor con respecto

al cultivo de micelio sumergido y sobre sustrato sólido (Villena y Gutiérrez-Correa., 2006; Gamarra et al., 2010).

Pese a que fisiológicamente las biopelículas fúngicas son tan diversas, un aspecto común y esencial en todas ellas es la adhesión de esporas o micelio al soporte. Las propiedades de adhesión controlan los fenotipos que se han vuelto relevantes en el mejoramiento de microorganismos para procesos industriales (Bauer et al., 2010), aunque también fomentan la virulencia en el proceso de infección, cuyo estudio puede contribuir con la identificación de nuevos blancos terapéuticos (Silva et al., 2011). La adhesión se logra mediante glicoproteínas especializadas de membrana llamadas “adhesinas” o “floculinas”. Estas moléculas de aproximadamente 88 kDa, son capaces de unirse a ciertos aminoácidos o azúcares de la membrana de otras células o de promover la unión a superficies abióticas (Verstrepen y Klis, 2006; Groot et al., 2013). En la mayor parte de hongos las adhesinas se encuentran ancladas a la pared celular con un residuo glicosilfosfatidilinositol (GPI) C-terminal, poseen dominios centrales ricos en treonina y serina glicosiladas, mientras que su zona N-terminal puede estar constituida por dominios de unión a péptidos o carbohidratos (Ramana y Gupta, 2010). Los genes de adhesión son activados por diversos elementos ambientales como la escasez de carbono o nitrógeno, cambios en el pH o en niveles de etanol y, además de las diferentes cascadas de señalización que los regulan, también están sujetos a regulación epigenética (Verstrepen y Klis, 2006). Esta plasticidad genética muestra la capacidad de los microorganismos para adaptar rápidamente sus propiedades de adhesión a un ambiente determinado, o a las particularidades del material al que se adhieren, pues las propiedades físicas de su superficie como hidrofobicidad, carga electrostática y rugosidad son importantes en el paso inicial de adhesión de bacterias, levaduras y hongos filamentosos (Gutiérrez-Correa y Villena, 2003).

Otro tipo de moléculas involucradas en la adhesión celular son las hidrofobinas, pequeñas proteínas (7-12 kDa) extracelulares producidas solo por hongos filamentosos, las cuales forman espontáneamente capas anfipáticas en la superficie externa de la pared celular fúngica (Dubey et al., 2014). Todas ellas poseen ocho residuos conservados de cisteína que forman cuatro puentes disulfuro, presumiblemente para mantener a la proteína en un estado soluble durante su secreción (Wösten y Scholtmeijer, 2015). Como en muchas moléculas anfipáticas, las hidrofobinas presentan una cadena lateral hidrofóbica compuesta de aminoácidos alifáticos sin carga, mientras que la otra posee aminoácidos polares con carga (Wang et al., 2010; Wösten y Scholtmeijer, 2015). Así, en contacto con una interfase

hidrofílica-hidrofóbica (agua-aire), ocurre un cambio conformacional y una subsecuente asociación intermolecular en forma de bastoncillos de hoja-beta plegadas con ambas zonas en cada extremo de la molécula, lo que conduce a la formación de capas y reducción de la tensión superficial (Morris, 2013; Ren, 2013). Gracias a las hidrofobinas, los hongos son capaces de adherirse a superficies hidrofóbicas, como cutículas de las plantas o rocas (Epstein y Nicholson, 2016), e incluso al exoesqueleto de insectos (Zhang et al. 2011; Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2013). Si bien su importancia radica en su uso como aditivo o recubrimiento industrial (Green et al., 2013; Lo et al., 2014), a nivel biológico los hongos se valen de las propiedades de las hidrofobinas para adherirse, crecer y colonizar nuevas superficies bióticas o abióticas, recubriendo la pared celular de hifas, esporas o cuerpos fructíferos con capas anfipáticas (Khalesi et al., 2015). Resulta, entonces, indispensable entender cómo estas proteínas influyen en la adhesión y en la producción industrial de enzimas lignocelulolíticas.

Junto a la adhesión, el micelio de las biopelículas fúngicas también se caracteriza por producir una matriz de PEC que lo rodea. El mayor componente de esta matriz son polisacáridos, y tienen una variedad de sitios de unión para las enzimas secretadas y las macromoléculas del sustrato, lo que facilita la reacción enzimática extracelular (Gutiérrez-Correa et al., 2012). La matriz de PEC proporciona un microambiente confinado que otorga integridad estructural a la biopelícula y donde el sustrato, enzimas y microorganismos se mantienen en cercanía (Wang y Chen, 2009). De hecho, esta matriz provee una armazón para la adhesión a superficies y la cohesión entre células (Mitchell et al., 2016). Por ejemplo, el patógeno *A. fumigatus* secreta un polímero de galactosaminogalactano que sirve como un adhesivo al plástico, fibronectina y células epiteliales (Sheppard, 2011; Epstein y Nicholson, 2016).

## **2.5. SISTEMAS DE CULTIVOS MIXTOS DE HONGOS FILAMENTOSOS**

El cultivo de dos o más hongos filamentosos en un mismo medio de crecimiento –esto es, compartiendo el mismo espacio y nutrientes– provoca la inducción de muchos sistemas génicos –enzimas degradativas, rutas desconocidas de síntesis de metabolitos secundarios– que normalmente se encuentran silenciados en los cultivos individuales (revisado por Bertrand et al., 2014). También se ha reportado que, como consecuencia de la mayor secreción de metabolitos, es posible una biodegradación más eficiente de compuestos recalcitrantes (revisado por Ijoma y Tekere, 2017). El crecimiento en forma de consorcios o

comunidades es el modo de vida natural de hongos, bacterias y muchos otros seres vivos dentro de un ecosistema (por ejemplo, suelo forestal), en contraposición a los cultivos aislados, que reprimen gran parte su potencial genético. La continua escasez de nutrientes que existe en este tipo de ecosistema parece fomentar relaciones simbióticas entre hongos según la complementariedad de sus perfiles enzimáticos, con el fin disponer de fuentes de carbono alternativas a las que resultaría difícil acceder de manera individual (BLC). Tal interacción enzimática fue sugerida por Duff (1985) cuando observó un incremento evidente en la actividad celulolítica al cultivar *T. reesei* RUT-C30, una cepa deficiente en beta-glucosidasa, junto a *A. oryzae*, un hongo productor de dicha enzima. Sin embargo, estudios recientes sugieren que la sinergia es más compleja que la sola complementariedad enzimática, pues mientras que las celulasas, xilanasas, proteínas de membrana y diversas enzimas relacionadas con la producción de metabolitos secundarios se expresan diferencialmente en la condición mixta, varios genes normalmente activos en cultivos individuales, son reprimidos en sistemas mixtos, como genes de crecimiento, micoparasitismo y otros de función desconocida (Benoit-Gelber et al., 2017; Daly et al., 2017). Probablemente esto se deba a las interacciones que ocurren entre dichos hongos al competir por las mismas fuentes orgánicas e inorgánicas. La supervivencia en tales ambientes requiere estrategias como la producción de metabolitos secundarios bioactivos, enzimas hidrolíticas y otras estrategias para evitar la proliferación de otros microorganismos (Pettit, 2009). Además, se ha comprobado que, en hongos filamentosos, el quorum sensing, un sistema de comunicación intercelular basado en la concentración de pequeñas moléculas extracelulares, también regula la diferenciación morfológica del micelio, la producción de metabolitos secundarios y la formación de biopelículas (Albuquerque y Casadevall, 2012; Barriuso et al., 2018).

Debido a la complejidad de la red regulatoria que gobierna la producción enzimática en sistemas fúngicos mixtos, aún no se conoce, por ejemplo, el efecto de la proporción de cada hongo en el sistema mixto. No obstante, la evaluación de este aspecto requiere de métodos de cuantificación precisos y específicos de biomasa.

## **2.6. METODOS DE CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA DE HONGOS**

La cuantificación de la biomasa en un sistema de cultivo es un paso indispensable para realizar cualquier análisis subsecuente sobre el estado de un sistema de fermentación. Con los datos de biomasa, se pueden calcular parámetros relacionados con la velocidad de



crecimiento, consumo de sustrato, rendimientos, productividad, entre otros (Gutiérrez-Correa y Villena, 2010). Sin embargo, no siempre es posible realizar una medición directa de la biomasa fúngica, especialmente en la FSS, sistema en el que la biomasa queda irreversiblemente adherida al sustrato. Frente a este problema, es posible cuantificar de manera indirecta la biomasa fúngica aprovechando las diferencias en composición entre el micelio y el sustrato.

Joergensen y Wichern (2008) distinguen cuatro diferentes enfoques principales para cuantificar la biomasa fúngica. Los métodos microscópicos como el conteo de esporas o la medición de grosor y longitud de hifas (Schnürer, 1993; Balser et al., 2005) son fáciles de adaptar y requieren materiales que cualquier laboratorio maneja. No obstante, la biomasa muerta, el contenido de agua y la desviación con respecto a otros métodos son fuentes de error importantes. La inhibición selectiva respiratoria se basa en que, al agregar glucosa, el micelio induce su metabolismo respiratorio, luego de lo cual se agrega un inhibidor (antibiótico) que detiene la respiración. Al tratarse de un proceso metabólico, la respiración máxima inicial tras la inducción es proporcional al tamaño de la biomasa viva, siendo el único método capaz de separar de la cuantificación el sesgo de las células muertas. Sin embargo, en un ambiente mixto cada microorganismo consume glucosa a una tasa distinta, lo que origina desviación. Los métodos que cuantifican componentes de la membrana celular como los ácidos grasos y ergosterol (Gessner et al., 1991; Nylund y Wallander, 1992; Olsson et al., 1995; Lau et al., 2006) se caracterizan por requerir equipos costosos, como cromatografía capilar, y un flujo de trabajo más largo. Pese a poseer una gran especificidad y baja desviación, resulta problemático a su vez que no todos los hongos produzcan ergosterol (*Mortierellaceae*, *Glomeromycota*). La cuantificación de los componentes de la pared celular como la glucosamina (Matcham et al., 1985) es un método trabajoso que exige el uso de varios reactivos con el fin de hidrolizar las cadenas de quitina hasta glucosamina, con la que finalmente se realiza una valoración colorimétrica. No obstante, estos métodos son cada vez menos utilizados puesto que la cuantificación de biomasa se está enfocando actualmente en la cuantificación de ADN.

Antes del uso rutinario de la espectrofotometría UV, era común el uso de métodos fluorométricos y colorimétricos para la cuantificación del ADN. Entre ellos se encuentran el método de la mitramicina, un antibiótico que en presencia de sales se une al ADN de doble hebra (ADN<sub>dh</sub>) y en este estado fluoresce (Hill y Whatley, 1975). Sin embargo, otras moléculas como proteínas, sales, nucleótidos, entre otras, pueden conducir a una

sobreestimación de los datos hasta en 11 veces (DeFlaun et al., 1986). El método de DABA (ácido dihidrocloruro 3,5-diaminobenzoico) se basa en la reacción de este ácido con aldehídos que posean un carbono alfa no sustituido (una propiedad de las desoxirribosas) formándose un producto fluorescente (Kissane y Robins, 1958). Pese a que pueden ocurrir falsos positivos en reacción con ADN de hebra simple (DeFlaun et al., 1986), actualmente se suele usar en la cuantificación de ADN de tejidos y células animales (Fujie et al., 2016; Boudalia et al., 2017; García-Carrizo et al., 2017). Uno de los métodos más antiguos para la cuantificación de ADN es el de la difenilamina. Descrito inicialmente por Dische (1930) y mejorado posteriormente (Burton, 1968; Zhao, 2013), el método se basa en la reacción de la difenilamina, bajo condiciones ácidas, con los productos de oxidación de las desoxirribosas, lo que resulta en la formación de un complejo azul que puede ser cuantificado colorimétricamente. Aunque este método presenta una baja sensibilidad (límite inferior, 10 µg) se usa actualmente para cuantificar el contenido de ADN de hongos o células bacterianas sin necesidad de realizar una extracción previa de ADN, lo que disminuye el flujo de trabajo y permite estimar una gran cantidad de muestras a la vez (Zhao, 2013; Chen et al., 2016; Liu et al., 2017). Finalmente, la cuantificación de ADN en virtud a su secuencia por medio de qPCR se ha convertido en una técnica de referencia no solo por su exactitud, sino porque también ofrece información de composición específica acerca de dicha biomasa (Baldrian et al., 2013). Esta ventaja añadida la convierte en el método elegido para la cuantificación específica de la biomasa de *A. niger* y *T. reesei* en el sistema mixto de biopelículas que se presenta en este trabajo.

## **2.7. CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA MEDIANTE qPCR**

La PCR en tiempo real o qPCR es una técnica considerada como la más sensible y reproducible a tal punto que es usada para validar la información obtenida por otros métodos (Kozera y Rapacz, 2013). En su variante más sencilla, se basa en el uso de fluoróforos como el SYBR Green que se unen selectivamente al ADNdh y fluorescen como consecuencia de esta unión. A diferencia de la PCR convencional, en la qPCR se detecta mediante esta fluorescencia el aumento exponencial de ADN en cada ciclo de amplificación, lo que se traduce en curvas exponenciales cuyo origen permite calcular, de manera relativa o absoluta, la cantidad de ADN de partida. Dicho origen se entiende como el primer ciclo de la reacción en el que empieza a detectarse un aumento exponencial de la fluorescencia, llamado ciclo umbral (Ct, cycle threshold). Este valor Ct es inversamente proporcional a la cantidad de ADN molde inicial en la reacción, de manera que cuanto más ADN inicial exista, menos

ciclos de amplificación se requerirán para que la señal de fluorescencia sea lo bastante intensa para superar el Ct. Una ventaja de la qPCR sobre la PCR convencional consiste en que la “identidad” de los amplicones se puede discriminar usando curvas de disociación (melting curves). Debido a que la temperatura de disociación (momento en que las hebras de una molécula de ADN se separan) depende de la longitud, contenido de GC, presencia de mismatches entre bases, etc., los diferentes productos de amplificación pueden distinguirse por sus características de disociación (Bio-Rad, 2016). Cuando el ADN<sub>dh</sub> unido al fluoróforo es calentado de manera gradual, ocurre un descenso repentino de la fluorescencia apenas es alcanzada la temperatura de disociación, lo que origina la separación de las hebras del ADN y la posterior liberación del fluoróforo. Este pico de fluorescencia coincide con la temperatura de disociación, la cual es una característica inherente a cada secuencia. Esta característica permite diferenciar amplicones de qPCR de dímeros de cebadores, productos inespecíficos o contaminación.

Existen variantes de los sistemas de detección que se clasifican de acuerdo con el nivel de especificidad hacia la secuencia-diana (Mirmajlessi et al., 2015). La detección basada en marcadores inespecíficos (SYBR Green, EvaGreen) consiste en el aumento de fluorescencia desencadenado por la unión de estas moléculas al ADN, de manera independiente a su secuencia. Aunque este sistema muy fácil y barato de implementar, puede conducir a falsos positivos (contaminación, dímeros de cebadores) como consecuencia de la inespecificidad de la detección. Los sistemas basados en sondas específicas (Taqman, molecular beacons, LUX primers) utilizan cebadores diseñados especialmente para fluorescer únicamente tras alinearse con su diana. Estas sondas mejoran la sensibilidad, especificidad y precisión de la técnica, pero a un costo más elevado.

La qPCR es ampliamente utilizado para comparar perfiles de expresión transcripcional bajo diferentes tratamientos. También se usa para determinar la presencia y el número exacto de genes o alelos específicos que pueden servir en la tipificación de cepas o aislados, rastreo de resistencia microbiana, producción de toxinas, cuantificación de copias de genes exógenos, entre otros. Asimismo, es utilizado, a modo de diagnóstico, para la detección y cuantificación de agentes infecciosos (virus, bacterias, protozoos) en distintas muestras de plantas, animales y humanos (Kralik y Ricchi, 2017). En lo que se refiere a hongos, se aplica ampliamente en la detección y cuantificación de hongos fitopatógenos o causantes de enfermedades humanas, ya que la cuantificación mediante qPCR tiene la ventaja de poder correlacionar la cantidad de biomasa de un hongo con el estadio o fase de propagación de

una infección (Capote et al., 2012; McCarthy et al., 2017). Sin embargo, existen pocas investigaciones dedicadas a la cuantificación específica de ADN y extrapolación de biomasa en sistemas fúngicos mixtos (Benoit-Gelber et al., 2017; Daly et al., 2017). Esta ausencia merece el desarrollo de una metodología sencilla, precisa y reproducible para la cuantificación de biomasa fúngica en un sistema mixto de biopelículas a partir de ADN genómico mediante qPCR.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN**

Laboratorio de Micología y Biotecnología “Marcel Gutiérrez Correa”. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Agraria La Molina.

#### **3.2. MICROORGANISMOS**

*Aspergillus niger* ATCC 10864 y *Trichoderma reesei* QM6a (ATCC 13631), las cuales han sido donadas por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), colección ARS (NRRL). Estas cepas fueron conservadas a largo plazo en glicerol 15% (v/v) a -80°C. Adicionalmente, las cepas fúngicas se mantuvieron en cuñas de Agar Papa Dextrosa (PDA) a 4 °C como conservación a corto plazo.

#### **3.3. FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS FÚNGICAS MIXTAS**

Estas cepas se resembraron en matraces durante 7 días a 28°C y, a partir de estos cultivos, se recolectaron esporas con 10 mL de solución Tween 80 0.1% (v/v). El número de esporas se determinó en una cámara Neubauer y se diluyó hasta  $1 \times 10^6$  esporas/mL. Esta suspensión fue usada como inóculo para pasos posteriores.

El siguiente protocolo utilizado para la formación de biopelículas mixtas se basa en lo descrito por Gutiérrez-Correa y Villena (2012). La tela o fibra de poliéster, utilizada como soporte para la formación de las biopelículas, se cortó en forma cuadrada manteniendo una proporción constante entre el soporte y el volumen del medio de cultivo líquido ( $0.27 \text{cm}^2/\text{mL}$ ). Se lavó varias veces con agua destilada hasta eliminar todo residuo y se secó en un horno a 100°C durante 24 horas para ser posteriormente pesada y esterilizada.

Con el fin de lograr la adsorción de las esporas al soporte, este se colocó en un matraz con 70 mL de agua destilada estéril y seguidamente se agregó 1.5% (v/v) del inóculo de *T. reesei* QM6a y se incubó dos horas a 28°C y 175 rpm. A continuación, se agregó 1.5% (v/v) del inóculo de *A. niger* ATCC 10864 y se incubó 30 minutos a 28°C y 175 rpm. En el caso del

cultivo de biopelículas individuales de *T. reesei* y de *A. niger*, el inóculo de esporas añadido fue de 3% (v/v).

Para remover las esporas que no lograron adherirse efectivamente al soporte, este fue trasladado a un nuevo matraz con 70 mL de agua destilada estéril y se agitó durante 15 minutos a 28°C y 175 rpm. Posteriormente, se realizaron dos lavados agregando 70 mL de agua estéril y agitándose igualmente 15 minutos a 28°C y 175 rpm.

Finalmente, el soporte con las esporas adheridas se colocó en un matraz con 70 mL de medio de cultivo con lactosa como fuente de carbono (Anexo 1) y se incubó a 28°C y 120 rpm. Para el análisis de peso seco y consumo de lactosa se recolectaron las biopelículas (dos réplicas biológicas por punto) cada 24 horas a partir del tiempo cero hasta las 120 horas y se procedió con lo detallado en los apartados 3.4 y 3.5. Para la extracción de ADN de las biopelículas y posterior cuantificación absoluta de biomasa por qPCR, las biopelículas se recolectaron cada 24 horas a partir de las 48 horas, con tres réplicas biológicas por punto hasta las 120 horas y se continuó con lo mencionado en el apartado 3.7. La insuficiencia de muestra evitó la cuantificación a las 24 horas de cultivo (apartado 4.2, Figura 6)

### **3.4. DETERMINACIÓN DE PESO SECO DE BIOPELÍCULAS**

La biomasa fúngica total de las biopelículas se determinó mediante peso seco. Todo el contenido del matraz fue filtrado al vacío utilizando papel filtro Whatman No. 1 pre-pesado. La biomasa fue lavada con agua destilada y llevada al horno a 100°C durante 24 horas. El peso seco de la biomasa mixta adherida al soporte, así como la biomasa no adherida, fue calculado mediante diferencia de peso. El filtrado fue almacenado a -20°C para la posterior cuantificación de lactosa residual.

### **3.5. DETERMINACIÓN DE LACTOSA RESIDUAL**

Con el fin de determinar el consumo de lactosa por parte de las biopelículas fúngicas en el transcurso del tiempo, se cuantificó la lactosa residual en el filtrado del cultivo mediante el método de determinación de azúcares reductores de Miller (1959) siguiendo las indicaciones de la IUPAC (Ghose, 1987).

### **3.6. CUANTIFICACIÓN DE ADN TOTAL DE BIOPELÍCULAS FÚNGICAS MEDIANTE EL MÉTODO DE DIFENILAMINA**

Para comprobar la existencia de una relación proporcional entre ADN y biomasa fúngica, se cuantificó el ADN total de biopelículas mixtas usando el método de difenilamina reportado por Zhao et al. (2013) con algunas modificaciones. Las biopelículas fueron homogéneamente cortadas, lavadas con agua destilada utilizando vacío y colocadas en tubos de 5 mL. Se agregaron 4 mL de reactivo difenilamina a cada tubo y se incubó 60°C durante una hora. Se recolectó el sobrenadante y se midió su absorbancia a 595 nm.

### **3.7. EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE BIOPELÍCULAS FÚNGICAS**

La biomasa de las biopelículas fue recuperada y lavada tres veces con agua destilada estéril utilizando vacío y, seguidamente, se secó a 45°C durante dos horas usando un Concentrador Plus (Eppendorf, DE). El paso de secado garantizó que la cuantificación absoluta de biomasa no sufra el sesgo de la variabilidad en el contenido de agua entre muestras. La biomasa seca fue pulverizada con nitrógeno líquido y almacenada a -20°C hasta su uso.

Para la extracción de ADN se tomó como referencia el protocolo de Cenis (1992) con ciertas modificaciones. La lisis del micelio (1-15 mg de micelio seco; opcionalmente 50-80 mg de micelio húmedo) se llevó a cabo en microtubos de 1.5 mL con 500 µL de buffer de lisis y 200 mg de perlas de vidrio de 0.5 mm con ayuda de un vortex durante 10 min. El contenido celular se digirió con 50 µg de RNasa A durante 10 min a 37°C. Para la precipitación de proteínas y residuos celulares, se agregaron 250 µL de AcNa 3M. El ADN se precipitó con etanol a temperatura ambiente y el pellet resultante fue lavado con etanol 70% dos veces. Finalmente, el ADN se resuspendió en agua ultrapura. La composición de todos los buffers y soluciones utilizados se detallan en el Anexo 2.

La cantidad del ADN extraído se determinó mediante fluorimetría usando el kit Qubit Quant-iT dsDNA High-Sensitivity Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, US) según las indicaciones del manual, mientras que su integridad se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v). El gel se preparó a base de buffer TAE 1x mientras que las muestras se cargaron utilizando loading dye suplementado con el agente intercalante GelRed (Anexo 2). La pureza del ADN (relaciones A260/280 y A260/230) se midió espectrofotométricamente usando un Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, US). Además, como controles internos de

cuantificación absoluta de biomasa, se extrajo el ADN a partir de biomasa mixta conformada por 50% de micelio de cada hongo en cada tiempo evaluado.

### **3.8. DISEÑO DE CEBADORES PARA qPCR**

Con el fin de que las secuencias de los cebadores sean específicas para cada hongo dentro del sistema mixto de biopelículas, se descargaron las secuencias de los genes actina y  $\beta$ -tubulina de *A. niger* (actA/An15g00560, tubB/An08g03190) y de *T. reesei* (estExt\_Genewise1.C\_11839, estExt\_fgenesh1\_pm.C\_40092) desde los servidores de Aspergillus Genome Database (<http://www.aspergillusgenome.org>) y de Joint Genome Institute (<https://genome.jgi.doe.gov/Trire2/Trire2.home.html>) respectivamente. Posteriormente, se utilizó el software online de alineamiento múltiple de secuencias Clustal Omega para identificar zonas no conservadas entre los genes de ambos hongos. A partir de estas zonas se diseñaron cebadores específicos para qPCR utilizando las herramientas en línea PrimerQuest y OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies, US). La especificidad de cada par de cebadores se comprobó preliminarmente in silico con ayuda de los programas Primer-BLAST y FastPCR 6.0 utilizando como molde las secuencias de ambos genes. Para corroborar experimentalmente que los cebadores sintetizados para cada hongo fueran específicos a las dianas para las que fueron diseñados, se realizó un ensayo de qPCR (apartado 3.11) usando como molde 500 pg de ADN de biopelículas mixtas e individuales de *A. niger* y *T. reesei*. La especificidad de los cebadores se evaluó comparando las curvas de disociación de los amplicones específicos (producto de PCR generado a partir del correcto alineamiento entre un par de cebadores diseñados para un hongo determinado y su diana) con las curvas de los amplicones inespecíficos (producto de PCR generado a partir del alineamiento incorrecto entre un par de cebadores diseñados para un hongo determinado y cualquier secuencia distinta de su diana) y eventualmente con las curvas de artefactos de ADN (dímeros de cebadores).

### **3.9. ELABORACIÓN DE CURVAS ESTÁNDAR DE qPCR**

Para la cuantificación absoluta de ADN de *T. reesei* y *A. niger* en las biopelículas mixtas, se elaboraron curvas estándar de cinco puntos, cada uno de los cuales corresponde a diluciones seriadas de dos órdenes de magnitud usando proporciones conocidas de ADN mixto, según la Tabla 1. El protocolo de qPCR seguido se detalla en el apartado 3.11. Estas curvas, elaboradas para cada par de cebadores, permitieron transformar los datos de fluorescencia



(Ct) en cantidad de ADN presente en la muestra (Log ADN), por medio de las ecuaciones de regresión lineal correspondientes (apartado 3.12). La eficiencia de los cebadores (porcentaje que indica, cuando es 100%, que la concentración de ADN se duplica en cada ciclo de amplificación de PCR) fue calculada a partir de dichas ecuaciones según  $E = 10^{[-1/pendiente]}$  (descrito previamente por Pfaffl, 2004). Se consideraron únicamente aquellos pares de cebadores cuya eficiencia se situó en el rango de 90 a 110% para la curva estándar señalada (Thermo-Fisher Scientific; 2016).

**Tabla 1:** Curva estándar de qPCR para determinar la cantidad de ADN en biomasa fúngica

	<b>ADN <i>A. niger</i>/<i>T. reesei</i> (pg/pg)</b>	<b>Proporción de ADN <i>A. niger</i>/<i>T. reesei</i> (%)</b>
1	640/40	94.12/5.88
2	320/80	80/20
3	160/160	50/50
4	80/320	20/80
5	40/640	5.88/94.12

### 3.10. ELABORACIÓN DE CURVAS ESTÁNDAR DE EXTRACCIÓN DE ADN

Para transformar los datos de ADN obtenidos a partir de las curvas estándar de qPCR en biomasa, se utilizaron curvas estándar de extracción de ADN elaboradas a partir de 1, 3, 5, 10 y 15 mg de micelio seco colectado de biopelículas individuales de *A. niger* o *T. reesei* desde las 48 hasta las 120 horas de crecimiento. La cantidad total extraída de ADN en microgramos se graficó frente a los miligramos de micelio seco correspondientes. La pendiente de la ecuación de regresión lineal de cada curva corresponde al rendimiento de extracción.

### 3.11. CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA DE BIOMASA MEDIANTE qPCR

El ADN extraído a partir de muestras de biopelículas mixtas fue diluido hasta 500 pg/μL con agua ultrapura. Todas las muestras de biopelículas colectadas, junto con las diluciones seriadas de las curvas estándar, controles negativos e internos, fueron sometidos a qPCR en

una placa de 96 pocillos con tres réplicas técnicas por muestra y 500 pg de ADN total como molde para cada reacción. El ensayo se llevó a cabo en un termociclador CFX96™ Real-Time System (BioRad). El protocolo de amplificación y todas las reacciones se prepararon siguiendo las especificaciones del kit comercial Kapa SYBR® Fast qPCR Kit Master Mix (2x) Universal (Kapa), con 0,2 µM de cada cebador y 1 µL de dilución de ADN. El programa utilizado para la qPCR fue de 3 minutos de desnaturalización inicial a 95°C, seguido de 40 ciclos de desnaturalización de 3 segundos a 95°C, 20 segundos de alineamiento/extensión/recolección de datos a 60°C y al final un gradiente de 65 a 95°C con incrementos de 0.5°C cada 5 segundos para la formación de curvas de disociación.

### **3.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS**

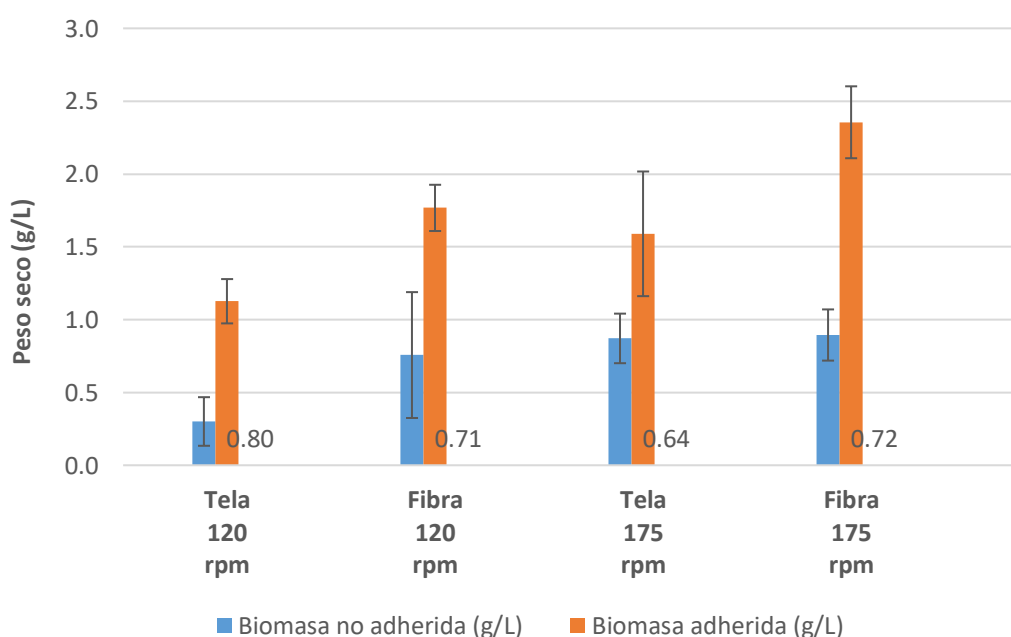
Con la ayuda del software SPSS Statistics 25 se realizaron análisis de varianza (ANOVA), comparaciones paramétricas post hoc mediante el test de Duncan y pruebas de correlación de Pearson. Los análisis de regresión lineal se procesaron en Microsoft Excel. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con un nivel de significación de 0.05 ( $\alpha=0.05$ ).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

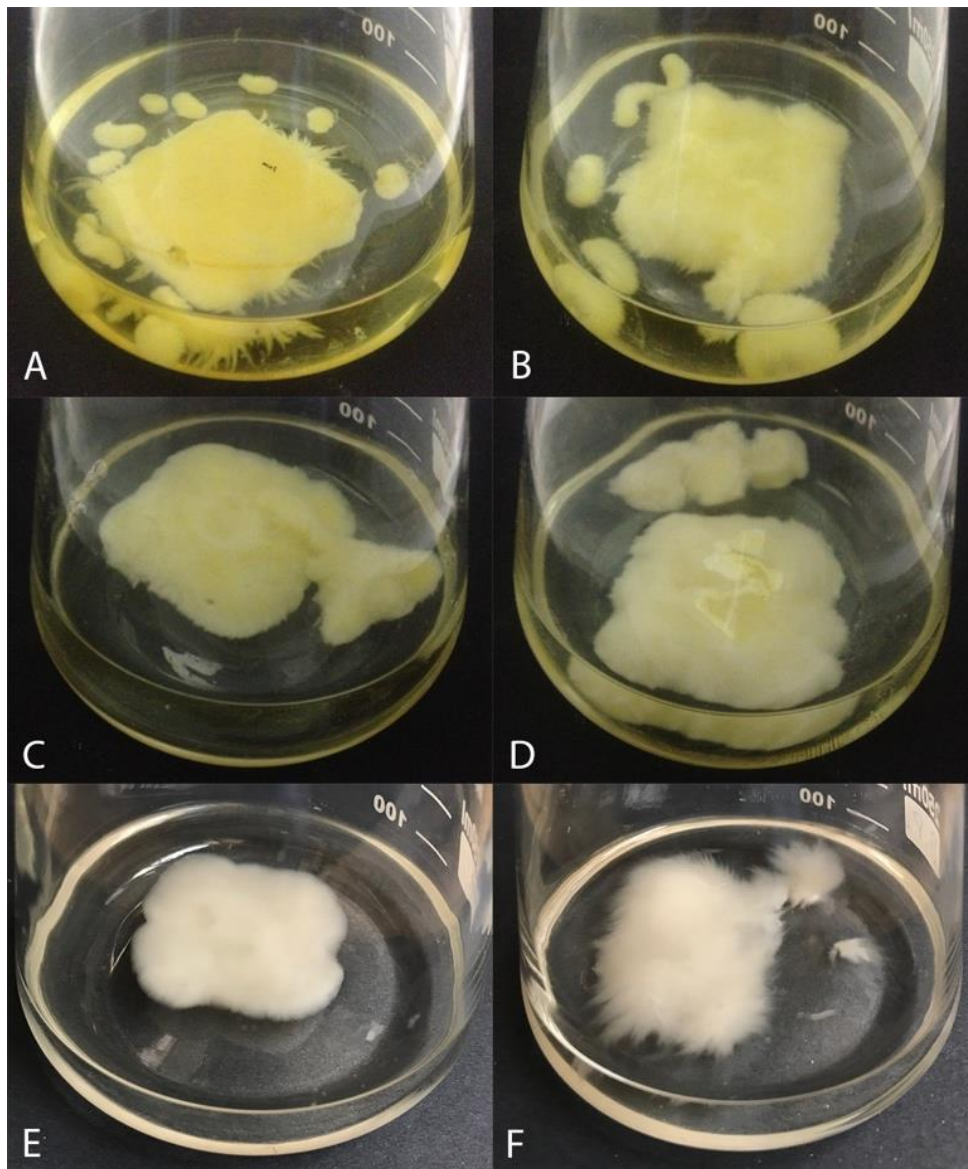
### 4.1. FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS MIXTAS DE *T. reesei* Y *A. niger*

Con el fin de mejorar la capacidad de adhesión del micelio de cada hongo sobre distintos tipos de soporte, se compararon la fibra de poliéster y la tela de poliéster. Además, para analizar si la velocidad de agitación durante la etapa de crecimiento ocasionaba el desprendimiento de micelio se compararon dos velocidades de agitación: 120 y 175 rpm. Los resultados muestran que la biomasa adherida aumentó con una velocidad de agitación de 175 rpm (Figura 3). Con los datos obtenidos, sin embargo, no fue posible determinar si el aumento de biomasa se debe a una mejora en la adhesión de esporas o a un aumento de la tasa de crecimiento del micelio adherido. Por un lado, si bien a 175 rpm se podría evitar que las esporas se aglomeren entre sí, lo que mejoraría las probabilidades de adhesión (Canteri y Ghoul, 2015), también se ha reportado que un mayor esfuerzo de corte (*shear stress*) propiciado por el aumento de la agitación fomenta el desprendimiento de las esporas de su soporte (Mercier-Bonin *et al.*, 2011; Zune *et al.*, 2015). Por otro lado, el aumento de biomasa podría explicarse por la mejora de aireación que una mayor agitación implica. Con velocidades altas de agitación se garantiza, además, la transferencia de calor y nutrientes del medio de cultivo hacia la biopelícula (Doran, 1998). Para determinar con seguridad en qué medida estos factores influyen en la formación de biopelículas se requieren estudios más profundos sobre adhesión de esporas (microscopía de fuerza atómica) y crecimiento miceliar (microscopía confocal) (revisados por Krull *et al.*, 2013) que escapan a los alcances de este trabajo. En cuanto al soporte, el micelio mostró una mayor cantidad de biomasa adherida cuando se cultivó sobre la fibra de poliéster (Figura 3). Según varios estudios, los aspectos que más influyen en la adhesión de esporas son la porosidad del material que conforma el soporte y su hidrofobicidad. Se ha reportado el uso de diferentes soportes porosos como la espuma de poliuretano (Vassilev *et al.*, 1993; Haapala *et al.*, 1994), espuma de polímeros sintéticos (Yu *et al.*, 2018), hidrogel de PVA (Tsekova *et al.*, 2010), fibras de celulosa revestida con polímeros (Kumamura *et al.*, 1989) y esponja vegetal (*luffa sponge*) (Xue *et al.*, 2015). Una mayor porosidad asegura una mayor área de contacto entre las esporas y el

soporte, lo que podría aumentar las probabilidades de adhesión (Dzionic *et al.*, 2016). Es posible que el aumento de biomasa se deba a este fenómeno, puesto que el entramado tridimensional es mayor en la fibra que en la tela de poliéster. Igualmente, esta alta porosidad podría favorecer la transferencia de masa y energía, y también aminorar el desprendimiento de la biomasa del soporte (atrapamiento pasivo) como se observa en la Figura 3 al comparar los coeficientes de adhesión entre fibra (se mantienen entre velocidades) y tela (el micelio se desprende por la mayor velocidad de agitación). Todo esto podría explicar cómo la fibra de poliéster promueve el crecimiento del micelio. Si bien el nivel de entramado podría ser un factor muy importante en la adhesión y crecimiento de la biomasa fúngica, la influencia de la hidrofobicidad del material en la formación de biopelículas no pudo ser evaluada. A diferencia de la porosidad, que es una característica intrínseca al soporte, la hidrofobicidad es dependiente del pH y la fuerza iónica del medio (El Abed *et al.*, 2011; Wargenau *et al.*, 2013), factores que varían durante el crecimiento e impiden un análisis adecuado de su influencia en la hidrofobicidad (Chatterjee *et al.*, 2016).



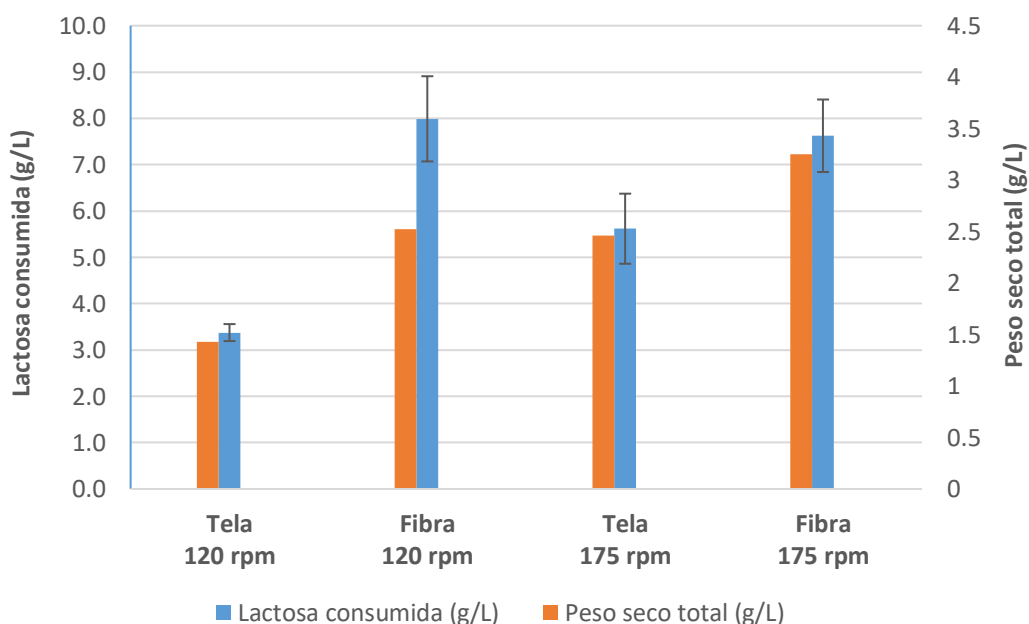
**Figura 3.** Comparación entre velocidad de agitación y soporte utilizado en biopelículas mixtas de *A. niger* y *T. reesei* a las 120 horas de crecimiento. El coeficiente de adhesión (biomasa adherida/biomasa total) se muestra al pie de cada tratamiento.



**Figura 4.** Biopelículas mixtas de *A. niger* y *T. reesei* a 120 horas de crecimiento bajo el tratamiento (A) Tela, 120 rpm; (B) Fibra, 120 rpm; (C) Tela, 175 rpm y (D) Fibra, 175 rpm. Biopelículas individuales a 72 horas de crecimiento (Fibra, 120 rpm) en las que se puede apreciar la morfología de (E) *A. niger* y (F) *T. reesei*.

Las biopelículas producidas en fibra de poliéster mostraron una apariencia mixta con zonas homogéneas y zonas filamentosas, aspecto característico de las biopelículas individuales de *A. niger* y *T. reesei* respectivamente (Figura 4E y 4F). Se ha observado previamente que, debido a la mayor capacidad de consumo de lactosa de *T. reesei* frente a *A. niger*, este último presenta una tasa de crecimiento mucho menor al usar este disacárido como fuente de carbono (Gutiérrez-Correa y Villena, 2012). Aunque tanto *A. niger* como *T. reesei* cuentan con los genes codificantes de la maquinaria enzimática para el metabolismo de lactosa (lactosa-permeasa, galactosa-permeasa,  $\beta$ -galactosidasas extracelulares e intracelulares) (Delmas *et al.*, 2012; Ivanova *et al.*, 2013), *A. niger* muestra una menor expresión de

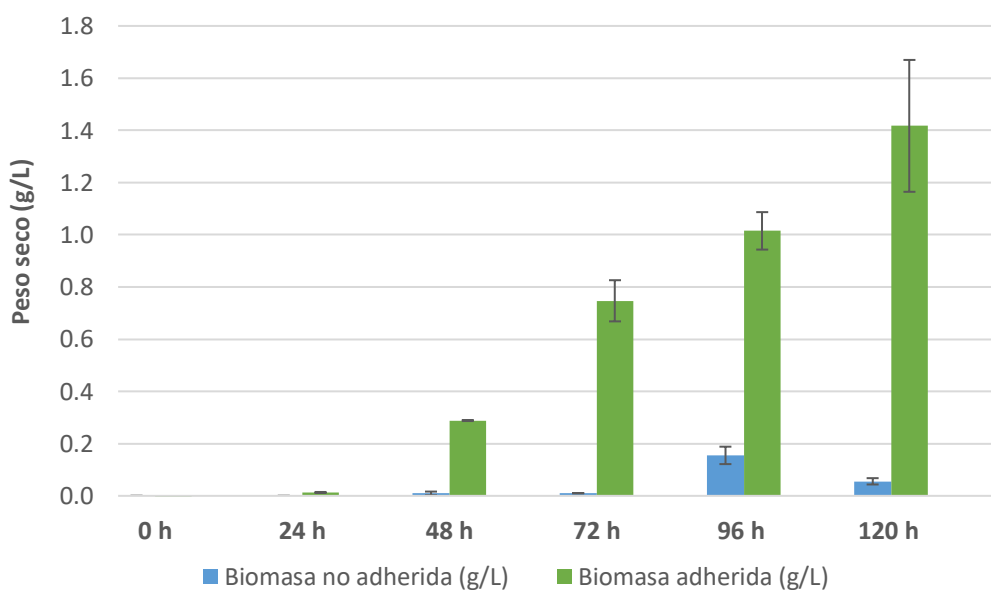
transcritos en presencia de lactosa, pues la inducción de esta maquinaria depende del estado de crecimiento y de un número reducido de inductores entre los cuales no se encuentra la lactosa (Seiboth *et al.*, 2007; Fekete *et al.*, 2012; Borin *et al.*, 2017). Sobre la base de lo anterior, es posible obtener indicios sobre la composición de la biopelícula mixta mediante la cuantificación del consumo de lactosa. Este análisis muestra que el tratamiento en fibra de poliéster a 120 rpm es el único que no se correlaciona con los datos de biomasa (Figura 3), pues muestra un nivel de consumo superior a lo sugerido por la tendencia de los datos (Figura 5). De lo anterior se concluye que el tratamiento en fibra de poliéster a 120 rpm es el que más se asemeja a una verdadera biopelícula mixta. Por esta razón, la cuantificación específica de ADN fue realizada a partir de biopelículas mixtas obtenidas de este modo.



**Figura 5.** Consumo total de lactosa de biopelículas mixtas de *A. niger* y *T. reesei* a las 120 horas de crecimiento. Concentración inicial de lactosa, 10 g/L

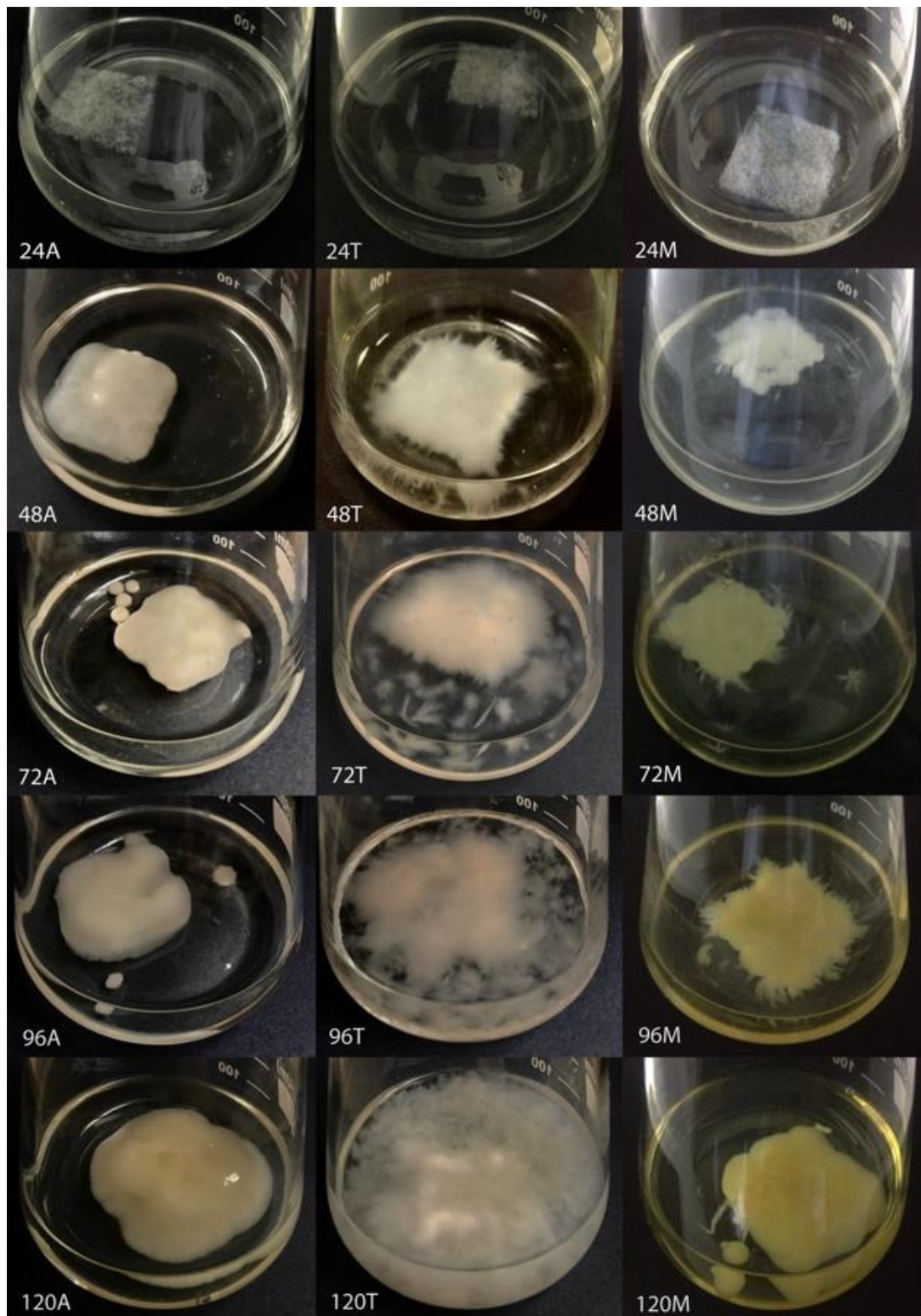
## 4.2. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE BIOPELÍCULAS MIXTAS DE *T. reesei* Y *A. niger*

Se analizó el crecimiento de la biomasa total mixta desde las cero hasta las 120 horas (Figura 6). Además, se compara el aspecto de las biopelículas mixtas con las individuales a lo largo del tiempo (Figura 7). Las biopelículas individuales de *T. reesei* se caracterizan por un micelio disperso (tienden a desprenderse mucho de su soporte), filamentoso y poco homogéneo, en especial desde las 96 horas. En contraste, las biopelículas de *A. niger*, de aspecto liso y homogéneo, mantienen su estructura compacta durante todo el crecimiento. En las biopelículas mixtas, resulta interesante notar que el desprendimiento de micelio característico de *T. reesei* no sucede, aun cuando se puede observar el aspecto filamentoso de esta especie (Figura 7, 48-120M). Esto sugiere que, en cultivo mixto con *A. niger*, (i) podría aumentar la capacidad de adhesión de *T. reesei*, o bien (ii) presentar una baja cantidad de micelio de *T. reesei* lo que evita su desprendimiento.



**Figura 6.** Consumo total de lactosa de biopelículas mixtas de *A. niger* y *T. reesei* a las 120 horas de crecimiento. Concentración inicial de lactosa, 10 g/L.





**Figura 7.** Biopelículas de *A. niger* (-A), *T. reesei* (-T) y mixtas (-M) desde 24 hasta 120 horas de crecimiento.

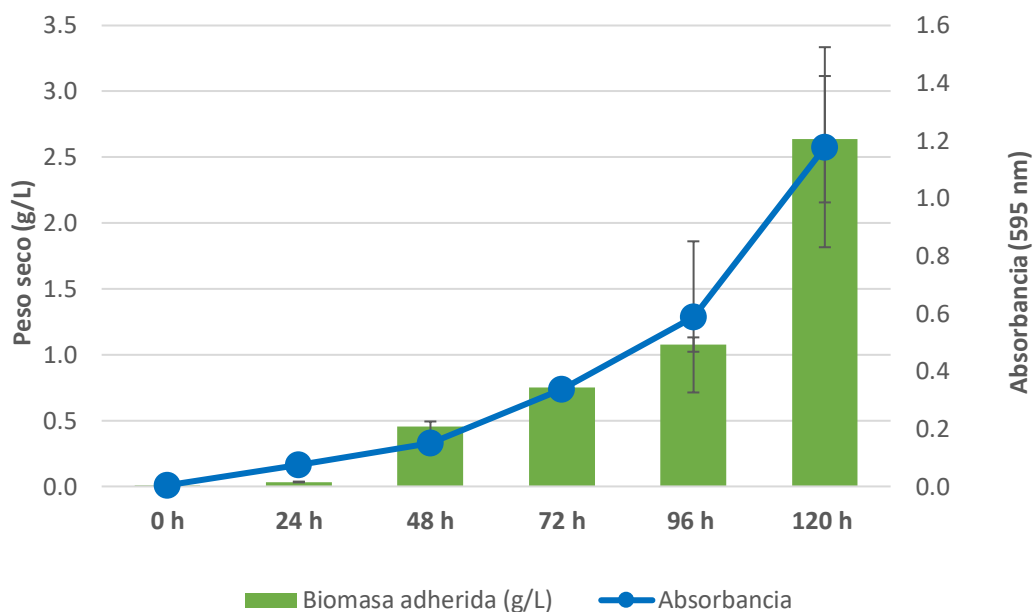
Según se observa en la Figura 7, a partir de las 72 horas, las biopelículas mixtas comenzaron a producir un pigmento amarillo que no exhibieron las biopelículas simples a excepción de las biopelículas individuales de *A. niger* tras 120 horas de cultivo. Varios pigmentos



amarillos de este hongo han sido aislados y sus estructuras determinadas, como la riboflavina, flavasperona (asperxantona), aurasperona A, B, C, asperenona (asperyelona) y asperrubrol (Frisvad *et al.*, 2018), la mayoría de los cuales han sido identificados como un grupo químico llamado nafto- $\gamma$ -pironas, la familia de metabolitos secundarios más abundante de *A. niger* (Bouras, 2007; Nielsen *et al.*, 2009). Aunque no se ha reportado la presencia de pigmentos amarillos como consecuencia del cocultivo de hongos, se ha descrito que cuando *A. niger* y *T. reesei* se cultivaron juntos, ocurrió una inducción de los genes PKS y NRPS en comparación con los cultivos individuales (Daly *et al.*, 2017), genes involucrados en la síntesis de precursores de nafto- $\gamma$ -pironas (Chiang *et al.*, 2011; Choque *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2014). Entonces, la presencia de este tipo de pigmentos en la biopelícula mixta podría estar relacionada al cocultivo de cuya naturaleza se discutirá más adelante (apartado 4.6).

#### **4.3. CORRELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACION DE ADN Y CANTIDAD DE BIOMASA MEDIANTE EL MÉTODO DE DIFENILAMINA**

La cuantificación específica de biomasa fúngica mediante qPCR presupone una relación directa entre el contenido ADN de las biopelículas y su peso seco. Con el fin de verificar esta condición, se realizó el ensayo colorimétrico de difenilamina en cada tiempo de la cinética de crecimiento. Los datos de absorbancia a 595 nm. se compararon con los de peso seco y la correlación entre ambas series de datos se comprobó usando la prueba de correlación de Pearson (Figura 8, Anexo 6). Se encontró que ambos métodos presentan una correlación alta ( $R=0.968$ ,  $\alpha=0.05$  tipo de letra) aun cuando ocurren desviaciones importantes, probablemente debidas a la absorbancia de los colorantes que las biopelículas mixtas secretaron al medio desde las 72 horas. Se ha reportado que las proteínas pueden inhibir o interferir el desarrollo del color (Burton, 1968), aspecto a considerar pues la secreción de proteínas es un aspecto común del cultivo de biopelículas. Sin embargo, se puede afirmar que existe una correlación directa entre el contenido de ADN total y el peso seco en biopelículas mixtas de *A. niger* y *T. reesei*.

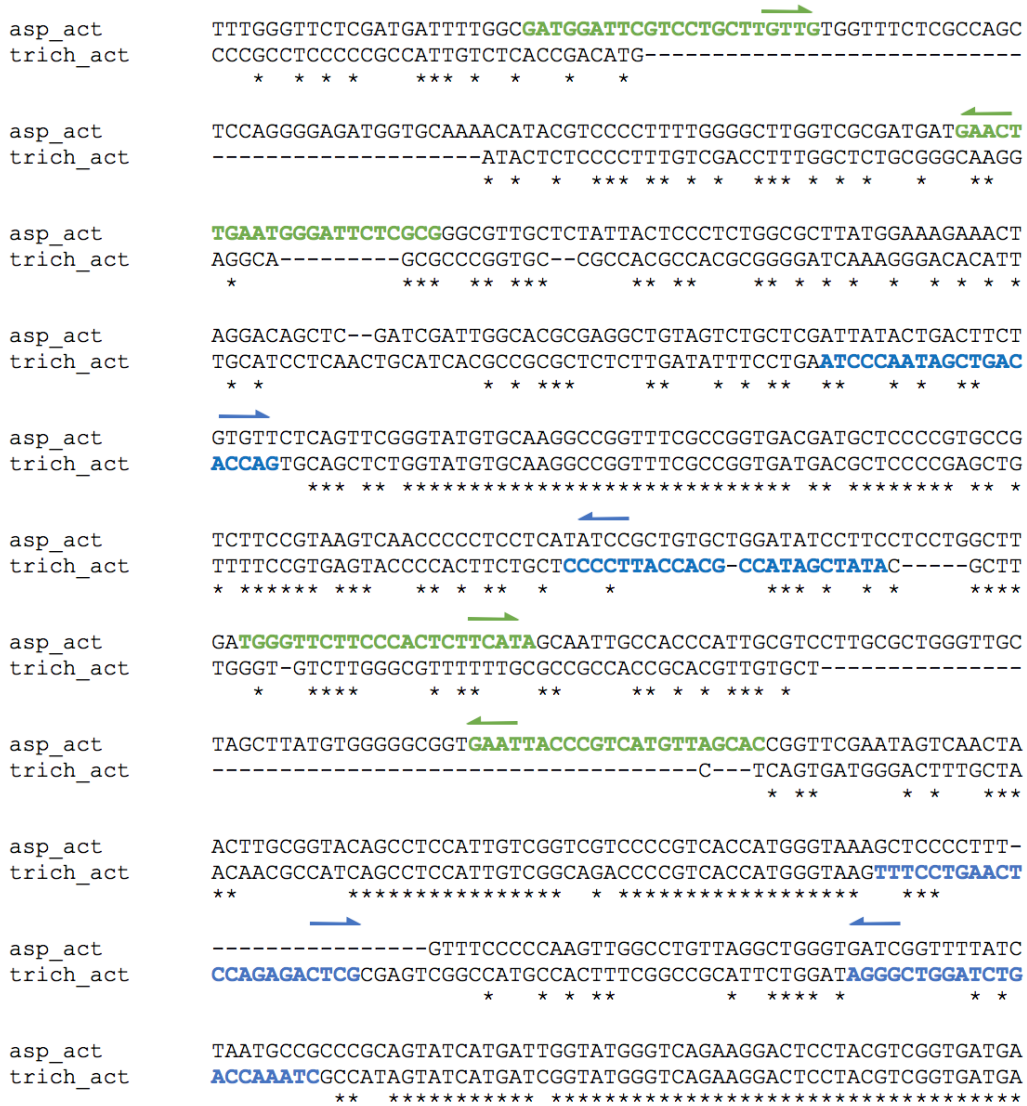


**Figura 8.** Correlación entre datos de absorbancia a 595 nm. y peso seco de biopelículas fúngicas mixtas de *A. niger* y *T. reesei*.

#### 4.4. DISEÑO Y SELECCIÓN DE CEBADORES PARA qPCR

El diseño de cebadores específicos para cada hongo partió del alineamiento de las secuencias de los genes actina y  $\beta$ -tubulina de *A. niger* y *T. reesei*, con el propósito de encontrar las zonas no conservadas para cada gen (Figura 9 y 10). Estos genes son comúnmente usados como genes de referencia (housekeeping genes) para la normalización de la expresión génica en el estudio de muchos hongos bajo diferentes condiciones de cultivo (Zhang et al., 2019). El uso de dichos genes en muchos sistemas fúngicos y la gran cantidad de información que se ha generado sobre estos genes demuestran su practicidad y confiabilidad en ensayos de cuantificación de biomasa mediante qPCR (Ge et al., 2015; Fuentes et al., 2016; Lv et al., 2017; Moisy et al., 2017). Además, los genes actina y  $\beta$ -tubulina se encuentran en una sola copia en el genoma de estos hongos (Matheucci et al., 1995; Black et al., 2013; Ettenauer et al., 2014). Los cebadores cuyas dianas se localizan en genes de una sola copia son menos susceptibles a ocasionar amplificaciones incorrectas (*mispriming*). Por el contrario, los cebadores diseñados a partir de genes multicopia, si bien muestran mayor sensibilidad,

pueden conducir a *mispriming*, considerando la gran redundancia de sus dianas tanto en hongos como en bacterias (Chern *et al.*, 2011).



**Figura 9.** Sección del alineamiento de las secuencias del gen actina de *A. niger* (asp\_act) y de *T. reesei* (trich\_act). Se muestran las secuencias de los cebadores forward y reverse (semiflechas en extremos 3') diseñados para *A. niger* (verde) y *T. reesei* (azul) sobre zonas no conservadas. La similitud de secuencias se indica con asteriscos (\*).

A partir de dichas regiones no conservadas se diseñaron los cebadores cuyos datos se muestran en la Tabla 2. Las secuencias de los cebadores fueron diseñadas considerando los parámetros estandarizados que se deben cumplir para los ensayos de qPCR (BioRad, 2006; Thermo-Fisher Scientific; 2016). Asimismo, en la medida en que fue posible, se eligieron cebadores cuyas zonas 3' no mostraran homología en al menos 2 nucleótidos con las

secuencias no conservadas, pues el consenso indica que un *mismatch* de 2 nucleótidos en el término 3' de los cebadores previene la amplificación (Ye *et al.*, 2012).



**Figura 10.** Sección del alineamiento de las secuencias del gen  $\beta$ -tubulina de *A. niger* (asp\_tubB) y de *T. reesei* (trich\_tubB). Se muestran las secuencias de los cebadores forward y reverse (semiflechas en extremos 3') diseñados para *A. niger* (verde) y *T. reesei* (azul) sobre zonas no conservadas. La similitud de secuencias se indica con asteriscos (\*). Los nucleótidos comunes entre cebadores se muestran en negritas.

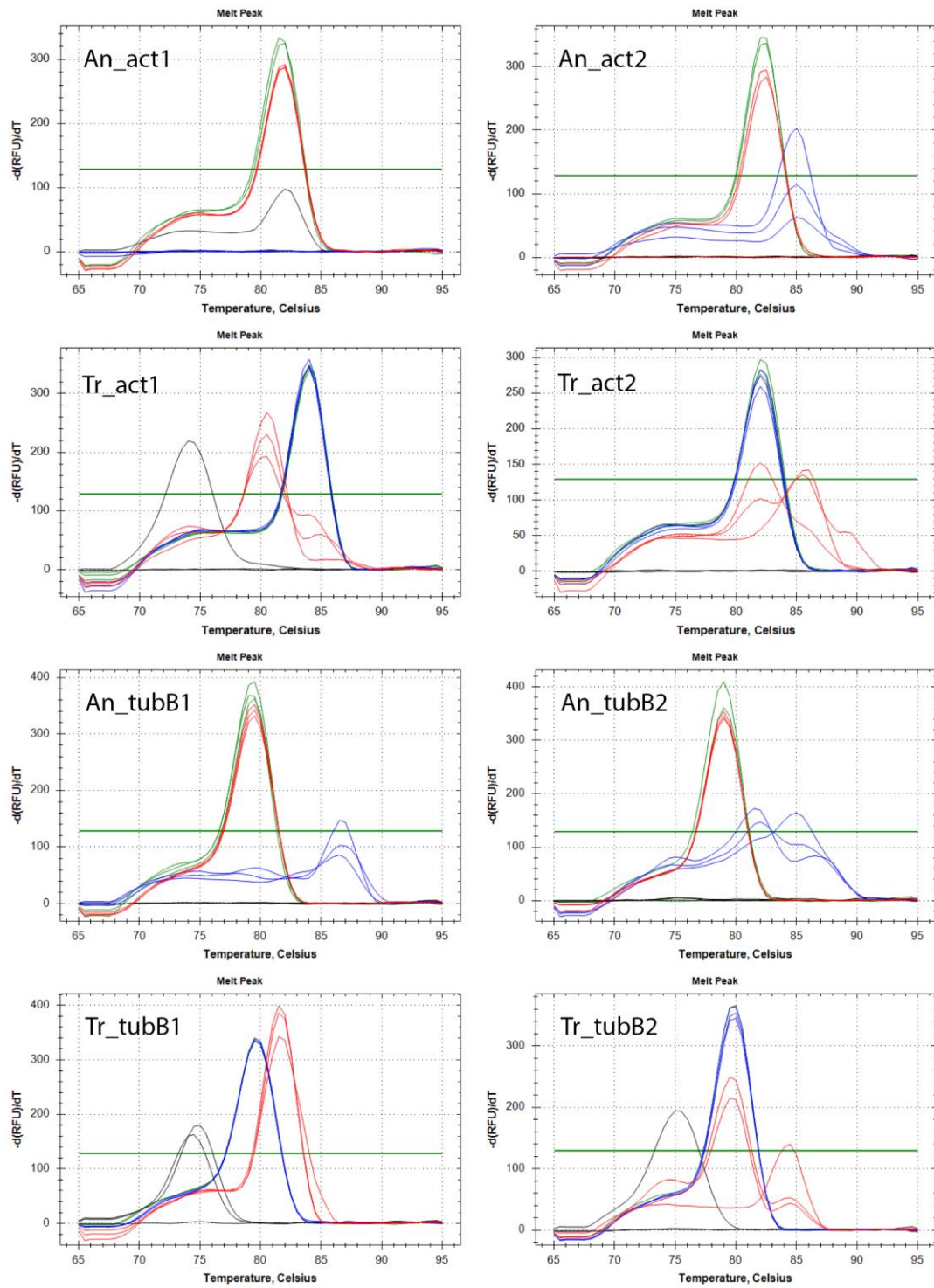
La especificidad de los cebadores se verificó experimentalmente mediante qPCR. Es importante aclarar que la especificidad de los cebadores únicamente se probó frente a *T. reesei* y *A. niger*, mas no frente a otros hongos. Por tanto, la especificidad se limita al uso de los cebadores en el método de cuantificación de biomasa mediante qPCR presentado en este trabajo. El análisis de las curvas de disociación de los amplicones generados por qPCR permitió la discriminación entre cebadores específicos (amplificación en *A. niger* y no en *T. reesei*, y viceversa) e inespecíficos. Es importante señalar que el fluoróforo SYBR Green, a causa de su inespecificidad, se une por igual a toda clase de productos de PCR, incluyendo artefactos de ADN. En este sentido, la fluorescencia detectada en una reacción de qPCR equivale a la suma de la fluorescencia del amplicón específico con la de los posibles amplicones inespecíficos o dímeros de cebadores, lo que origina una sobreestimación del

nivel de fluorescencia. Por ello, la presencia de cualquier producto o artefacto de PCR en una misma reacción con el amplicón específico se tomó como criterio para descartar cebadores inespecíficos.

De acuerdo con el nivel de fluorescencia (altura) y la temperatura máxima de la curva de disociación (pico), se pudieron identificar distintos tipos de amplicones y artefactos. Los amplicones específicos muestran picos de mayor altura, así como temperaturas altas de disociación (Figura 11). En todas las parejas de cebadores probadas, las curvas de disociación de los amplicones específicos se reproducen en las muestras mixtas (línea verde), lo que confirma la identidad de cada amplicón. Los dímeros de cebadores, debido a su reducido tamaño y gran inestabilidad, se disocian a baja temperatura, lo que resulta en picos pequeños y desplazados hacia la izquierda. En los resultados obtenidos, los dímeros de cebadores solo fueron detectados en algunos controles negativos, mas no en las curvas de disociación de los amplicones específicos, lo que no supuso ninguna clase de sobrestimación en la fluorescencia (Figura 11, Tr\_act1, Tr\_tubB1, Tr\_tubB1). Por otro lado, los eventos de mispriming son detectados por la presencia de picos con temperaturas de disociación distintas de las del amplicón específico, pero usualmente de menor tamaño (Figura 11, An\_act2, Tr\_act1, An\_tubB2, Tr\_tubB1). Tales eventos no ocasionan sobrestimación pues la presencia de los picos inespecíficos desaparece en las muestras mixtas. Es posible, no obstante, que un par de cebadores muestre afinidad no solo por su secuencia-diana, sino por cualquier otra secuencia cuyo producto de amplificación muestre características de disociación similares al amplicón específico (misma temperatura, Figura 11, Tr\_act2, An\_tubB1 y Tr\_tubB2). En estos casos, el nivel de fluorescencia proveniente del amplicón específico no se puede distinguir de la fluorescencia del amplicón inespecífico, pues en la muestra mixta el nivel de fluorescencia podría representar la suma de ambos. En la Figura 11 (Tr\_act2, An\_tubB1 y Tr\_tubB2) se observan las curvas de disociación de amplicones inespecíficos justo debajo de las curvas de amplicones específicos. Por este motivo, estos tres pares de cebadores fueron retirados del estudio

**Tabla 2:** Secuencias de cebadores usados en este trabajo. Se eligieron los cebadores que dieron positivo en la prueba de especificidad

<i>CÓDIGO</i>	<i>SECUENCIA (5' - 3')</i>	<i>TAMAÑO DEL AMPLICÓN (PB)</i>	<i>%GC DE CEBADORES</i>	<i>TAMAÑO DE CEBADORES (PB)</i>	<i>TEMPERATURA DE DISOCIACIÓN (°C)</i>	<i>ESPECIFICIDAD</i>
<i>AN_Act1</i>	<i>F: TGGGTTCTTCCCCTCTTCATA R: GTGCTAACATGACGGGTAATTC</i>	<i>99</i>	<i>F: 45.5% R: 45.5%</i>	<i>F: 22 R: 22</i>	<i>F: 62 R: 61</i>	<i>Si</i>
<i>AN_Act2</i>	<i>F: GATGGATTTCGTCCTGCTTGTTG R: CGCGAGAATCCCATTCAAGTTC</i>	<i>114</i>	<i>F: 50.0% R: 50.0%</i>	<i>F: 22 R: 22</i>	<i>F: 63 R: 63</i>	<i>Si</i>
<i>TR_Act1</i>	<i>F: ATCCCAATAGCTGACACCAG R: TATAGCTATGGCGTGTAAGGG</i>	<i>124</i>	<i>F: 50.0% R: 50.0%</i>	<i>F: 20 R: 22</i>	<i>F: 61 R: 62</i>	<i>Si</i>
<i>TR_Act2</i>	<i>F: TTTCTGAACTCCAGAGACTCG R: GATTGGTCAGATCCAGCCCT</i>	<i>79</i>	<i>F: 50.0% R: 52.4%</i>	<i>F: 22 R: 21</i>	<i>F: 63 R: 63</i>	<i>No</i>
<i>AN_TUBB1</i>	<i>F: TCCGGTGTGTAAGTGCAAC R: CTATCCTGCGTGTCAGAAGAC</i>	<i>83</i>	<i>F: 52.6% R: 52.4%</i>	<i>F: 19 R: 21</i>	<i>F: 62 R: 62</i>	<i>No</i>
<i>AN_TUBB2</i>	<i>F: GGTCTTGATTGGTGTGTTGGTG R: CTAAGAGACGATGTTCCATCCC</i>	<i>122</i>	<i>F: 47.6% R: 50.0%</i>	<i>F: 21 R: 22</i>	<i>F: 62 R: 62</i>	<i>Si</i>
<i>TR_TUBB1</i>	<i>F: CTGCAACTCTGGTGGCTTG R: TCACGAGTCAGCTTGTAAATCTC</i>	<i>75</i>	<i>F: 57.9% R: 45.5%</i>	<i>F: 19 R: 22</i>	<i>F: 63 R: 62</i>	<i>Si</i>
<i>TR_TUBB2</i>	<i>F: TGCGCCTGAGATGAGATTAC R: GCAAAGGAGGATGTAGAGGC</i>	<i>101</i>	<i>F: 50.0% R: 55.0%</i>	<i>F: 20 R: 20</i>	<i>F: 62 R: 62</i>	<i>No</i>



**Figura 11.** Curvas de disociación de los amplicones de los cebadores diseñados para genes de actina y  $\beta$ -tubulina utilizando como molde ADN proveniente de biopelículas de *A. niger* (-), *T. reesei* (-), mixtas (-) y controles negativos (-).

El análisis de las curvas de disociación, además de ayudar a determinar la especificidad de los cebadores, muestra el comportamiento de estos oligonucleótidos en presencia o ausencia de su diana. Se observó que, en ausencia de esta diana, la amplificación tiende a ser inespecífica o se induce la formación de dímeros de cebadores (Figura 11). Este fenómeno también se notó cuando el porcentaje de ADN específico se encontró por debajo de 0.39% (apartado 4.5.1). El mispriming y los dímeros de cebadores han sido reportados como consecuencia del bajo número de copias de la secuencia-diana, de la alta concentración de cebadores presente al inicio de la reacción y de las interacciones débiles que esta concentración promueve (Chou et al., 1992; Brownie et al., 1997). En presencia de su diana, las amplificaciones inespecíficas o dímeros desaparecen y los cebadores amplifican su diana, ya sea a partir de ADN específico o ADN mixto como molde, lo que se observa en la coincidencia entre los picos respectivos (An, verde y rojo; Tr, verde y azul). Por el contrario, los cebadores Tr\_act2, An\_tubB1 y Tr\_tubB2 mostraron amplificación inespecífica tanto en ausencia como en presencia de su diana, además, los amplicones resultantes mostraron la misma temperatura de disociación que los amplicones específicos (Figura 11). Esto indica que las secuencias de estos cebadores tienen afinidad por la secuencia-diana de ambos hongos, lo que explica su inespecificidad.

De los pares de cebadores específicos, se eligieron An\_act1, Tr\_act1, An\_tubB2 y Tr\_tubB1 por encontrarse en un rango de eficiencia aceptable (90-110%) (Figuras 14 y 15).

#### **4.5. CONSTRUCCIÓN DE CURVAS ESTÁNDAR DE EXTRACCIÓN DE ADN Y DE CALIBRACIÓN DE qPCR**

Para conocer la composición de ADN de cada hongo en la biopelícula mixta se requiere extrapolar los valores de Ct obtenidos tras la amplificación utilizando curvas estándar de qPCR. En segundo lugar, estos datos de ADN deben ser transformados a miligramos de biomasa de micelio individual, cálculo que requiere determinar los rendimientos de extracción de ADN. En ambos casos se necesitan curvas estándar cuya preparación debe ser cuidadosa y precisa.

##### **4.5.1. CURVAS ESTÁNDAR DE qPCR**

Los valores de Ct obtenidos tras la amplificación se transformaron en microgramos de ADN utilizando curvas estándar construidas para cada pareja de cebadores. Existen, sin embargo, diferencias en cuanto al tipo de ADN utilizado para su construcción. La elección del sistema



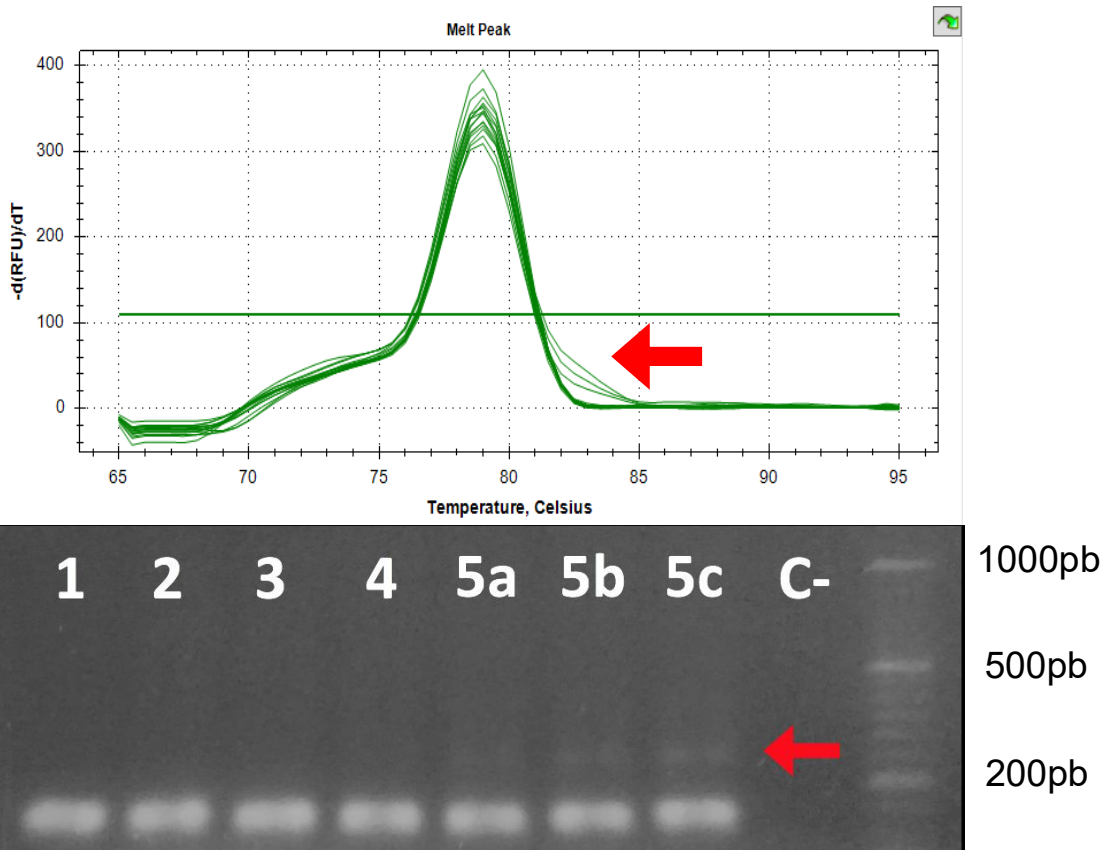
de calibración para la cuantificación absoluta mediante qPCR varía mucho entre los autores. Sin embargo, la tendencia indica que cuando la extracción de ADN de las muestras de estudio presenta rendimientos variables, bajos índices de pureza o proviene de muestras ambientales (suelo, agua) y, además, la cantidad de muestra no es una limitante, se suelen escoger curvas estándar confeccionadas a partir de ADN genómico, ya sea con diluciones seriadas de ADN purificado, o diluciones seriadas de muestra (esporas, suelo, agua) cuyo ADN se purifica posteriormente (Goebes et al., 2007; Savazzini et al., 2008; Diguta et al., 2010; Horevaj et al., 2011; Canfora et al., 2016). Por su parte, si la extracción de ADN se realiza de manera estandarizada, con altos índices de pureza y a partir de muestras menos complicadas, pero más escasas (con la finalidad de detectar pequeñas cantidades de copias de genomas), se prefiere el uso de curvas de diluciones seriadas de ADN recombinante (ADNrec, el gen objetivo integrado en un vector de clonamiento), que por lo general incluye un gen que se encuentra en múltiples copias en el genoma de la muestra (Cordier et al., 2007; López-Mondéjar et al., 2009; Li et al., 2013; Song et al., 2014). En comparación con curvas estándar elaboradas a partir de ADN recombinante, las curvas basadas en ADN genómico reflejan con mayor fidelidad las condiciones de amplificación que se esperan encontrar en las muestras mixtas, lo que permite una mayor exactitud en la cuantificación.

Otro aspecto a considerar y que influye en la cuantificación de ADN es el rango dinámico, que indica el rango dentro del cual la relación entre Ct y el logaritmo de la cantidad de ADN es lineal. Idealmente, el rango dinámico para qPCR debería ser de 7 a 8 órdenes de magnitud, en el caso de ADN recombinante, y al menos de 3 a 4 órdenes de magnitud para ADN genómico (Thermo-Fisher Scientific, 2016). Es probable que estas diferencias se deban a la proporción entre la secuencia-diana y el ADN no específico. El ADN genómico contiene muchas secuencias inespecíficas en comparación con el reducido número de copias de la secuencia diana. En estas condiciones la PCR puede saturarse fácilmente antes de alcanzar el número mínimo detectable de copias, aspecto que limita la sensibilidad de la curva estándar elaborada a partir de ADN genómico, a diferencia de ADNrec. No obstante, la naturaleza mixta del micelio que se pretende analizar y los distintos compuestos interferentes que son secretados en los sistemas individual y mixto merecen la simulación de las condiciones en las que se encontrarán las muestras de ADN durante la amplificación. Por esta razón, se determinó usar curvas estándar elaboradas a partir de ADN mixto (apartado 3.9, Tabla 1) en lugar de ADN recombinante.

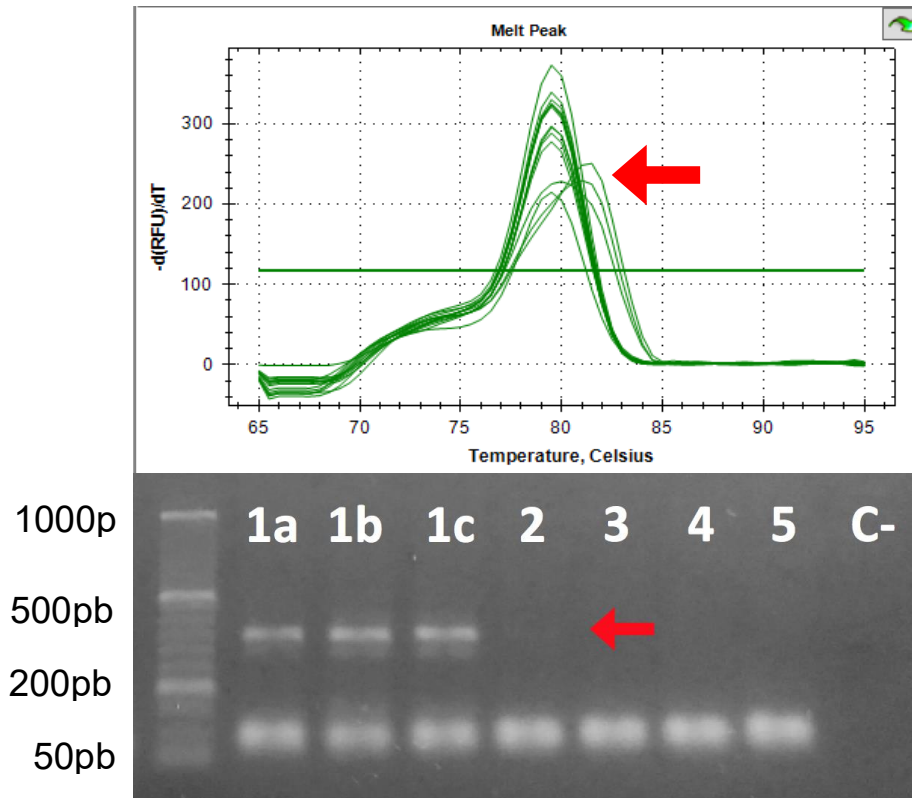
La magnitud de las diluciones seriadas a utilizar es un factor importante para analizar. Los resultados preliminares indicaron que las curvas estándar inicialmente preparadas con cinco puntos de diluciones sucesivas de 1 en 10 presentaron una eficiencia muy baja. Ante este problema, Ramakers y col. (2003) señalaron que al elaborar curvas estándar de qPCR con muestras contaminada por sales, fenol, cloroformo y/o etanol, la eficiencia fue menor de la esperada. Estos autores indicaron asimismo que, al diluir las muestras, también se diluyó la contaminación y, como consecuencia, se observó un aumento de la eficiencia con cada serie de dilución. El protocolo de extracción usado en este trabajo (Cenis, 1992), se basa en el uso de un buffer de lisis con altas concentraciones de sales que coprecipitan fácilmente con el ADN (Raeder y Broda, 1985), lo que podría explicar la baja eficiencia. Por esta razón, se intentaron realizar diluciones que abarcaran un rango menos amplio de concentraciones, de cinco órdenes de magnitud (Tabla 3). No obstante, como ya se mencionó (apartado 4.4), la baja cantidad de copias de secuencias-diana disponible para los cebadores impidió mezclar adecuadamente cantidades bajas de ADN de *A. niger* y *T. reesei* individuales sin evitar amplificaciones inespecíficas. Como se puede observar en las figuras 12 y 13, los cebadores An\_tubB2 y Tr\_tubB1 mostraron mispriming cuando la proporción de ADN específico con respecto al ADN total estuvo por debajo de 0.16% (Figura 12) e incluso 3.85% (Figura 13). Por ello, finalmente se decidió utilizar una curva mixta con diluciones de dos órdenes de magnitud que albergaran el punto de 500 pg (cantidad de ADN que se utilizó para la cuantificación de las muestras problema) (Figuras 14 y 15). Así, las curvas estándar fueron elaboradas con ADN mixto de proporción conocida (Tabla 1). Las eficiencias de los cebadores An\_tubB2 y Tr\_tubB1, dada por la pendiente de las curvas, fueron de 99.28% y 94.69%, respectivamente (n=3). Mientras que las eficiencias de An\_act1 y Tr\_act1 fueron de 98.54 y 95.23%, respectivamente (n=3)

**Tabla 3:** Curvas estándar de qPCR con diluciones de ADN de cinco ordenes de magnitud para determinación de biomasa fúngica

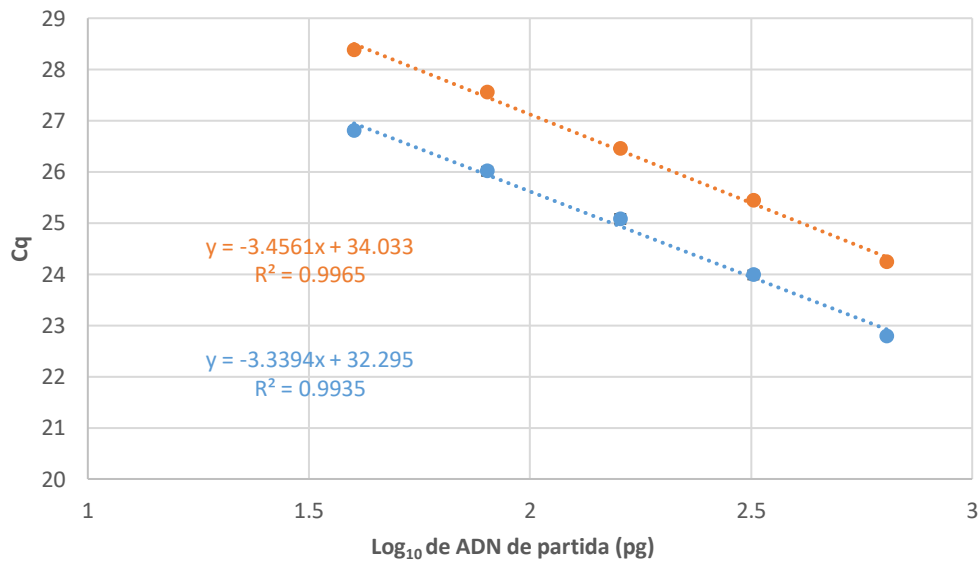
	ADN <i>A. niger</i> / <i>T. reesei</i> (pg/pg)	Proporción de ADN <i>A. niger</i> / <i>T. reesei</i> (%)
1	1597.2/2.5	99.84/0.16
2	319.4/12.7	96.15/3.85
3	63.8/63.8	50/50
4	12.7/319.4	3.85/96.15
5	2.5/1597.2	0.16/99.84



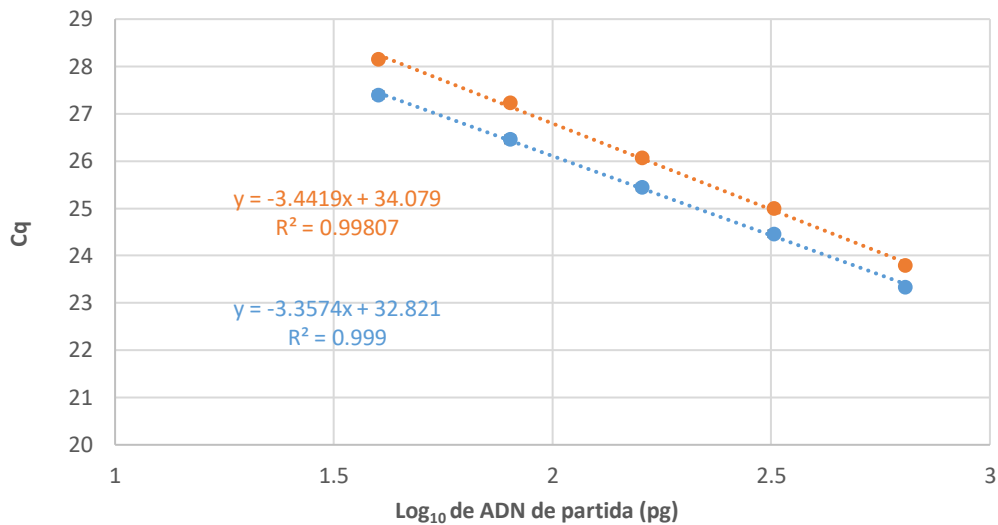
**Figura 12.** Curvas de disociación y electroforesis de los amplicones resultantes de cada punto de la curva estándar *An\_tubB2* diseñada con las proporciones (puntos 1-5) de la Tabla 3. Las flechas rojas indican los amplicones inespecíficos.



**Figura 13.** Curvas de disociación y electroforesis de los amplicones resultantes de cada punto de la curva estándar Tr\_tubB1 diseñada con las proporciones (puntos 1-5) de la Tabla 3. Las flechas rojas indican los amplicones inespecíficos.



**Figura 14.** Curvas estándar de qPCR de los cebadores An\_tubB2 (•) y Tr\_tubB1 (•) realizadas a partir de diluciones seriadas de dos órdenes de magnitud.



**Figura 15.** Curvas estándar de qPCR de los cebadores An\_act1 (•) y Tr\_act1 (•) realizadas a partir de diluciones seriadas de dos órdenes de magnitud.

#### 4.5.2. CURVAS ESTÁNDAR DE EXTRACCIÓN DE ADN

La correlación entre ADN y biomasa se obtuvo mediante la preparación de curvas estándar de extracción de ADN. Debido a la secreción de colorantes y otros compuestos que interfieren con el proceso de extracción (Karakousis et al., 2006), se obtienen diferentes valores de rendimiento a lo largo del crecimiento de las biopelículas. Por este motivo, se resolvió crear curvas estándar para cada hongo y en cada tiempo evaluado durante la cinética de crecimiento (Tabla 4). Las primeras 24 horas de crecimiento no fueron evaluadas por la insuficiencia de muestra necesaria para el cálculo de rendimientos. Estos se obtuvieron mediante la extracción de ADN a partir de cantidades crecientes de micelio seco pulverizado provenientes de biopelículas individuales de *A. niger* y *T. reesei* (apartado 3.10). Mediante regresión lineal, se obtuvieron las curvas y los rendimientos de extracción, que equivalen a las pendientes de las ecuaciones de regresión, que se muestran en el Anexo 7.

Aunque los rendimientos variaron con respecto al tiempo, lo cual ya ha sido reportado (Jin et al., 2004; Karakousis et al., 2006), los rendimientos de extracción de ADN a partir de micelio de biopelículas individuales de *T. reesei* fueron mayores que los de *A. niger*, salvo a las 120 horas de crecimiento, donde ocurrió una disminución significativa y súbita del rendimiento de extracción de ADN (Tabla 4). También se puede observar una mayor homogeneidad entre los valores de rendimiento de biopelículas de *A. niger* frente a los de *T. reesei*. Esta variación con respecto al tiempo puede ser explicada por un incremento en la deposición de melanina en la pared celular de hongos, donde usualmente se forman

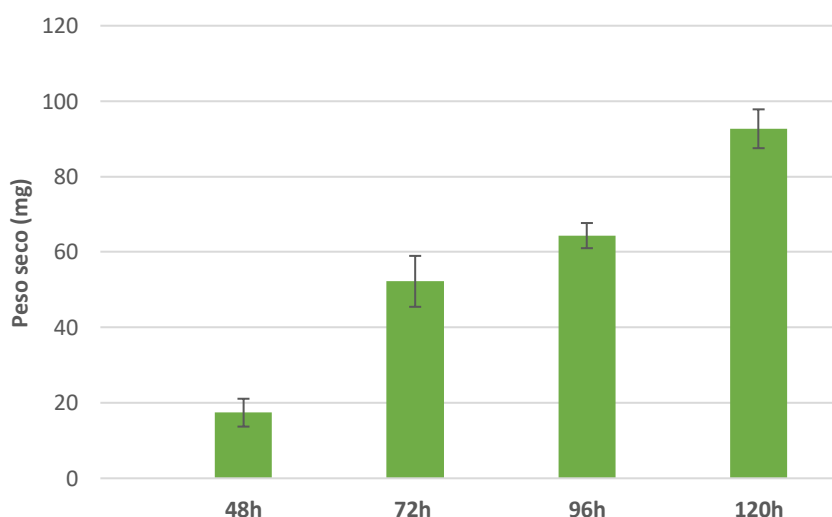
complejos con carbohidratos y proteínas, lo que incrementa la rigidez de las paredes celulares (Karakousis et al., 2006) y también se explica por la segregación de pigmentos, si bien no es tan considerable como en las biopelículas mixtas.

**Tabla 4:** Rendimientos de extracción de ADN a partir de micelio de biopelículas

<b>Hongo</b>	<b>Tiempo de crecimiento (h)</b>	<b>Rendimiento de ext. de ADN (<math>\mu\text{g}/\text{mg}</math> de micelio seco)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<i>A. niger</i>	48 h	1.24	0.995
<i>A. niger</i>	72 h	1.05	0.994
<i>A. niger</i>	96 h	1.03	0.995
<i>A. niger</i>	120 h	1.18	0.994
<i>T. reesei</i>	48 h	1.69	0.999
<i>T. reesei</i>	72 h	2.16	0.997
<i>T. reesei</i>	96 h	1.91	0.998
<i>T. reesei</i>	120 h	0.97	0.993

#### 4.6. CUANTIFICACIÓN ESPECÍFICA DE BIOMASA MIXTA DE *A. niger* Y *T. reesei* MEDIANTE qPCR

Para aplicar el método de cuantificación específica, se determinó la cinética de crecimiento de biopelículas mixtas (Figura 16) y se recuperó la biomasa desde las 48 hasta las 120 horas de crecimiento. Debido al escaso crecimiento e insuficiente micelio seco para la extracción de ADN, se realizó un pool de las muestras recolectadas a las 48 horas. El ADN genómico mixto obtenido mostró una buena integridad y pureza (Anexos 8 y 9). Para garantizar exactitud en la cuantificación, se agregaron controles internos (C72-C120) conformados por 50% de micelio de cada hongo para evaluar el error producido en todo el ensayo de cuantificación específica de biomasa. La cuantificación de estos controles mostró un error de 7% utilizando los cebadores del gen actina y 6.2% con el gen  $\beta$ -tubulina con respecto al valor real de biomasa seca.



**Figura 16.** Cinética de crecimiento biopelículas mixtas de *A. niger* y *T. reesei* (n=5). Biomasa adherida (■).

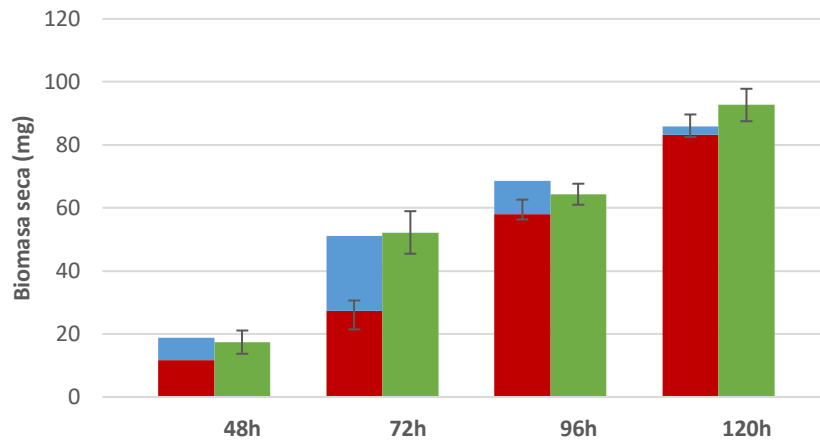
Parte de esta inexactitud en la cuantificación de biomasa también puede ser explicada por la imposibilidad de que las curvas de extracción de ADN se asemejen completamente a las condiciones de crecimiento de las biopelículas mixtas, lo que se refleja en desviaciones de los rendimientos calculados (por lo menos a partir de las 72 horas en biopelículas individuales de *A. niger*). Tomando en cuenta esta limitación, algunos autores han reportado el contenido de biomasa en cocultivos de manera indirecta en términos de proporción de ADN medido por qPCR (Arfi *et al.*, 2013; Benoit-Gelber *et al.*, 2017); sin embargo, este enfoque sacrifica exactitud por simplicidad en la ejecución, pues las proporciones de ADN genómico en una muestra mixta no siempre se corresponden con las proporciones de

biomasa mixta, debido a las diferencias entre rendimientos de extracción que cada micelio exhibe (apartado 4.5.2). Por otra parte, Chatterjee y *et al.* (2016) utilizaron un método de cuantificación de biomasa basado en la densitometría de patrones de fragmentos de restricción específicos (similar a RFLP), lo que implica que, además de no someter a los datos a una corrección por rendimientos de extracción de ADN y de restricción, estos datos, al ser amplificados por PCR, no necesariamente muestran una relación proporcional con el ADN de partida. Por el contrario, existen referencias que desarrollaron su método de cuantificación de biomasa específica con base en correcciones de rendimientos de extracción para cada hongo del cocultivo (Jonkers *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2014), e incluso evalúan el efecto del sustrato en dichos rendimientos (Daly *et al.*, 2017). En este trabajo, se presenta un método corregido que considera no solo las diferencias inherentes entre los rendimientos de extracción de ADN genómico específicos de la especie, sino también los cambios naturales en la composición del micelio a lo largo del tiempo, como el depósito de melanina y el endurecimiento de la pared celular (Karakousis *et al.* 2006), o secreción de pigmentos relacionados con el estrés como resultado del cultivo mixto. En resumen, la decisión de desarrollar un método muy exacto de cuantificación específica de biomasa en un sistema mixto depende del objeto de estudio y de su efecto sobre los factores que deben ser controlados para lograr una mayor exactitud.

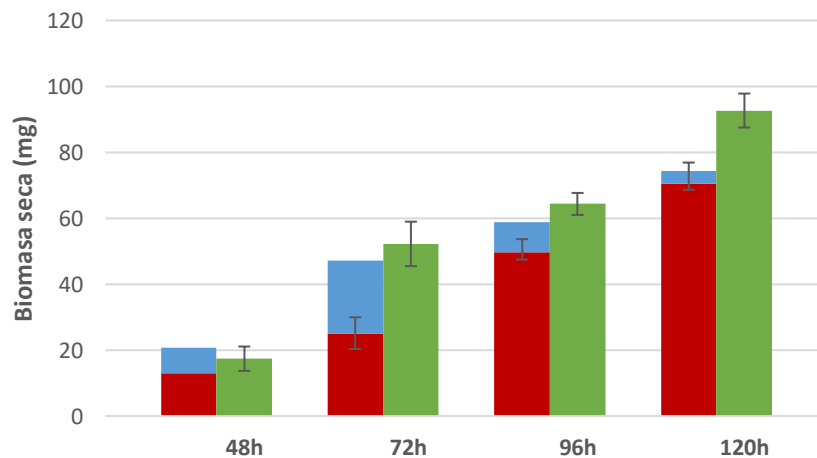
La cuantificación absoluta de biomasa mediante la correlación de ADN desarrollada en el presente trabajo sugiere que en el sistema de biopelículas mixtas existe una interacción competitiva entre *A. niger* y *T. reesei*, pues este último hongo fue desplazado casi por completo de las biopelículas por el micelio de *A. niger* a las 120 horas (Figura 17 y 18). La relación entre la biomasa total determinada por peso seco y estimada por qPCR en las biopelículas mixtas muestra una correlación estadísticamente significativa, según el coeficiente de Pearson (Anexos 10 y 11). Aunque es notoria la desviación del valor real de biomasa, particularmente en la cuantificación mediante el gen  $\beta$ -tubulina, la abundancia relativa no muestra variación entre ambos genes usados para la cuantificación (Tabla 5), pues la correlación de Pearson muestra un coeficiente de 1 (Anexo 12), lo que indica que existió una mayor fuente de error en la correlación ADN-biomasa que en la cuantificación en sí de ADN por qPCR. Además, se observó que entre las 48 y 72 horas, el micelio de *T. reesei* triplicó su peso, mientras que *A. niger* sólo lo duplicó; no obstante, a partir de ese tiempo el micelio de *T. reesei* dejó de desarrollarse y disminuyó, mientras que *A. niger* continuó su crecimiento. Se ha visto en experimentos previos realizados en placas duales



que la velocidad de crecimiento de *T. reesei* es superior a la velocidad de *A. niger*, lo que explicaría el mayor desarrollo inicial (Daly *et al.*, 2017). Pese a sus limitaciones de crecimiento, *A. niger* mostró una mayor competencia a partir de las 72 horas (que coincide con el cambio de coloración) logrando desplazar a *T. reesei* de la biopelícula, lo que coincide con reportes en los que el *fitness* (conjunto de propiedades que aumentan la supervivencia, proliferación y/o transmisión de un organismo dentro de un nicho ecológico específico, Preston *et al.*, 1998), mostrado por *A. niger* es superior al de otros hongos (Kolasa *et al.*, 2014; Chatterjee *et al.*, 2016). Todo lo anterior sugiere que la “predominancia” de *A. niger* (o la incompatibilidad con *T. reesei*) no puede ser explicada sólo por la velocidad de crecimiento, sino que resulta necesario considerar una compleja interacción basada en proteínas y metabolitos secretados por cada hongo que subyace tras el funcionamiento y desarrollo de estas biopelículas mixtas.



**Figura 17.** Abundancia relativa promedio de micelio de biopelículas mixtas de *A. niger* (■) y *T. reesei* (■), con respecto al peso registrado (■) cuantificado con el gen actina.



**Figura 18.** Abundancia relativa promedio de micelio de biopelículas mixtas de *A. niger* (■) y *T. reesei* (■), con respecto al peso registrado (■) cuantificado con el gen  $\beta$ -tubulina.

**Tabla 5:** Porcentaje de abundancia relativa de *A. niger* y *T. reesei* en biopelículas mixtas

	<b>Porcentaje de biomasa <i>A. niger</i>/<i>T. reesei</i> (actina)</b>	<b>Porcentaje de biomasa <i>A. niger</i>/<i>T. reesei</i> (<math>\beta</math>-tubulina)</b>
48 horas	61.8/38.2	62.1/37.8
72 horas	53.6/46.4	53.3/46.7
96 horas	84.4/15.6	84.5/15.5
120 horas	96.9/3.1	94.8/5.2

Como ya se mencionó anteriormente, las biopelículas mixtas empezaron a producir pigmentos amarillos a partir de las 72 horas de cultivo, a diferencia de las biopelículas individuales, que solamente en *A. niger* desarrollaron la misma coloración, pero desde las 120 horas, mientras que las de *T. reesei* no exhibieron coloración en ninguna etapa del crecimiento (Figuras 4 y 7). La producción temprana de pigmentos en las biopelículas mixtas de *A. niger* y *T. reesei* podría indicar un cambio en el perfil transcriptómico de este sistema con respecto a los monocultivos. Muchos autores han comparado la respuesta de los cultivos mixtos de hongos filamentosos con los respectivos cultivos individuales, sin embargo, los resultados muestran una gran variación, a tal punto que la producción de un mismo metabolito (por ejemplo, fumonisina B1) bajo las mismas condiciones de cultivo puede verse inhibida en *Fusarium proliferatum* cuando se cocultiva con *F. graminearum* (Velluti *et al.*, 2000), pero no es afectada en cocultivo con *A. parasiticus* (Marín *et al.*, 2001).

En general, las interacciones entre hongos pueden ser de antagonismo o cooperación, lo que depende mucho del repertorio genético de las especies que se enfrentan y compiten por los mismos nutrientes (*fitness*) (Gutiérrez-Correa *et al.*, 1999; Chatterjee *et al.*, 2016). Las interacciones competitivas usualmente conducen al desplazamiento de uno de los hongos (Jonkers *et al.*, 2012; Arfi *et al.*, 2013; Chatterjee *et al.*, 2016; Hiscox *et al.*, 2018), mientras que las cooperativas crecen de manera estable (Benoit-Gelber *et al.*, 2017). La comparación de muchos hongos en cocultivo muestra que la relación competitiva que mantienen no es estrictamente jerárquica pues, debido a las distintas estrategias de defensa y ataque que son capaces de desarrollar, una especie A puede desplazar a otra B, B a C, pero C puede desplazar

a A (Chatterjee *et al.*, 2016; Hiscox *et al.*, 2018). El costo energético que supone la ejecución y mantenimiento de todos estos procesos biológicos plantea además un impedimento para el crecimiento normal de los hongos de un cultivo mixto, y puede representar la predominancia de una especie si dicho costo no es bien administrado. En concreto, las estrategias de antagonismo consisten en la síntesis de metabolitos secundarios antifúngicos, enzimas degradadoras de pared celular, sideróforos, control del pH del medio, entre otros; mientras que la defensa se basa en enzimas detoxificadoras (glutatión S-transferasa, oxidorreductasas, monooxigenasas), transportadores de eflujo ABC de membrana, enzimas involucradas en el crecimiento y toma de nutrientes (pues consumir más sustrato es una forma de retardar el crecimiento del competidor), entre otros (Jonkers *et al.*, 2012; Arfi *et al.*, 2013; Chatterjee *et al.*, 2016; Benoit-Gelber *et al.*, 2017; Daly *et al.*, 2017), y muchas otras estrategias cuyo descubrimiento aún aguarda. Se ha visto que la acidificación del medio es un mecanismo de interferencia que exhibe *A. niger* (Chatterjee *et al.*, 2016; Benoit-Gelber *et al.*, 2017); esta estrategia podría haber sido una de las determinantes en el desplazamiento de *T. reesei* fuera de las biopelículas mixtas por parte de *A. niger*.

## V. CONCLUSIONES

- Es posible estimar de manera específica la biomasa en el sistema de biopelículas mixtas de *A. niger* y *T. reesei* utilizando qPCR. Aun cuando es posible mejorar la exactitud de la técnica propuesta, la estimación de la proporción de micelio en la biopelícula mixta es útil y confiable, y podrían aportar nuevas hipótesis sobre las interacciones de los hongos en los cultivos mixtos.
- La técnica desarrollada en este estudio para estimar la proporción de micelio de *A. niger* y *T. reesei* pudo revelar un desplazamiento de *T. reesei* y una predominancia de *A. niger* hacia las 72 horas de crecimiento en las biopelículas mixtas de estas especies.
- La formación de biopelículas sobre fibra de poliéster puede aumentar la proporción de micelio adherido sobre el soporte en comparación con la tela de poliéster.
- Con los protocolos de extracción de ADN genómico convencionales que se basan en el uso de sales y precipitación por alcohol, como el utilizado en este estudio, se puede conseguir ADN de pureza suficiente para ser usados exitosamente en ensayos tan sensibles como qPCR.
- Es posible diseñar cebadores específicos y aplicarlos en la cuantificación de biomasa fúngica. Sin embargo, una baja concentración de secuencias-diana en las muestras puede conducir a amplificaciones inespecíficas o formación de dímeros de cebadores.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- La técnica desarrollada en este trabajo se puede emplear, asimismo, en otros sistemas de cultivo, como fermentación sumergida o en sustrato sólido, diferentes especies fúngicas y también sobre diferentes tipos de soporte.
- Se recomienda también realizar una correlación entre proporciones de biomasa fúngica y actividad enzimática, en distintos sistemas de cultivo con el objeto de optimizar los procesos de producción de enzimas celulasas.
- Para mejorar el control y predictibilidad de la formación de biopelículas mixtas, resulta necesario el estudio de la adhesión. Con este fin, podrían modelarse la unión y disociación de esporas sobre la matriz para conocer qué parámetros son clave en el proceso de adhesión.
- Para confirmar estos resultados se recomiendan métodos alternativos de estimación de biomasa fúngica, por ejemplo, el uso de marcadores ligados genéticamente (GFP, RFP) para estimar la biomasa fúngica en términos de fluorescencia; o métodos de secuenciamiento de barcodes especie-específicos en sistemas mixtos para estimar la biomasa fúngica en términos de reads.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Adham, N. Z., & Ahmed, E. M. (2009). Extracellular lipase of *Aspergillus niger* NRRL3; production, partial purification and properties. *Indian Journal of Microbiology*, 49(1), 77-83.
- Aerts, F., De Brabander, M., Van den Bossche, H., Van Cutsem, J., & Borgers, M. (1980). The Activity of Ketoconazole in Mixed Cultures of Fungi and Human Fibroblasts: Die Wirkung von Ketoconazol in Mischkulturen von Pilzen und menschlichen Fibroblasten. *Mycoses*, 23(2), 53-67.
- Ahamed, A., & Vermette, P. (2008). Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* LMA grown as fed batch in a stirred tank bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 42(1), 41-46.
- Albertsson, A. C. (1978). Biodegradation of synthetic polymers. II. A limited microbial conversion of  $^{14}\text{C}$  in polyethylene to  $^{14}\text{CO}_2$  by some soil fungi. *Journal of Applied Polymer Science*, 22(12), 3419-3433.
- Albuquerque, P., & Casadevall, A. (2012). Quorum sensing in fungi—a review. *Medical mycology*, 50(4), 337-345.
- Andersen, M. R., Salazar, M. P., Schaap, P. J., van de Vondervoort, P. J., Culley, D., Thykaer, J., ... & Baker, S. E. (2011). Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88. *Genome research*, 21(6), 885-897.
- Arfi, Y., Levasseur, A., & Record, E. (2013). Differential gene expression in *Pycnoporus coccineus* during interspecific mycelial interactions with different competitors. *Applied and environmental microbiology*, 79(21), 6626-6636.
- Bajpai, P. (2016). *Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production*. Capítulo 2: Structure of Lignocellulosic Biomass. *Springer Briefs in Green Chemistry for Sustainability*. Springer. pp. 7-12.

- Baker, S. E. (2006). *Aspergillus niger* genomics: Past, present and into the future. *Medical Mycology* 44:S17–S21.
- Balser, T. C., Treseder, K. K., & Ekenler, M. (2005). Using lipid analysis and hyphal length to quantify AM and saprotrophic fungal abundance along a soil chronosequence. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(3), 601-604.
- Barclay, M., Hart, A., Knowles, C. J., Meeussen, J. C., & Tett, V. A. (1998). Biodegradation of metal cyanides by mixed and pure cultures of fungi. *Enzyme and microbial technology*, 22(4), 223-231.
- Barriuso, J., Hogan, D. A., Keshavarz, T., & Martínez, M. J. (2018). Role of quorum sensing and chemical communication in fungal biotechnology and pathogenesis. *FEMS microbiology reviews*, 42(5), 627-638.
- Bauer, F. F., Govender, P., & Bester, M. C. (2010). Yeast flocculation and its biotechnological relevance. *Applied microbiology and biotechnology*, 88(1), 31-39.
- Behera, S. S., & Ray, R. C. (2016). Solid state fermentation for production of microbial cellulases: recent advances and improvement strategies. *International journal of biological macromolecules*, 86, 656-669.
- Benoit-Gelber, I., Gruntjes, T., Vinck, A., Van Veluw, J. G., Wösten, H. A., Boeren, S., ... & De Vries, R. P. (2017). Mixed colonies of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* cooperatively degrading wheat bran. *Fungal Genetics and Biology*, 102,31-37.
- Bertrand, S., Bohni, N., Schnee, S., Schumpp, O., Gindro, K., & Wolfender, J. L. (2014). Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnology advances*, 32(6), 1180-1204.
- Yu, B., Zhang, X., Sun, W., Xi, X., Zhao, N., Huang, Z., ... & Ying, H. (2018). Continuous citric acid production in repeated-fed batch fermentation by *Aspergillus niger* immobilized on a new porous foam. *Journal of biotechnology*, 276, 1-9.
- Bio-Rad, L. (2006). Real-time PCR applications guide. Hercules: Bio-Rad Laboratories Inc, 41.
- Black, J., Dean, T., Byfield, G., Foarde, K., & Menetrez, M. (2013). Determining fungi rRNA copy number by PCR. *Journal of biomolecular techniques: JBT*, 24(1), 32-38.

- Borin, G. P., Sanchez, C. C., de Santana, E. S., Zanini, G. K., Dos Santos, R. A. C., de Oliveira Pontes, A., ... & de Castro Oliveira, J. V. (2017). Comparative transcriptome analysis reveals different strategies for degradation of steam-exploded sugarcane bagasse by *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*. *BMC genomics*, 18(1), 1-21.
- Boudalia, S., Belloir, C., Miller, M. L., & Canivenc-Lavier, M. C. (2017). Early endocrine disruptors exposure acts on 3T3-L1 differentiation and endocrine activity. *BioImpacts: BI*, 7(2), 83.
- Bouras, N., Mathieu, F., Coppel, Y., Strelkov, S. E., & Lebrihi, A. (2007). Occurrence of naphtho-gamma-pyrones-and ochratoxin A-producing fungi in French grapes and characterization of new naphtho-gamma-pyrone polyketide (aurasperone G) isolated from *Aspergillus niger* C-433. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(22), 8920-8927.
- Brownie, J., Shawcross, S., Theaker, J., Whitcombe, D., Ferrie, R., Newton, C., & Little, S. (1997). The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic acids research*, 25(16), 3235-3241.
- Burton, K. (1968). Determination of DNA concentration with diphenylamine. In *Methods in enzymology*, 12:163-166
- Canfora, L., Malusà, E., Tkaczuk, C., Tartanus, M., Łabanowska, B. H., & Pinzari, F. (2016). Development of a method for detection and quantification of *B. brongniartii* and *B. bassiana* in soil. *Scientific Reports*, 6(1), 1-10
- Canteri, H., & Ghoul, M. (2015). Submerged liquid culture for production of biomass and spores of *Penicillium*. *Food Reviews International*, 31(3), 262-278.
- C Capote, N., Pastrana, A. M., Aguado, A., & Sánchez-Torres, P. (2012). Molecular Tools for Detection of Plant Pathogenic Fungi and Fungicide Resistance. In Cumagun, C.J. Ed. *Plant Pathology*, Intech, Rijeka, HR. , 151-202.
- Cenis, J. L. (1992). Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic acids research*, 20(9), 2380.
- Chatterjee, S., Kuang, Y., Splivallo, R., Chatterjee, P., & Karlovsky, P. (2016). Interactions among filamentous fungi *Aspergillus niger*, *Fusarium verticillioides* and *Clonostachys rosea*: fungal biomass, diversity of secreted metabolites and fumonisin production. *BMC Microbiology*, 16(1), 1-13.



- Chen, L., Zou, G., Wang, J., Wang, J., Liu, R., Jiang, Y., Zhao, G. & Zhou, Z. (2016). Characterization of the Ca<sup>2+</sup>-responsive signaling pathway in regulating the expression and secretion of cellulases in *Trichoderma reesei* Rut-C30. *Molecular Microbiology*, 100(3), 560-575.
- Chern, E. C., Siefring, S., Paar, J., Doolittle, M., & Haugland, R. A. (2011). Comparison of quantitative PCR assays for *Escherichia coli* targeting ribosomal RNA and single copy genes. *Letters in applied microbiology*, 52(3), 298-306.
- Chi, M. H., Park, S. Y., & Lee, Y. H. (2009). A quick and safe method for fungal DNA extraction. *The Plant Pathology Journal*, 25(1), 108-111.
- Chiang, Y. M., Meyer, K. M., Praseuth, M., Baker, S. E., Bruno, K. S., & Wang, C. C. (2011). Characterization of a polyketide synthase in *Aspergillus niger* whose product is a precursor for both dihydroxynaphthalene (DHN) melanin and naphtho- $\gamma$ -pyrone. *Fungal Genetics and Biology*, 48(4), 430-437.
- Choque, E., El Rayess, Y., Raynal, J., & Mathieu, F. (2015). Fungal naphtho- $\gamma$ -pyrones—secondary metabolites of industrial interest. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(3), 1081-1096.
- Chou, Q., Russell, M., Birch, D. E., Raymond, J., & Bloch, W. (1992). Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic acids research*, 20(7), 1717-1723.
- Coi, A. L., Bigey, F., Mallet, S., Marsit, S., Zara, G., Gladieux, P., Galeote, V., Budroni, M., Dequin, S. & Legras, J. L. (2017). Genomic signatures of adaptation to wine biological ageing conditions in biofilm-forming flor yeasts. *Molecular ecology*, 26(7), 2150-2166.
- GALEOTE, V; BUDRONI, M; DEQUIN, S; LEGRAS, JL. (2017). Genomic signatures of adaptation to wine biological ageing conditions in biofilm-forming flor yeasts. *Molecular Ecology* 26:2150-2166.
- Cordier, C., Edel-Hermann, V., Martin-Laurent, F., Blal, B., Steinberg, C., & Alabouvette, C. (2007). SCAR-based real time PCR to identify a biocontrol strain (T1) of *Trichoderma atroviride* and study its population dynamics in soils. *Journal of microbiological methods*, 68(1), 60-68.
- Daly, P., van Munster, J. M., Kokolski, M., Sang, F., Blythe, M. J., Malla, S., ... & Archer,

- D. B. (2017). Transcriptomic responses of mixed cultures of ascomycete fungi to lignocellulose using dual RNA-seq reveal inter-species antagonism and limited beneficial effects on CAZyme expression. *Fungal Genetics and Biology*, 102, 4-21.
- DeFlaun, M. F., Paul, J. H., & Davis, D. (1986). Simplified method for dissolved DNA determination in aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(4), 654-659.
- Delmas, S., Pullan, S. T., Gaddipati, S., Kokolski, M., Malla, S., Blythe, M. J., ... & Archer, D. B. (2012). Uncovering the genome-wide transcriptional responses of the filamentous fungus *Aspergillus niger* to lignocellulose using RNA sequencing. *PLoS Genetics* 88:e1002875.
- Diguta, C. F., Rousseaux, S., Weidmann, S., Bretin, N., Vincent, B., Guilloux-Benatier, M., & Alexandre, H. (2010). Development of a qPCR assay for specific quantification of *Botrytis cinerea* on grapes. *FEMS microbiology letters*, 313(1), 81-87.
- DIJKSTERHUIS, J. & WÖSTEN, H. eds. (2013=). *Development of Aspergillus niger. Studies in Mycology* 74.
- Dische, Z. (1930). Über einige neue charakteristische Farbreaktionen der Thymonukleinsäure und eine Mikromethode zur Bestimmung derselben in tierischen Organen mit Hilfe dieser Reaktionen. *Mikrochemie*, 8(1), 4-32.
- Dolezal, A. L., Obrian, G. R., Nielsen, D. M., Woloshuk, C. P., Boston, R. S., & Payne, G. A. (2013). Localization, morphology and transcriptional profile of *Aspergillus flavus* during seed colonization. *Molecular Plant Pathology* 149:898-909.
- Doran, P. M. (1998). *Principios de ingeniería de los bioprocesos*. Trad. F.J. García Labiano. Zaragoza, E.S., Acribia. 480 p.
- Dubey, M. K., Jensen, D. F., & Karlsson, M. (2014). Hydrophobins are required for conidial hydrophobicity and plant root colonization in the fungal biocontrol agent *Clonostachys rosea*. *BMC Microbiology* 14:18.
- Duenas, R., Tengerdy, R. P., & Gutierrez-Correa, M. (1995). Cellulase production by mixed fungi in solid-substrate fermentation of bagasse. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11(3), 333-337.

- Duff, S. J., Cooper, D. G., & Fuller, O. M. (1985). Cellulase and beta-glucosidase production by mixed culture of *Trichoderma reesei* RUT C30 and *Aspergillus phoenicis*. *Biotechnology letters*, 7(3), 185-190.
- Dziona, A., Wojcieszńska, D., & Guzik, U. (2016). Natural carriers in bioremediation: A review. *Electronic Journal of Biotechnology*, 23, 28-36.
- El Abed, S.; Ibsouda, S.K.; Latrache, H.; Meftah, H.; Tahri, N.J.; Hamadi, F. (2012). Environmental Scanning Electron Microscopy characterization of the adhesion of conidia from *Penicillium expansum* to cedar wood substrata at different pH values. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1707-1713.
- Abd-Elzaher, F. H., & Fadel, M. (2010). Production of bioethanol via enzymatic saccharification of rice straw by cellulase produced by *Trichoderma reesei* under solid state fermentation. *New York Sci*, 3(4), 72-78.
- Epstein, L., & Nicholson, R. (2016). Adhesion and adhesives of fungi and oomycetes. In *Biological adhesives* (pp. 25-55). 2 ed. Springer, Cham, CH. 378 p.
- Ettenauer, J., Piñar, G., Tafer, H., & Sterflinger, K. (2014). Quantification of fungal abundance on cultural heritage using real time PCR targeting the  $\beta$ -actin gene. *Frontiers in microbiology*, 5, 262.
- Fang, H., Zhao, C., & Song, X. Y. (2010). Optimization of enzymatic hydrolysis of steam-exploded corn stover by two approaches: Response surface methodology or using cellulase from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* NL02. *Bioresource technology*, 101(11), 4111-4119.
- Fanning, S., & Mitchell, A. P. (2012). Fungal biofilms. *PLoS pathogens*, 8(4), e1002585.
- Farinas, C. S. (2015). Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 52, 179-188.
- Fekete, E., de Vries, R. P., Seiboth, B., vanKuyk, P. A., Sándor, E., Fekete, É., Metz, B. & Karaffa, L. (2012). D-Galactose uptake is nonfunctional in the conidiospores of *Aspergillus niger*. *FEMS microbiology letters*, 329(2), 198-203.
- Frisvad, J. C., Larsen, T. O., Thrane, U., Meijer, M., Varga, J., Samson, R. A., & Nielsen, K. F. (2011). Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. *Plos one*, 6(8), e23496.

- Frisvad, J. C., Møller, L. L., Larsen, T. O., Kumar, R., & Arnau, J. (2018). Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(22), 9481-9515. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9354-1>.
- Fuentes, A., Ortiz, J., Saavedra, N., Salazar, L. A., Meneses, C., & Arriagada, C. (2016). Reference gene selection for quantitative real-time PCR in *Solanum lycopersicum* L. inoculated with the mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 101, 124-131.
- Fujie, T., Murakami, M., Yoshida, E., Tachinami, T., Shinkai, Y., Fujiwara, Y., ... & Kaji, T. (2016). Copper diethyldithiocarbamate as an activator of Nrf2 in cultured vascular endothelial cells. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 21(2), 263-273.
- Gamarra, N. N., Villena, G. K., & Gutiérrez-Correa, M. (2010). Cellulase production by *Aspergillus niger* in biofilm, solid-state, and submerged fermentations. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(2), 545-551.
- Gams, W. & Bissett, J. (1998). Morphology and identification of *Trichoderma*. In Kubicek, CP; Harman, GE. Eds. *Trichoderma and Gliocladium: Basic biology, taxonomy and genetics*. Taylor & Francis, London, UK. v. 2, 278 p.
- Garcia-Carrizo, F., Priego, T., Szostaczuk, N., Palou, A., & Picó, C. (2017). Sexual dimorphism in the age-induced insulin resistance, liver steatosis, and adipose tissue function in rats. *Frontiers in physiology*, 8, 445.
- Ge, B. B., Cheng, Y., Liu, Y., Liu, B. H., & Zhang, K. C. (2015). Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants using *Streptomyces ahygroscopicus* strain CK-15. *Letters in applied microbiology*, 61(6), 596-602.
- Gessner, M. O., Bauchrowitz, M. A., & Escautier, M. (1991). Extraction and quantification of ergosterol as a measure of fungal biomass in leaf litter. *Microbial Ecology*, 22(1), 285-291.
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and applied Chemistry*, 59(2), 257-268.
- Goebes, M. D., Hildemann, L. M., Kujundzic, E., & Hernandez, M. (2007). Real-time PCR for detection of the *Aspergillus* genus. *Journal of Environmental Monitoring*, 9(6),

599-609.

- Gravelat, F. N., Ejzykowicz, D. E., Chiang, L. Y., Chabot, J. C., Urb, M., Macdonald, K. D., ... & Sheppard, D. C. (2010). *Aspergillus fumigatus* MedA governs adherence, host cell interactions and virulence. *Cellular microbiology*, 12(4), 473-488.
- Green, A. J., Littlejohn, K. A., Hooley, P., & Cox, P. W. (2013). Formation and stability of food foams and aerated emulsions: Hydrophobins as novel functional ingredients. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 18(4), 292-301.
- Groot, P. W. de, Bader, O., de Boer, A. D., Weig, M., & Chauhan, N. (2013). Adhesins in human fungal pathogens: glue with plenty of stick. *Eukaryotic cell*, 12(4), 470-481.
- Gutierrez-Correa, M., & Tengerdy, R. P. (1997). Production of cellulase on sugar cane bagasse by fungal mixed culture solid substrate fermentation. *Biotechnology Letters*, 19(7), 665-667.
- Gutierrez-Correa, M., Portal, L., Moreno, P., & Tengerdy, R. P. (1999). Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse. *Bioresource Technology*, 68(2), 173-178.
- Gutierrez-Correa, M., & Villena, G. K. (2003). Surface cellulose fermentation: a new fermentation category. *Revista Peruana de Biología* 102:113-124.
- Gutiérrez-Correa, M., & Villena, G. K. (2010). Characteristics and Techniques of Fermentation Systems. In Pandey, A; Soccol, CR; Larroche, C; Gnansounou, E; Nigam-Singh, P. Eds. *Comprehensive Food Fermentation and Biotechnology*. Asiatech Publisher, New Delhi, IN. 400 p.
- Gutiérrez-Correa, M., Ludeña, Y., Ramage, G., & Villena, G. K. (2012). Recent advances on filamentous fungal biofilms for industrial uses. *Applied biochemistry and biotechnology*, 167(5), 1235-1253.
- Gutiérrez-Correa, M., & Villena, G. K. (2012). Batch and repeated batch cellulase production by mixed cultures of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* or *Aspergillus phoenicis*. *J. Microbiol. Biotechnol. Res*, 2, 929-935.
- Haapala, R., Linko, S., Parkkinen, E., & Suominen, P. (1994). Production of endo-1, 4- $\beta$ -glucanase and xylanase by *Trichoderma reesei* immobilized on polyurethane foam. *Biotechnology techniques*, 8(6), 401-406.

- Hansen, G. H., Lübeck, M., Frisvad, J. C., Lübeck, P. S., & Andersen, B. (2015). Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: comparison of solid state and submerged fermentation. *Process Biochemistry*, 50(9), 1327-1341.
- Harding, M. W., Marques, L. L., Howard, R. J., & Olson, M. E. (2009). Can filamentous fungi form biofilms?. *Trends in microbiology*, 17(11), 475-480.
- Harmsen, P. F., Huijgen, W., Bermudez, L., & Bakker, R. (2010). Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass (No. 1184).
- Wageningen University & Research Centre, WUR-FBR, NL.
- Hill, B. T., & Whatley, S. (1975). A simple, rapid microassay for DNA. *Febs Letters*, 56(1), 20-23.
- Hiscox, J., O'leary, J., & Boddy, L. (2018). Fungus wars: basidiomycete battles in wood decay. *Studies in mycology*, 89, 117-124.
- Horevaj, P., Milus, E. A., & Bluhm, B. H. (2011). A real-time qPCR assay to quantify *Fusarium graminearum* biomass in wheat kernels. *Journal of applied microbiology*, 111(2), 396-406.
- Ijoma, G. N., & Tekere, M. (2017). Potential microbial applications of co-cultures involving ligninolytic fungi in the bioremediation of recalcitrant xenobiotic compounds. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 14(8), 1787-1806.
- Irfan, M., Gulsher, M., Abbas, S., Syed, Q., Nadeem, M., & Baig, S. (2011). Effect of various pretreatment conditions on enzymatic saccharification. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, 33(4):397-404.
- Ivanova, C., Bååth, J. A., Seiboth, B., & Kubicek, C. P. (2013). Systems analysis of lactose metabolism in *Trichoderma reesei* identifies a lactose permease that is essential for cellulase induction. *PloS one*, 8(5), e62631.
- Iwashita, K. (2002). Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94(6), 530-535.
- Iwashita, K., Shimoi, H., & Ito, K. (2001). Extracellular soluble polysaccharide (ESP) from *Aspergillus kawachii* improves the stability of extracellular  $\beta$ -glucosidases (EX-1 and EX-2) and is involved in their localization. *Journal of bioscience and*

bioengineering, 91(2), 134-140.

- Jin, J., Lee, Y. K., & Wickes, B. L. (2004). Simple chemical extraction method for DNA isolation from *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(9), 4293-4296.
- Joergensen, R. G., & Wichern, F. (2008). Quantitative assessment of the fungal contribution to microbial tissue in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(12), 2977-2991.
- Jonkers, W., Rodriguez Estrada, A. E., Lee, K., Breakspear, A., May, G., & Kistler, H. C. (2012). Metabolome and transcriptome of the interaction between *Ustilago maydis* and *Fusarium verticillioides* *in vitro*. *Applied and environmental microbiology*, 78(10), 3656-3667.
- Karakousis, A., Tan, L., Ellis, D., Alexiou, H., & Wormald, P. J. (2006). An assessment of the efficiency of fungal DNA extraction methods for maximizing the detection of medically important fungi using PCR. *Journal of microbiological methods*, 65(1), 38-48.
- Khalesi, M., Gebruers, K., & Derdelinckx, G. (2015). Recent advances in fungal hydrophobin towards using in industry. *The protein journal*, 34(4), 243-255.
- Kissane, J. M., & Robins, E. (1958). The fluorometric measurement of deoxyribonucleic acid in animal tissues with special reference to the central nervous system. *Journal of Biological Chemistry*, 233(1), 184-188.
- Kolasa, M., Ahring, B. K., Lübeck, P. S., & Lübeck, M. (2014). Co-cultivation of *Trichoderma reesei* RutC30 with three black *Aspergillus* strains facilitates efficient hydrolysis of pretreated wheat straw and shows promises for on-site enzyme production. *Bioresource technology*, 169, 143-148.
- Kozera, B., & Rapacz, M. (2013). Reference genes in real-time PCR. *Journal of applied genetics*, 54(4), 391-406.
- Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. *Frontiers in microbiology*, 8, 108.
- Krijghsheld, P., Bleichrodt, R. V., Van Veluw, G. J., Wang, F., Müller, W. H., Dijksterhuis, J., & Wösten, H. A. B. (2013). Development in *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 74:1-29.

- Krishania, M., Sindhu, R., Binod, P., Ahluwalia, V., Kumar, V., Sangwan, R. S., & Pandey, A. (2018). Design of bioreactors in solid-state fermentation. In Pandey, A.; Larroche, C.; Soccol, C. Eds. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Current Advances in Solid-State Fermentation*. Elsevier, Ámsterdan, NL. (pp. 83-96).
- Krull, R., Wucherpennig, T., Esfandabadi, M. E., Walisko, R., Melzer, G., Hempel, D. C., ... & Wittmann, C. (2013). Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, 163(2), 112-123.
- Kubicek, C. P., Komon-Zelazowska, M., & Druzhinina, I. S. (2008). Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. *Journal of Zhejiang University Science B*, 9(10), 753-763.
- Kuhad, R. C., Gupta, R., & Singh, A. (2011). *Microbial cellulases and their industrial applications*. Enzyme research, 2011.
- Kumakura, M., Kanno, S., & Nisizawa, K. (1989). Cellulase production in *Trichoderma reesei* immobilized with polymeric fibrous carriers. *Canadian journal of microbiology*, 35(10), 968-971.
- Kumar, V., Marín-Navarro, J., & Shukla, P. (2016). Thermostable microbial xylanases for pulp and paper industries: trends, applications and further perspectives. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(2), 34.
- Lau, A. P., Lee, A. K., Chan, C. K., & Fang, M. (2006). Ergosterol as a biomarker for the quantification of the fungal biomass in atmospheric aerosols. *Atmospheric Environment*, 40(2), 249-259.
- Li, W. C., Huang, C. H., Chen, C. L., Chuang, Y. C., Tung, S. Y., & Wang, T. F. (2017). *Trichoderma reesei* complete genome sequence, repeat-induced point mutation, and partitioning of CAZyme gene clusters. *Biotechnology for biofuels*, 10(1), 1-20.
- Li, Y., Gao, L., Ding, Y., Xu, Y., Zhou, M., Huang, W., ... & Yu, L. (2013). Establishment and application of real-time quantitative PCR for diagnosing invasive aspergillosis via the blood in hematological patients: targeting a specific sequence of *Aspergillus* 28S-ITS2. *BMC infectious diseases*, 13(1), 1-9.
- Liu, R., Chen, L., Jiang, Y., Zou, G., & Zhou, Z. (2017). A novel transcription factor



- specifically regulates GH11 xylanase genes in *Trichoderma reesei*. *Biotechnology for biofuels*, 10(1), 1-14.
- Lu, S., Tian, J., Sun, W., Meng, J., Wang, X., Fu, X., ... & Zhou, L. (2014). Bis-naphtho- $\gamma$ -pyrones from fungi and their bioactivities. *Molecules*, 19(6), 7169-7188.
- Lo, V. C., Ren, Q., Pham, C. L., Morris, V. K., Kwan, A. H., & Sunde, M. (2014). Fungal hydrophobin proteins produce self-assembling protein films with diverse structure and chemical stability. *Nanomaterials*, 4(3), 827-843.
- Lohse, M. B., Gulati, M., Johnson, A. D., & Nobile, C. J. (2018). Development and regulation of single-and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 16(1), 19-31.
- López-Mondéjar, R., Antón, A., Raidl, S., Ros, M., & Pascual, J. A. (2010). Quantification of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* with real-time TaqMan PCR and its potential extrapolation to the hyphal biomass. *Bioresource technology*, 101(8), 2888-2891.
- Ly, X. C., Jia, R. B., Chen, J. H., Zhou, W. B., Li, Y., Xu, B. X., ... & Ni, L. (2017). Development of Reverse Transcription Quantitative Real-Time PCR (RT-qPCR) Assays for Monitoring *Saccharomycopsis fibuligera*, *Rhizopus oryzae*, and *Monascus purpureus* During the Traditional Brewing of Hong Qu Glutinous Rice Wine. *Food Analytical Methods*, 10(1), 161-171.
- McCarthy, M. W., Denning, D. W., & Walsh, T. J. (2017). Future research priorities in fungal resistance. *The Journal of infectious diseases*, 216(suppl\_3), S484-S492.
- Madhu, A., & Chakraborty, J. N. (2017). Developments in application of enzymes for textile processing. *Journal of cleaner production*, 145, 114-133.
- Marín, S., Albareda, X., Ramos, A. J., & Sanchis, V. (2001). Impact of environment and interactions of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* with *Aspergillus parasiticus* on fumonisin B1 and aflatoxins on maize grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(11), 1060-1068.
- Matcham, S. E., Jordan, B. R., & Wood, D. A. (1985). Estimation of fungal biomass in a solid substrate by three independent methods. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 21(1), 108-112.
- Matheucci Jr, E., Henrique-Silva, F., El-Gogary, S., Rossini, C. H. B., Leite, A., Vera, J. E.,

- ... & El-Dorry, H. (1995). Structure, organization and promoter expression of the actin-encoding gene in *Trichoderma reesei*. *Gene*, 161(1), 103-106.
- Mercier-Bonin, M., Dehouche, A., Morchain, J., & Schmitz, P. (2011). Orientation and detachment dynamics of *Bacillus* spores from stainless steel under controlled shear flow: modelling of the adhesion force. *International journal of food microbiology*, 146(2), 182-191.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Mirmajlessi, S. M., Loit, E., Maend, M., & Mansouripour, S. M. (2015). Real-time PCR applied to study on plant pathogens: potential applications in diagnosis-a review. *Plant Protection Science*, 51(4), 177-190.
- Mitchell, K. F., Zarnowski, R., & Andes, D. R. (2016). The extracellular matrix of fungal biofilms. In Imbert, C. Ed. *Fungal Biofilms and related infections. Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health*. Springer, Cham, CH. v. 3, 130 p.
- Moisy, C., Berger, G., Flutre, T., Le Cunff, L., & Péros, J. P. (2017). Quantitative assessment of grapevine wood colonization by the dieback fungus *Eutypa lata*. *Journal of Fungi*, 3(2), 21.
- Morris, V. K., Kwan, A. H., & Sunde, M. (2013). Analysis of the structure and conformational states of DewA gives insight into the assembly of the fungal hydrophobins. *Journal of molecular biology*, 425(2), 244-256.
- Nevalainen, H., Suominen, P., & Taimisto, K. (1994). On the safety of *Trichoderma reesei*. *Journal of Biotechnology*, 37(3), 193-200.
- Nielsen, K. F., Mogensen, J. M., Johansen, M., Larsen, T. O., & Frisvad, J. C. (2009). Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 395(5), 1225-1242.
- Nylund, J. E., & Wallander, H. (1992). 5 Ergosterol Analysis as a Means of Quantifying Mycorrhizal Biomass. *Methods in microbiology*, 24, 77-88.
- Oda, K., Kakizono, D., Yamada, O., Iefuji, H., Akita, O., & Iwashita, K. (2006). Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged

- and solid-state culture conditions. *Applied and environmental microbiology*, 72(5), 3448-3457.
- Olsson, P. A., Bååth, E., Jakobsen, I., & Söderström, B. (1995). The use of phospholipid and neutral lipid fatty acids to estimate biomass of arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Mycological Research*, 99(5), 623-629.
- Ortiz-Urquiza, A., & Keyhani, N. O. (2013). Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects*, 4(3), 357-374.
- Paloheimo, M., Haarmann, T., Mäkinen, S., & Vehmaanperä, J. (2016). Production of industrial enzymes in *Trichoderma reesei*. In *Gene expression systems in fungi: advancements and applications* (pp. 23-57). Springer, Cham.
- Paul, S., Ludeña, Y., Villena, G. K., Yu, F., Sherman, D. H., & Gutiérrez-Correa, M. (2017). High-quality draft genome sequence of a biofilm forming lignocellulolytic *Aspergillus niger* strain ATCC 10864. *Standards in genomic sciences*, 12(1), 1-8.
- Pawlowsky, U., & Howell, J. A. (1973). Mixed culture biooxidation of phenol. I. Determination of kinetic parameters. *Biotechnology and Bioengineering*, 15(5), 889-896.
- Pel, H. J., de Winde, J. H., Archer, D. B., Dyer, P. S., Hofmann, G., Schaap, P. J., ... & Stam, H. (2007). Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature biotechnology*, 25(2), 221-231.
- Peterson, R., & Nevalainen, H. (2012). *Trichoderma reesei* RUT-C30—thirty years of strain improvement. *Microbiology*, 158(1), 58-68.
- Pettit, R. K. (2009). Mixed fermentation for natural product drug discovery. *Applied microbiology and biotechnology*, 83(1), 19-25.
- Pfaffl, M. W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. In Bustin, SA. Ed. *A-Z of quantitative PCR*, 1, 89-113.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and food spoilage*. 2 ed. Chapman & Hall, London, UK. 598 p.
- Preston, G. M., Haubold, B., & Rainey, P. B. (1998). Bacterial genomics and adaptation to life on plants: implications for the evolution of pathogenicity and symbiosis. *Current opinion in microbiology*, 1(5), 589-597.

- Raeder, U., & Broda, P. (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1(1), 17-20.
- Ramage, G., Mowat, E., Jones, B., Williams, C., & Lopez-Ribot, J. (2009). Our current understanding of fungal biofilms. *Critical reviews in microbiology*, 35(4), 340-355.
- Ramage, G., Rajendran, R., Gutierrez-Correa, M., Jones, B., & Williams, C. (2011). *Aspergillus* biofilms: clinical and industrial significance. *FEMS microbiology letters*, 324(2), 89-97.
- Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, R. H. L., & Moorman, A. F. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience letters*, 339(1), 62-66.
- Ramana, J., & Gupta, D. (2010). FaaPred: a SVM-based prediction method for fungal adhesins and adhesin-like proteins. *PLoS One*, 5(3), e9695.
- Reeta Rani, S., & Rajeev Kumar, S. (2011). Beta-Glucosidase from *Aspergillus niger* NII 08121-Molecular Characterization and Applications in Bioethanol production. Doctoral dissertation. Cochin University of Science and Technology. Kerala, India.
- Ren, Q., Kwan, A. H., & Sunde, M. (2013). Two forms and two faces, multiple states and multiple uses: Properties and applications of the self-assembling fungal hydrophobins. *Peptide Science*, 100(6), 601-612.
- Savazzini, F., Longa, C. M. O., Pertot, I., & Gessler, C. (2008). Real-time PCR for detection and quantification of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* strain SC1 in soil. *Journal of microbiological methods*, 73(2), 185-194.
- Schnürer, J. (1993). Comparison of methods for estimating the biomass of three food-borne fungi with different growth patterns. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(2), 552-555.
- Seiboth, B., Pakdaman, B. S., Hartl, L., & Kubicek, C. P. (2007). Lactose metabolism in filamentous fungi: how to deal with an unknown substrate. *Fungal Biology Reviews*, 21(1), 42-48.
- Sheppard, D. C. (2011). Molecular mechanism of *Aspergillus fumigatus* adherence to host constituents. *Current opinion in microbiology*, 14(4), 375-379.
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., & Azeredo, J. (2011).

- Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. Trends in microbiology, 19(5), 241-247.
- Song, Z., Vail, A., Sadowsky, M. J., & Schilling, J. S. (2014). Quantitative PCR for measuring biomass of decomposer fungi in planta. Fungal Ecology, 7, 39-46.
- Sukumaran, R., Rani, R. & Pandey, A. (2005). Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. Journal of Scientific & Industrial Research 64:832-844.
- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Bioresource technology, 83(1), 1-11.
- Taherzadeh, M. J., & Karimi, K. (2008). Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. International journal of molecular sciences, 9(9), 1621-1651.
- THERMO-FISHER SCIENTIFIC. 2016. Real-time PCR handbook. US. 46 p.
- Torres-De la Cruz, M., Ortiz-García, C. F., Bautista-Muñoz, C., Ramírez-Pool, J. A., Ávalos-Contreras, N., Cappello-García, S., & la Cruz-Pérez, D. (2015). Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. Revista mexicana de biodiversidad, 86(4), 947-961.
- TORRES-DE LA CRUZ, M; ORTIZ-GARCÍA, CF; BAUTISTA-MUÑOZ, C; RAMÍREZ-POOL, JA; ÁVALOS-CONTRERAS, N; CAPPELLO-GARCÍA, S; DE LA CRUZ-PÉREZ, A. 2015. Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. Revista Mexicana de Biodiversidad 86:947-961.
- Tsekova, K., Todorova, D., Dencheva, V., & Ganeva, S. (2010). Biosorption of copper (II) and cadmium (II) from aqueous solutions by free and immobilized biomass of *Aspergillus niger*. Bioresource technology, 101(6), 1727-1731.
- Vassilev, N. B., Vassileva, M. C., & Spassova, D. I. (1993). Production of gluconic acid by *Aspergillus niger* immobilized on polyurethane foam. Applied microbiology and biotechnology, 39(3), 285-288.
- Velluti, A., Marín, S., Bettucci, L., Ramos, A. J., & Sanchis, V. (2000). The effect of fungal competition on colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* and on fumonisin B1 and zearalenone formation. International journal of food microbiology, 59(1-2), 59-66.

- Verstrepen, K. J., & Klis, F. M. (2006). Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Molecular microbiology*, 60(1), 5-15.
- Villena Chávez, G. K. (2002). Producción de celulasas con biopelículas mixtas de hongos filamentosos. Tesis Mg.Sc. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima (Peru). Escuela de Post-Grado. Especialidad en Tecnología de Alimentos. 100 p.
- Villena, G. K., & Gutiérrez-Correa, M. (2006). Production of cellulase by *Aspergillus niger* biofilms developed on polyester cloth. *Letters in applied microbiology*, 43(3), 262-268.
- Villena, G. K., & Gutiérrez-Correa, M. (2012). Kinetic analysis of *Aspergillus niger* cellulase and xylanase production in biofilm and submerged fermentation. *J. Microbiol. Biotechnol. Res*, 2, 805-814.
- Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C. N., de Jesus Romero-Gomez, S., Diaz-Godinez, G., & Augur, C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 157-167.
- Wang, L., Zhang, J., Cao, Z., Wang, Y., Gao, Q., Zhang, J., & Wang, D. (2015). Inhibition of oxidative phosphorylation for enhancing citric acid production by *Aspergillus niger*. *Microbial cell factories*, 14(1), 1-12.
- Wang, Z., Lienemann, M., Qiau, M., & Linder, M. B. (2010). Mechanisms of protein adhesion on surface films of hydrophobin. *Langmuir*, 26(11), 8491-8496.
- Wang, Z. W., & Chen, S. (2009). Potential of biofilm-based biofuel production. *Applied microbiology and biotechnology*, 83(1), 1-18.
- Wargenau, A., Kampen, I., & Kwade, A. (2013). Linking aggregation of *Aspergillus niger* spores to surface electrostatics: a theoretical approach. *Biointerphases*, 8(1), 7.
- Weenink, X. O. (2008). Protein secretion in the filamentous fungus *Aspergillus niger*. Tesis Ph.D. Leiden, N.L. Leiden University. 148 p.
- Wösten, H. A., & Scholtmeijer, K. (2015). Applications of hydrophobins: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(4), 1587-1597.
- Xue, D. S., Wang, J. B., & Yao, S. J. (2015). High production of  $\beta$ -glucosidase from a marine *Aspergillus niger* immobilized on towel gourd vegetable sponges. *Chinese Chemical*

Letters, 26(8), 1011-1015.

- Yang, B., Dai, Z., Ding, S. Y., & Wyman, C. E. (2011). Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Biofuels*, 2(4), 421-449.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, 13(1), 1-11.
- Zeng, A. P., & Biebl, H. (2002). Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1, 3-propanediol production and the new trends. *Tools and Applications of Biochemical Engineering Science*, 239-259.
- Zhang, S., Xia, Y. X., Kim, B., & Keyhani, N. O. (2011). Two hydrophobins are involved in fungal spore coat rodlet layer assembly and each play distinct roles in surface interactions, development and pathogenesis in the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Molecular microbiology*, 80(3), 811-826.
- Zhang, J., Mitchell, H. D., Markillie, L. M., Gaffrey, M. J., Orr, G., & Schilling, J. (2019). Reference genes for accurate normalization of gene expression in wood-decomposing fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 123, 33-40.
- Zhao, Y., Xiang, S., Dai, X., & Yang, K. (2013). A simplified diphenylamine colorimetric method for growth quantification. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(11), 5069-5077.
- Zune, Q., Delepierre, A., Gofflot, S., Bauwens, J., Twizere, J. C., Punt, P. J., ... & Delvigne, F. (2015). A fungal biofilm reactor based on metal structured packing improves the quality of a *Gla::GFP* fusion protein produced by *Aspergillus oryzae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(15), 6241-6254.

## **VIII. ANEXOS**



### Anexo 1: Composición de medios de cultivo

- Medio de producción de celulasas (contenido por litro): 2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1.4 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0.3 g urea; 0.3 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0.3 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1 g peptona; 2 mL Tween 80; 5 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1.6 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 1.4 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 2 mg  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; y 10 g lactosa. Con un pH inicial de 5.5. Gutiérrez-Correa y Villena (2012).
- Agar Papa-Dextrosa (PDA) (contenido por litro): 200 mL de filtrado de 80 g de papa, 10 g dextrosa y 15 g agar.

### Anexo 2: Composición de buffers y soluciones usados en este trabajo.

- Buffer de extracción: Tris-HCl 200 mM, pH 8.5; NaCl 250 mM; EDTA 25 mM; SDS al 0.5% (p/v) (Raeder y Broda, 1985).
- Solución de RNAsa A: RNAsa A 10 mg/mL en Tris-HCl 10 mM (pH 7.5), NaCl 15 mM.
- *Loading dye* – GelRed: *Loading dye* 6x:GelRed 1000x, 87:13 (v/v).

### Anexo 3: Comparación estadística entre velocidad de agitación y soporte utilizado en biopelículas mixtas de *A. niger* y *T. reesei* a las 120 horas de crecimiento (n=3).

Los subconjuntos en la prueba de Duncan reflejan que, si la significancia (*p-value*) es superior a 0.05, existe evidencia estadística que relaciona los tratamientos del subconjunto, distinguiéndolos significativamente de los demás.

#### ANOVA

Peso seco (g/L)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2,325	3	,775	10,597	,004
Dentro de grupos	,585	8	,073		
Total	2,910	11			

#### Peso seco (g/L)

Duncan<sup>a</sup>

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Tela, 120 rpm	3	1,126190476190476		
Tela, 175 rpm	3	1,589047619047619	1,589047619047619	
Fibra, 120 rpm	3		1,767142857142857	
Fibra, 175 rpm	3			2,355095238095238
Sig.		,069	,443	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

**Anexo 4:** Comparación estadística del consumo de lactosa total de biopelículas mixtas de *A. niger* y *T. reesei* a las 120 horas de crecimiento (n=3).

**ANOVA**

Lactosa consumida (g/L)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	23,364	3	7,788	14,165	,001
Dentro de grupos	4,398	8	,550		
Total	27,762	11			

**Lactosa consumida (g/L)**

Duncan<sup>a</sup>

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Tela, 120 rpm	3	4,621231422505307	
Tela, 175 rpm	3	5,617692852087756	
Fibra, 175 rpm	3		7,624769992922858
Fibra, 120 rpm	3		7,989950460014154
Sig.		,138	,563

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

**Anexo 5:** Comparación estadística de la cinética de crecimiento biopelículas mixtas de *A. niger* y *T. reesei* (n=2).

**ANOVA**

Peso seco (g/L)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3,329	5	,666	53,161	,000
Dentro de grupos	,075	6	,013		
Total	3,404	11			

**Peso seco (g/L)**

Duncan<sup>a</sup>

Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
0 horas	2	-,002857142857143			
24 horas	2	,012857142857143			
48 horas	2		,288571428571428		
72 horas	2			,747142857142857	
96 horas	2			1,015000000000000	
120 horas	2				1,417142857142857
Sig.		,893	1,000	,054	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 2,000.

**Anexo 6:** Prueba de correlación de Pearson entre datos de cinéticas de crecimiento de biopelículas fúngicas mixtas de *A. niger* y *T. reesei* (n=2) medidas a partir del peso seco (g/L) y absorbancia de difenilamina.

Un valor de 1 para el índice de correlación de Pearson significa que entre ambas variables existe una correlación perfectamente lineal.

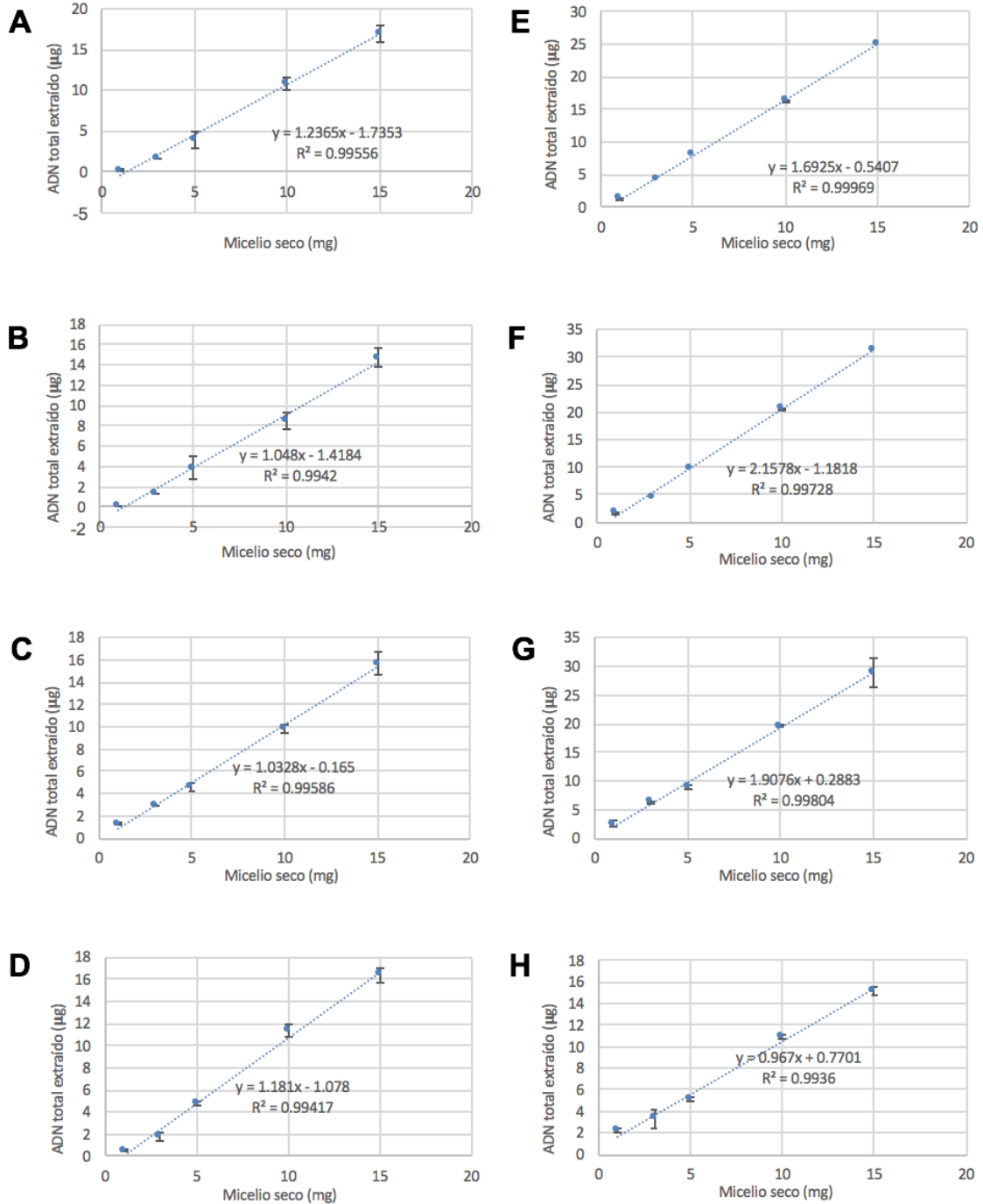
**Correlaciones**

		Peso seco (g/L)	Absorbancia (595 nm)
Peso seco (g/L)	Correlación de Pearson	1	,968**
	Sig. (bilateral)		,000
	N	12	12
Absorbancia (595 nm)	Correlación de Pearson	,968**	1
	Sig. (bilateral)	,000	
	N	12	12

\*\* . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

**Anexo 7:** Curvas estándar de extracción de ADN a partir del micelio

Curvas estándar de extracción de ADN a partir del micelio de *A. niger* colectado a las 48 (A), 72 (B), 96 (C), 120 (D) horas de crecimiento y de *T. reesei* colectado a las 48 (E), 72 (F), 96 (G), 120 (H) horas de crecimiento. Las ecuaciones de regresión lineal mostradas



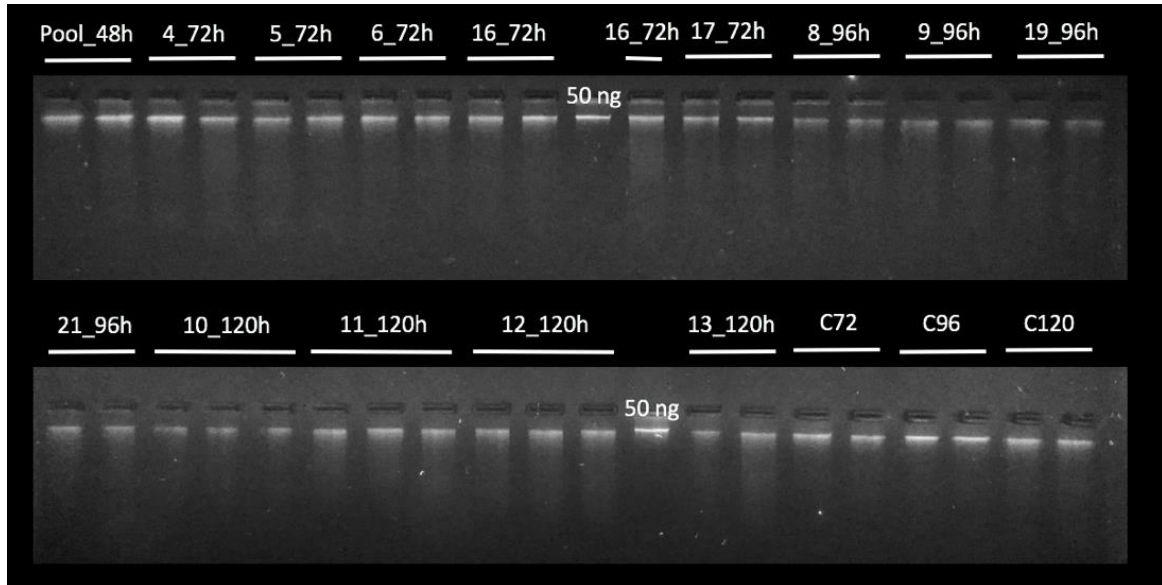
fueron usadas para el cálculo de biomasa a partir de ADN. La pendiente de cada curva equivale al rendimiento de extracción de esa muestra.

**Anexo 8:** Parámetros de pureza de las muestras de ADN genómico empleadas.

Muestra	A260/A280	A260/A230
48a	2.00	2.23
48b	1.96	2.00
4_72a	1.94	1.77
4_72b	1.95	2.07
5_72a	1.97	1.70
5_72b	1.93	1.95
6_72a	1.95	1.92
6_72b	1.92	1.85
16_72a	1.89	1.76
16_72b	1.95	1.95
16_72c	1.94	2.03
17_72a	1.89	1.66
17_72b	1.92	1.75
8_96a	1.90	1.49
8_96b	1.87	1.47
9_96a	1.92	1.30
9_96b	1.96	1.31
19_96a	1.96	1.35
19_96b	1.94	1.52
21_96a	1.92	1.53
21_96b	1.93	1.47
10_120a	1.88	1.75
10_120b	1.90	1.91
10_120c	1.90	1.93
11_120a	1.94	1.66
11_120b	1.94	1.70
11_120c	1.93	1.80
12_120a	1.93	1.71
12_120b	1.95	1.74
12_120c	1.92	1.72
13_120a	1.93	1.58
13_120b	1.94	1.37
C72a	1.93	1.75
C72b	1.90	1.69
C96a	1.98	1.91
C96b	1.95	1.92
C120a	1.98	1.97
C120b	1.95	1.97

**Anexo 9:** Gel de integridad del ADN genómico extraído a partir de las muestras de biopelículas mixtas de la cinética de crecimiento.

Se agregaron 50 nanogramos de cada muestra y también un estándar de cantidad de 50 nanogramos; algunas muestras exceden y otras no llegan a dicha cantidad. Algunas réplicas biológicas no se consideraron por presentar un ADN muy degradado.



**Anexo 10:** Prueba de correlación de Pearson entre datos de cinética de crecimiento de biopelículas fúngicas mixtas de *A. niger* y *T. reesei* (n=5) medidas a partir del peso seco real (mg) y el peso seco calculado por qPCR utilizando cebadores para el gen actina (mg).

**Correlaciones**

		Peso seco real (mg)	Peso seco calculado (mg)
Peso seco real (mg)	Correlación de Pearson	1	,971**
	Sig. (bilateral)		,000
	N	12	12
Peso seco calculado (mg)	Correlación de Pearson	,971**	1
	Sig. (bilateral)	,000	
	N	12	12

\*\* . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

**Anexo 11:** Prueba de correlación de Pearson entre datos de cinética de crecimiento de biopelículas fúngicas mixtas de *A. niger* y *T. reesei* (n=5) medidas a partir del peso seco real (mg) y el peso seco calculado por qPCR utilizando cebadores para el gen  $\beta$ -tubulina (mg).

**Correlaciones**

		Peso seco real (mg)	Peso seco calculado (mg)
Peso seco real (mg)	Correlación de Pearson	1	,946**
	Sig. (bilateral)		,000
	N	12	12
Peso seco calculado (mg)	Correlación de Pearson	,946**	1
	Sig. (bilateral)	,000	
	N	12	12

\*\* . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

**Anexo 12:** Prueba de correlación de Pearson entre datos de abundancia relativa en biopelículas mixtas de *A. niger* y *T. reesei* medidas con qPCR utilizando cebadores para el gen actina y  $\beta$ -tubulina.

**Correlaciones**

		Gen actina	Gen $\beta$ -tubulina
Gen actina	Correlación de Pearson	1	1,000**
	Sig. (bilateral)		,000
	N	8	8
Gen $\beta$ -tubulina	Correlación de Pearson	1,000**	1
	Sig. (bilateral)	,000	
	N	8	8

\*\* . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).