

*Diseño de un ensayo de  
qPCR para la detección y  
cuantificación de Bacillus  
subtilis en cultivo mixto  
con Fusarium oxysporum  
en medio con polietileno  
como única fuente de  
carbono.*

Máster en Biotecnología Industrial y  
Agroalimentaria.



**Autor** Víctor Carpena Istán

**Tutoras** María José López López

Macarena del Mar Jurado

**Departamento** Biología y Geología

**Área** Microbiología

**Universidad de Almería**

**Almería, Julio 2021**

## Agradecimientos

Me siento enormemente agradecido y feliz de poder hacer esta pequeña aportación científica en un año que ha estado cargado de infortunios. Contra todo pronóstico, este trabajo de fin de máster consiguió ver, en última instancia, la luz del día. Siendo yo un mero brazo ejecutor de La Ciencia, día tras día recorría con pesadumbre los laberintos del conocimiento, corredores que, a muchos otros habían conseguido enloquecer (y yo, no era distinto). A pesar de esto, durante todo el camino, ayudado por una inesperada pero férrea gestión de la ansiedad y del equipo humano del Departamento de Microbiología, pudimos derrotar al minotauro que, durante todo el camino, con paso marcado se acercaba.

Me gustaría agradecer a Joaquín Moreno Casco, por convertirme en lo que soy y por poder continuar su legado. Descansa en paz. También me gustaría darle las gracias a María José López, por ayudarme a darle una gran profundidad y formalidad a este trabajo y por atenderme aun cuando le resultaba materialmente imposible. También, quiero agradecer a Angie, mi pareja, por ayudarme a comprenderme y a gestionar mis vocecillas internas con ansias de sabotaje. Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a mis amigos y familia las largas horas de escucha y de consejo.

# Índice

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	1
<b>1. Introducción</b> .....	2
<b>1.1. Detección de amplicones en qPCR: SYBR green y TaqMan</b> .....	3
Colorantes de unión inespecífica a ADN: SYBR green I .....	3
Sondas marcadas con moléculas fluorescentes: sondas tipo Taqman .....	4
<b>1.2. Diseño de un ensayo de qPCR</b> .....	5
Elección del tipo de cuantificación .....	5
Elementos a optimizar en un ensayo de qPCR.....	6
Criterios de calidad en un ensayo de qPCR optimizado.....	6
<b>1.3. Aplicaciones de la técnica qPCR: ejemplos de éxito.</b> .....	7
Detección de hongos fitopatógenos y agentes de control biológico .....	7
Detección de microorganismos en muestras ambientales .....	9
<b>2. Objetivos</b> .....	10
<b>3. Material y Métodos</b> .....	11
<b>3.1. Microorganismos</b> .....	11
<b>3.2. Desarrollo experimental</b> .....	11
<b>3.3. Fase experimental 1: Método óptimo de extracción de ADN de <i>B. subtilis</i> en mezcla con <i>F. oxysporum</i>.</b> .....	11
<b>3.4. Fase experimental 2: Curva estándar para la cuantificación absoluta de mezclas de <i>B. subtilis</i> con <i>F. oxysporum</i>.</b> .....	13
<b>3.5. Fase experimental 3: Validación del ensayo qPCR en cultivo con LDPE.</b> .....	16
<b>3.6. Análisis de datos</b> .....	18
<b>4. Resultados y Discusión</b> .....	18
<b>4.1. Experimento 1: Elección del método de extracción de ADN y validación preliminar de los cebadores GyrB de <i>B. subtilis</i>.</b> .....	18
<b>4.2. Experimento 2: Diseño del ensayo qPCR y análisis de calidad del ensayo</b> .....	20
Validación de la sensibilidad del ensayo. ....	20
Validación de la especificidad de los cebadores .....	22
Impacto de las distintas proporciones de microorganismos sobre el Cq y SQ y validación de la sensibilidad del ensayo. ....	24
<b>4.3. Experimento 3: Validación de la aplicación del ensayo de qPCR.</b> .....	26
<b>5. Conclusiones</b> .....	29
<b>6. Bibliografía</b> .....	29

## Resumen

La incapacidad de las técnicas microbiológicas convencionales para obtener información acerca de microorganismos no cultivables, llevó al desarrollo de potentes técnicas moleculares como la PCR cuantitativa (qPCR) que permite obtener información molecular crucial y complementaria a la proporcionada por dichas técnicas de cultivo clásicas. El objetivo de este trabajo fue el diseño de un ensayo de qPCR capaz de detectar y cuantificar a *Bacillus subtilis* cuando se encuentra en cultivo mixto con *Fusarium oxysporum* con polietileno como única fuente de carbono. Para ello, se determinó en primer lugar el método de extracción óptimo (PowerSoil, choque térmico y Plant DNAzol) para la obtención de ADN de *B. subtilis* cuando se encuentra en combinación con *Fusarium oxysporum*. A continuación, se procedió a diseñar un ensayo qPCR para el análisis de combinaciones distintas en volumen de *B. subtilis* y *F. oxysporum*, y se determinó la calidad del ensayo mediante el análisis de la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad del mismo. Por último, se aplicó el ensayo validado para el estudio del crecimiento de *B. subtilis* en co-cultivo con *F. oxysporum* en medio con polietileno. Los resultados revelaron que, tanto la extracción con el kit comercial PowerSoil como el choque térmico son métodos idóneos para la extracción de ADN de *B. subtilis* a partir de una mezcla con *F. oxysporum*. Además, el ensayo diseñado permitió detectar y cuantificar de forma específica, reproducible y sensible a *B. subtilis*, tanto cuando se encontraba en distintas proporciones con *F. oxysporum* como en cultivo en condiciones de crecimiento restrictivas (polietileno como única fuente de carbono) y con el paso del tiempo. Por todo esto, el ensayo diseñado sienta las bases tanto técnicas como de conocimiento para el abordaje futuro de estudios relativos al seguimiento de consorcios de especies de *Bacillus* y expresión génica de actividades degradativas enzimáticas.

**Palabras clave:** SYBR Green, consorcios microbianos, monitorización, polietileno lineal de baja densidad (LLDPE), GyRB gene..

## Abstract

The inability of conventional microbiological techniques to obtain information about non-culturable microorganisms, led to the development of powerful molecular techniques such as quantitative PCR (qPCR) that allows the obtention of instrumental molecular information complementary to that provided by said classical culture techniques. The objective of this work was to design a qPCR assay capable of detecting and quantifying *Bacillus subtilis* when found in mixed culture with *Fusarium oxysporum* in a culture media containing polyethylene as the sole carbon source. To achieve this, the optimal extraction method (Power Soil, heat shock and Plant DNAzol) was first determined to obtain DNA from *B. subtilis* when found in combination with *F.oxysporum*. Moreover, a qPCR assay was designed for the analysis of different combinations in volume of *B. subtilis* and *F. oxysporum*. The quality of the assay was assessed by analyzing its sensitivity, specificity and reproducibility. Finally, the validated test was utilized to study the growth of *B. subtilis* in co-culture with *F. oxysporum* in a medium containing polyethylene as the sole carbon source. The results revealed that both extraction with commercial PowerSoil kit and heat shock are suitable methods for the extraction of *B. subtilis* DNA from a mixture with *F. oxysporum*. In addition, the designed assay allowed the specific, reproducible and sensitive detection and quantification of *B. subtilis*, both when it was found in different proportions with *F. oxysporum* and in culture under restrictive growth conditions (polyethylene as the sole carbon source) and over time. For instance, the designed assay lays the technical and knowledge basis for further research related to monitoring of consortia of *Bacillus* species and gene expression of degradative enzyme activities.

**Keywords:** SYBR Green, microbial consortia, monitoring, low density linear polyethylene (LLDPE), GyRB gene.

## 1. Introducción

La expresión "reacción en cadena de la polimerasa" (PCR) fue usada hace unos 35 años en un artículo en el cual se describe un nuevo método para la amplificación enzimática del ADN (Saiki et al., 1985). La primera amplificación de ADN mediante PCR no fue muy práctica: en los albores de la técnica se empleaban fragmentos proteicos termolábiles de tipo Klenow, con actividad polimerasa 5' → 3', procedentes de la ADN polimerasa (Klenow y Henningsen 1970). Debido a la baja temperatura de fusión, los fragmentos de tipo Klenow tenían que ser añadidos al tubo de reacción en cada ciclo nuevo después de cada etapa de desnaturalización, dificultando en gran medida la síntesis de ADN. La innovación clave que permitió el uso rutinario de la técnica fue la incorporación de la polimerasa termoestable de *Thermus aquaticus* (Saiki et al. 1988). Esta mejora, llevó al reconocimiento mundial de la PCR como la herramienta ideal para la amplificación enzimática específica de ADN *in vitro*. Ha de destacarse que el concepto general de PCR, el que incluye cebadores, ADN polimerasa, nucleótidos, cloruro magnésico y el molde de ADN, así como los ciclos que comprenden las etapas de desnaturalización, anillamiento de los cebadores y extensión, no ha sido modificado sustancialmente desde 1985. La invención de la PCR ha impulsado enormemente la investigación en varias áreas de la Biología y ha contribuido al avance del conocimiento humano en muchas esferas.

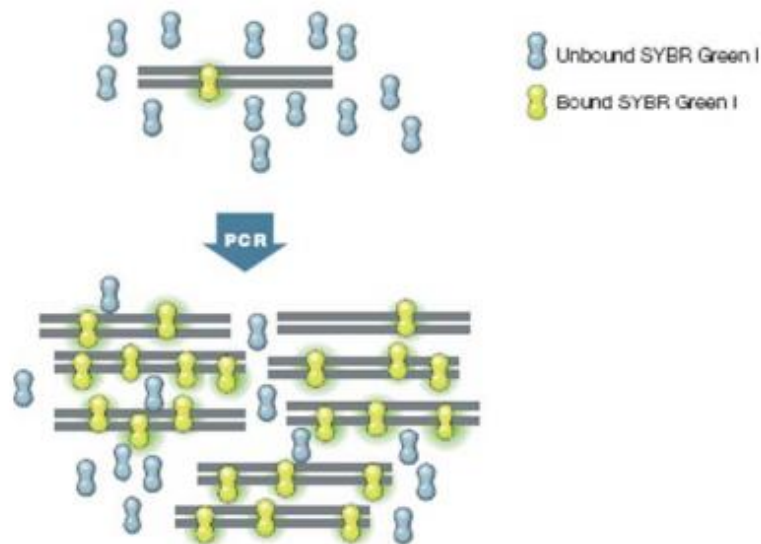
El hito más importante en la utilización de la PCR fue la introducción del concepto de monitorización de la amplificación de ADN a tiempo real por medio de la detección de la fluorescencia emitida por un fluorocromo (Holland et al., 1991; Higuchi et al., 1992). Esta técnica se denomina PCR a tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR). Cabe destacar que el uso de RT-PCR es inapropiado, ya que su abreviación está dedicada únicamente a la PCR empleando retrotranscripción (del inglés *reverse transcription - polymerase chain reaction*). En la qPCR, la fluorescencia es medida después de cada ciclo completo (desnaturalización, anillamiento y extensión), de forma que la intensidad de la fluorescencia refleja la cantidad, en un momento preciso, de amplicones (productos de PCR) en una muestra, a un tiempo determinado. En los ciclos iniciales, la fluorescencia es muy baja y cae por debajo de los límites de detección del termociclador. De esta manera, el punto en el cual la fluorescencia incrementa su intensidad por encima del nivel detectable, se corresponde de forma proporcional al número inicial de moléculas de ADN en las muestras. Este punto se denomina ciclo de cuantificación (Cq, del inglés *Cycle of Quantification*) o también denominado ciclo umbral (Ct, del inglés *Cycle Threshold*), permite la determinación de la cantidad absoluta de ADN en la muestra problema, de acuerdo a una curva de calibración estándar previamente construida con concentraciones conocidas (Yang y Rohtman, 2004; Kubista et al., 2006; Bustin et al., 2009). Este tipo de cuantificación, la cuantificación absoluta, será desarrollada posteriormente. Además, la qPCR puede proporcionar resultados semi cuantitativos sin el uso de curvas estándares, empleando controles internos como material de referencia. En comparación con la cuantificación absoluta, este tipo de cuantificación relativa no ha obtenido mucho éxito en Microbiología, ya que es incapaz de proporcionar valores cuantitativos absolutos (Bustin et al., 2009).

## 1.1. Detección de amplicones en qPCR: SYBR green y TaqMan.

Existen dos estrategias principales para la visualización, detección y cuantificación de los productos de PCR que implican, respectivamente, el empleo de colorantes de unión inespecífica al ADN, y sondas de oligonucleótidos marcadas con moléculas fluorescentes. A continuación, se describe brevemente el fundamento de las mismas, así como sus principales ventajas e inconvenientes.

### Colorantes de unión inespecífica a ADN: SYBR green I

De entre todos los colorantes disponibles para la detección de amplicones, SYBR Green es el más utilizado debido a su precio económico y a que permite una optimización inicial de los cebadores independientemente de la estrategia de detección que vaya a emplearse posteriormente (Kralik y Ricchi, 2017). Cuando SYBR green se encuentra libre en solución, emite fluorescencia a bajos niveles, mientras que, cuando se encuentra unido a ADN de doble cadena, la fluorescencia se incrementa por mil (Figura 1). A medida que se incrementa la concentración de amplicones por cada ciclo de reacción, la intensidad de la fluorescencia aumenta debido a que una mayor cantidad de moléculas de SYBR Green se encuentran unidas al ADN. Es gracias a esto, que la acumulación de los amplicones puede medirse a tiempo real (de Silva y Wittwer, 2000).



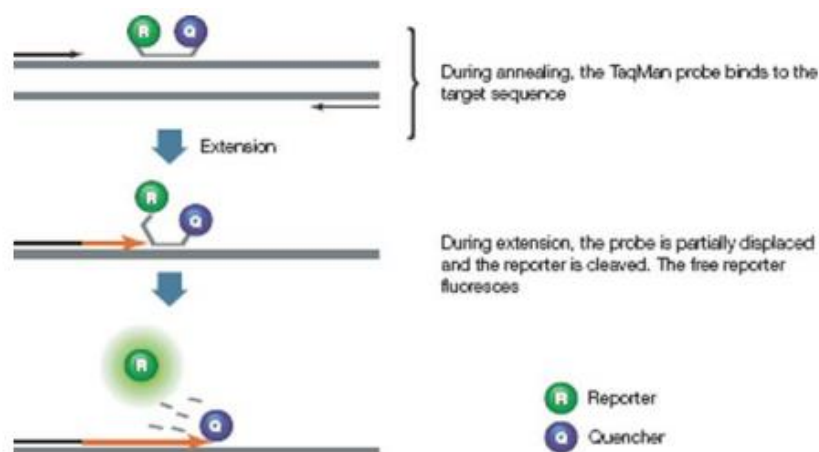
**Figura 1.** Fundamento esquemático del empleo de SYBR Green en qPCR. El colorante unido a ADN emite fluorescencia (amarillo) y no la emite cuando no está unido (azul) (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Una de las ventajas que esta tecnología ofrece, es que puede monitorizar la amplificación de cualquier ADN de doble cadena y que los costes y tiempo de preparación de la reacción se reducen considerablemente, ya que no es necesario emplear ninguna sonda específica (Tajadini et al., 2014).

La capacidad de SYBR green para unirse de forma inespecífica a ADN bicatenario puede suponer, de forma paradójica, una desventaja, ya que puede generar señales de falso positivo, debido a la formación de dímeros de cebadores o productos de amplificación inespecíficos. Por esto, es necesaria la configuración de una etapa final de fusión, tras las etapas de PCR convencional (desnaturalización, anillamiento y extensión), para comprobar que la amplificación ha ocurrido de forma específica y se ha generado únicamente el amplicón deseado (Ririe et al., 1997).

### Sondas marcadas con moléculas fluorescentes: sondas tipo Taqman

De entre los distintos tipos de sondas (sondas tipo Beacon, Scorpion...) las sondas de hidrólisis tipo Taqman son las más empleadas en la actualidad. Este tipo de sondas permite la detección del gen de interés de forma muy específica gracias al uso de una sonda complementaria a una región interna del gen a detectar. Mientras la sonda permanezca intacta, el quencher absorbe la fluorescencia emitida por el reporter; cuando los cebadores anillan, la actividad 3' exonucleasa de la ADN polimerasa, escinde la sonda, provocando la separación del quencher, del reporter, emitiendo este último la fluorescencia, que es detectada por el termociclador qPCR. De esta manera, a medida que avanza la reacción, la fluorescencia acumulada es únicamente debida a la amplificación del gen que se pretende detectar, gracias a una mayor especificidad aportada por la sonda (Reynisson et al., 2006) (Figura 2). En comparación con SYBR Green, la estrategia de detección por sondas aporta una mayor especificidad, pero es una tecnología más cara que requiere de una mayor validación y optimización.



**Figura 2.** Fundamento esquemático del empleo de TaqMan en qPCR (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Una de las ventajas que proporciona esta técnica, es que las sondas pueden ser etiquetadas con colorantes fluorescentes distintos y distinguibles entre sí, lo que permite una amplificación múltiple de distintas secuencias en un solo tubo de reacción. Además, se elimina por completo el post procesamiento de los productos de PCR, no se requiere ni electroforesis como en PCR convencional ni análisis de curva de fusión como

en SYBR Green, reduciendo el gasto en materiales y el tiempo de trabajo (Tajadini et al., 2014). A pesar de esto, esta tecnología necesita de la síntesis de sondas diferentes y complementarias a las secuencias que se desean detectar, haciendo que el ensayo sea muy costoso. En general, los diseños de ensayos de qPCR empleando sondas Taqman, suponen un mayor reto que el diseño de ensayos empleando SYBR green, dado que implican tanto el diseño de primers como de la sonda Taqman que va a anillar en una región interna del gen que se desea detectar (Zhou et al., 2005).

## 1.2. Diseño de un ensayo de qPCR

Actualmente existen tres maneras de incorporar un ensayo de qPCR al panel de métodos de un laboratorio, en función de la cantidad de información que se posea del organismo a analizar. En caso de que se posea una gran cantidad de información del organismo, es muy probable que exista un ensayo prediseñado en forma de kit comercial. Si se posee un nivel de conocimiento medio del organismo, es posible que se pueda reproducir un ensayo encontrado en bibliografía. Por último, si no se posee apenas información del organismo, es necesario diseñar un ensayo propio desde etapas más fundamentales (Nitsche, 2007).

A continuación, se exponen brevemente los elementos a tener en cuenta para el diseño de un ensayo de qPCR.

### Elección del tipo de cuantificación

La elección del tipo de cuantificación es la primera decisión a tomar para abordar un ensayo de qPCR. Generalmente, se pueden llevar a cabo dos estrategias distintas: cuantificación absoluta y relativa.

La **cuantificación absoluta** relaciona los niveles de fluorescencia obtenidos en la reacción de PCR al número de copias iniciales del gen a cuantificar mediante el empleo de una curva de calibración. Las curvas de calibración son altamente reproducibles y permiten la generación de datos muy específicos y sensibles. Sin embargo, dicho modelo de curva de calibración externa tiene que ser validado concienzudamente, ya que la precisión de la cuantificación absoluta en qPCR depende en su totalidad de la precisión de la recta estándar. El diseño de la recta, su preparación, determinación de la concentración exacta, así como de su estabilidad tras un largo periodo de almacenamiento, constituyen aspectos a tener en cuenta y su validación es un proceso arduo que puede llegar a ser problemático (Pfaffl et al., 2001). El rango dinámico (margen de número de moléculas de ADN que la qPCR es capaz de detectar y, además, devolver señal de fluorescencia) de la curva de calibración puede ser del orden comprendido entre  $10$  y  $10^{10}$  moléculas de ADN iniciales, dependiendo del material de partida empleado (Pfaffl et al., 2002). Para la preparación de la recta de calibración en cuantificación absoluta se pueden emplear concentraciones conocidas de moléculas de ADN estándar, ADN plasmídico recombinante (recDNA), ADN genómico, producto de RT-PCR y oligonucleótidos de gran tamaño sintetizados comercialmente (Bustin, 2000). La estabilidad y reproducibilidad en qPCR depende del tipo de estándar usado y de las buenas prácticas de laboratorio (uso de puntas de pipeta con filtro, mantener una buena



higiene de la cabina de flujo, reducir los ciclos de congelación-descongelación del estándar...). Los ADNs recombinante clonado y genómico son muy estables y generan curvas estándar altamente reproducibles, incluso después de un largo período de almacenamiento en comparación con ADN recién sintetizado (Adams, 2006).

**La cuantificación relativa** determina los cambios en los niveles de ARN mensajero de un gen y lo expresa de forma relativa a los niveles de expresión de un control interno de ARN. Este gen de referencia es, a menudo, un gen constitutivo y puede ser co-amplificado en el mismo tubo en un ensayo multiplex o en un tubo individual. Por ello, la cuantificación relativa no requiere de estándares con concentraciones conocidas, y el material de referencia puede ser cualquier transcrito, siempre y cuando su secuencia sea conocida (Wittwer et al., 2001). La cuantificación relativa está basada en los niveles de expresión de un gen diana versus un gen de referencia y es adecuada para determinar cambios fisiológicos en los niveles de expresión de un gen. Para calcular los niveles de expresión de un gen diana en relación a un gen de referencia adecuado es necesario establecer una serie de modelos matemáticos. Existen principalmente dos modelos matemáticos para determinar el ratio de expresión relativo: el modelo de cuantificación relativa con corrección de la eficiencia y el modelo de cuantificación relativa sin corrección de la eficiencia (Livak y Schmittgen, 2001).

#### Elementos a optimizar en un ensayo de qPCR

La optimización de un ensayo de qPCR comprende prácticamente los mismos pasos que se han de seguir para la optimización de una reacción de PCR convencional. Los principales elementos a optimizar están relacionados con las características de los productos de PCR (amplicones), con el diseño de los cebadores y con la temperatura de hibridación de los cebadores (Kubista et al., 2006). Los amplicones han de ser fragmentos cortos, idealmente con una longitud de entre 60 y 200 pares de bases; han de diseñarse de manera que no formen estructuras secundarias y, además, que no contengan repeticiones de más de cuatro bases iguales. En cuanto a los cebadores, han de poseer una longitud comprendida entre 18 y 30 bases, un contenido en guanina-citosina de entre el 50% y el 60%, que no posean secuencias con complementariedad intra e intermolecular y, por último, que posean una temperatura de fusión de entre 52 °C y 65 °C (Rychlik, 1995). El tercer y último parámetro clave a optimizar, es la temperatura de hibridación de los cebadores. La optimización de este parámetro se lleva a cabo por medio de la configuración de un gradiente de temperatura alrededor de la temperatura de fusión de los cebadores. La temperatura que devuelva un ciclo umbral (Ct) más bajo, es la que se selecciona para ese ensayo.

#### Criterios de calidad en un ensayo de qPCR optimizado.

Un ensayo de qPCR optimizado es crucial a la hora de obtener una cuantificación precisa y reproducible de las muestras, debido a que la detección y cuantificación en tiempo real está basada en la relación entre el valor del ciclo umbral (Ct) obtenido durante la amplificación y el material genético de partida (Bustin y Nolan, 2004). De esta manera, los principales criterios de calidad son:

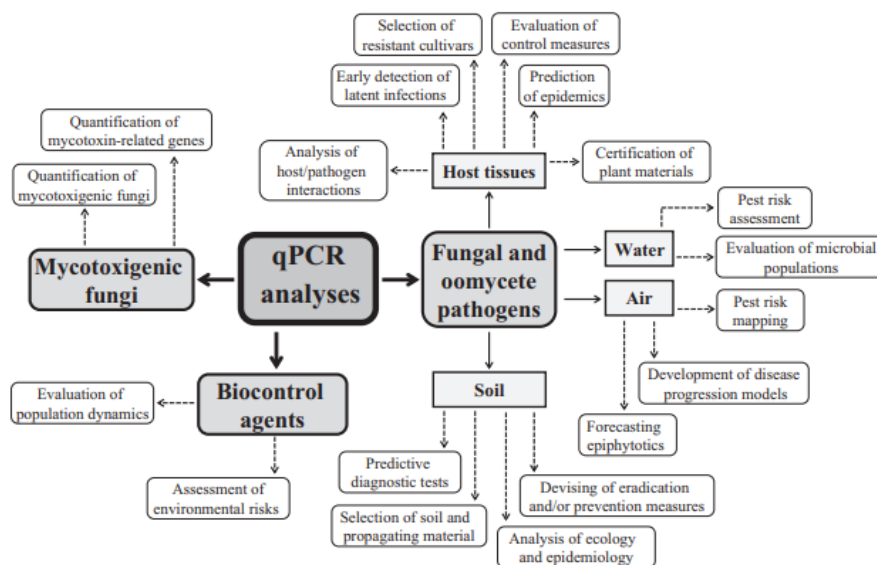
- Linealidad de la curva estándar. ( $R^2 > 0,980$  o  $r > |-0,990$ )
- Determinación de la eficiencia del ensayo: análisis de la pendiente de la recta de calibrado. La eficiencia de amplificación ha de estar comprendida entre 90 y 105%.
- Determinación de la precisión del ensayo. Cálculo de la varianza interensayo e intraensayo. Consistencia entre las réplicas.

### 1.3. Aplicaciones de la técnica qPCR: ejemplos de éxito.

Los campos de aplicación de la qPCR son múltiples. A continuación, se describen algunos ejemplos de aplicaciones de la técnica en las áreas de Fitopatología y Microbiología Ambiental.

#### Detección de hongos fitopatógenos y agentes de control biológico

En el campo de la fitopatología, las principales aplicaciones de la técnica que pueden destacarse son la detección y cuantificación de oomicetos y hongos patógenos en suelo, agua y aire; la mejora en la trazabilidad de agentes de control biológico; y la cuantificación de genes relacionados con la producción de micotoxinas y de hongos micotoxigénicos (Figura 3).



**Figura 3.** Representación esquemática de las aplicaciones de la qPCR en el campo de la fitopatología (Sanzani et al., 2013).

La qPCR es ampliamente utilizada para detectar y cuantificar patógenos dentro de diferentes tejidos vegetales. El alto grado de sensibilidad de la técnica permite la cuantificación de niveles muy bajos del patógeno, que pueden corresponder con la cantidad presente al inicio de la infección, durante el estado de latencia o en infecciones asintomáticas. De esta forma, contribuye al avance en el conocimiento del ciclo infeccioso del microorganismo, así como de las interacciones patógeno-huésped (Demontis et al., 2007; Covarelli et al., 2012). Además, permite detectar de forma muy temprana la presencia del patógeno, aun no habiendo aparecido síntomas visibles de infección. Así,

por ejemplo, Debode et al. (2009) detectaron y cuantificaron el ADN de *Colleotrichum acutatum* de forma precisa en plantas de avena 2 h después de su inoculación, mientras que los primeros síntomas de la enfermedad aparecieron a las 96 h. Por otro lado, *Phytophthora cryptogea* fue detectado mediante qPCR cuatro días antes que por PCR convencional y 6 días antes de la aparición de síntomas en plantas de gerbera (Li et al., 2009); mientras que *Phytophthora infestans* fue detectado en muestras de hoja de planta de patata tomadas entre un período de 24 y 156 h después de la inoculación, mostrando una fuerte relación entre la concentración de ADN y el tiempo desde la inoculación (Lees et al., 2012).

El aislamiento de hongos y oomicetos patógenos de suelos infectados, especialmente aquellos que contienen baja carga microbiana, es extremadamente dificultoso a no ser que se cuente con técnicas especiales. La dificultad se debe principalmente a relaciones de antagonismo e interferencia con microbiota secundaria, incluyendo actinomicetos, bacterias y hongos de rápido crecimiento, así como propágulos de lenta emergencia (clamidosporas o esclerocios). La incapacidad de detectar patógenos transmitidos por el suelo puede resultar en un diagnóstico incorrecto, dando lugar a la toma de decisiones equívocas a la hora de implementar medidas de control (Bilodeau et al., 2012). Diversas investigaciones han demostrado el potencial que posee la qPCR en la detección de patógenos de suelo en comparación con otras técnicas alternativas. Lievens et al. (2006) demostró que la qPCR es capaz de detectar y cuantificar patógenos importantes del tomate (*Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Verticillium spp.* y *Pythium ultimum*) en un amplio rango de concentraciones. Por su parte, Jimenez-Fernandez et al. (2010) diseñaron un ensayo de qPCR capaz de cuantificar *Fusarium oxysporum* en suelos y raíces infectadas con el hongo, y permitió discriminar dicho hongo de otras especies de *Fusarium* que no pueden ser distinguidas por técnicas de cultivo convencional.

Otra aplicación de la qPCR en fitopatología es la mejora de la trazabilidad de agentes de control biológico (BCAs, por sus siglas en inglés biological control agents), así como, su cuantificación una vez han sido aplicados en el suelo. Independientemente del entorno de aplicación (rizosfera, filosfera, carposfera, etc...), los BCAs han de ser monitorizados para evaluar la dinámica poblacional, que puede ser influenciada por muchos factores, incluyendo el tiempo y el método de aplicación, la habilidad para colonizar el entorno, la supervivencia durante periodos desfavorables, la tolerancia a cambios en el clima, etc. Además, un prerequisite que se ha de cumplir para la comercialización de BCAs, es la determinación de los riesgos ambientales asociados a su dispersión, ya que, se debe evitar cualquier efecto no deseado sobre organismos y/o sobre el entorno (Gullino et al., 1995). Los métodos convencionales de detección son generalmente inapropiados para la detección de BCA, ya que no permiten la identificación de cepas específicas. Por esto, es necesario emplear técnicas como la qPCR que permiten la detección precisa y la monitorización de la dinámica poblacional de los BCAs con el paso del tiempo. Un ejemplo de uso de la qPCR para alcanzar dicho objetivo, está descrito en el trabajo de Schena et al. (2002), en el que una cepa de *Aureobasidium pullulans* efectiva contra la podredumbre postcosecha en frutas y vegetales, fue monitorizada y cuantificada mediante qPCR en la carposfera de uvas y cerezas. Dicho estudio demostró que las

poblaciones de BCAs se incrementaron poco después de su inoculación y que estas permanecían en altos niveles a lo largo de la temporada de crecimiento de dichos frutos.

La qPCR también puede emplearse para detectar y cuantificar hongos productores de micotoxinas presentes en alimentos o en cultivos (Hamada et al., 2012; Sanzani et al. 2012). Debido a la necesidad de determinar la capacidad toxigénica de determinadas cepas fúngicas, se han diseñado diversos ensayos de qPCR para llevar a cabo el genotipado de micotoxinas, que pueden directamente cuantificar genes responsables de la síntesis de las mismas tanto desde medio de cultivo como desde tejidos vegetales (Kulik et al., 2011).

### Detección de microorganismos en muestras ambientales

La detección y cuantificación de microorganismos a partir de muestras ambientales es otra de las aplicaciones relevantes de la qPCR en el ámbito de la Microbiología. Esta técnica ha sido empleada tanto para la detección de patógenos humanos, en el campo de la microbiología clínica, como para la detección de patógenos en el ámbito del control de la calidad alimentaria, pasando por la monitorización de microorganismos indicadores de cambios ambientales, así como para la detección de genes de resistencia a antibióticos, entre otros.

Park et al. (2011) desarrollaron un ensayo de multiplex PCR capaz de detectar en muestras de aguas de escorrentía, de forma simultánea y en 4h, a las bacterias patógenas, *Salmonella*, *Campylobacter*, y *E. coli O157:H7*, frente a las 48 h, como mínimo requeridas para su detección por técnicas de cultivo tradicional. Debido a que la cuantificación mediante medios de cultivo no es posible con dicho tipo de muestras, el ensayo de qRT-PCR diseñado por estos investigadores permite una cuantificación rápida y precisa de los patógenos.

La qPCR también ha sido y es ampliamente utilizada en la detección de patógenos humanos. Un ejemplo representativo de esta aplicación, es el ensayo diseñado por Geetha et al. (2020) quienes idearon un ensayo capaz de diagnosticar, de forma rápida y precisa, bacterias patógenas aisladas a partir de muestras procedentes de personas que padecían infecciones oculares. Este ensayo supone una gran mejora en la rapidez de detección de dichos patógenos en comparación con la detección por técnicas de cultivo convencionales. La rápida detección y diferenciación de los patógenos se consiguió gracias al uso de SYBR green en combinación con el análisis de la curva de disociación, así como de los distintos picos de fusión generados.

Otro uso similar de esta tecnología, pero llevado al campo del monitoreo ambiental, es el que describen Fu et al. (2020). Estos investigadores, desarrollaron un ensayo de qPCR basado en SYBR Green capaz de detectar de forma rápida el gen tet(X), involucrado en la degradación de tigeciclina, uno de los principales componentes de antibióticos de amplio espectro, así como de sus variantes tet(X1) a partir de muestras de cultivos de bacterias, heces, compost, aguas residuales, suelo y lodo derivado de la producción de biogás.

La qPCR también juega un papel crucial en la detección de patógenos alimentarios, así como en el control de brotes provocados por alimentos contaminados. Zhong et al. (2020) diseñaron un ensayo de qPCR multiplex que permitió la detección simultánea, rápida y económica de 15 genes de patógenos entéricos aislados a partir de muestras de heces de pacientes infectados.

## 2. Objetivos

Estudios previos demostraron la capacidad de un consorcio microbiano constituido por *B.subtilis* y *F.oxysporum* para crecer a expensas de polietileno como única fuente de carbono (Cabrera, 2021). En dicho estudio se emplearon técnicas microbiológicas convencionales para el seguimiento de los miembros del consorcio mediante recuentos de colonias. Aunque este método resulta efectivo, ya que permite cuantificar células viables y, por tanto, probablemente activas, se planteó la posibilidad de implementar la técnica qPCR como alternativa rápida, sensible y específica para monitorizar los niveles poblacionales de los miembros del consorcio durante su cultivo en condiciones restrictivas y así obtener información valiosa y complementaria a la obtenida mediante técnicas de cultivo convencional. A pesar de que *F. oxysporum* había demostrado capacidad para crecer en consorcio con *B. subtilis*, en presencia de polietileno, los resultados de detección, cuantificación y monitorización del crecimiento para este microorganismo no pudieron obtenerse debido a la incapacidad de extraer una cantidad óptima de ADN del mismo y de amplificarlo. Los resultados obtenidos permitieron dilucidar posibles causas, que serán objeto de trabajos futuros, en los cuales se espera obtener más información de este microorganismo. De cualquier manera, los métodos y resultados que se describen en el presente trabajo, sientan una base fundamental tanto técnica como de conocimiento para el abordaje de futuros ensayos. Estos ensayos, comprenden desde la monitorización de futuros microorganismos candidatos para la degradación de contaminantes, hasta la detección y cuantificación de los niveles de expresión de genes involucrados en actividades degradativas, pasando por la detección y cuantificación de agentes de control biológico y promotores del crecimiento vegetal.

El objetivo principal de este trabajo fue diseñar un ensayo de qPCR capaz de detectar y cuantificar la dinámica de *B.subtilis* en cultivo mixto con el hongo *F.oxysporum* en medio con polietileno como única fuente de carbono.

Para la consecución de dicho objetivo principal, se plantearon los siguientes objetivos específicos.

1. Determinación del método de extracción óptimo para la obtención de ADN a partir de una mezcla de *B.subtilis* y *F.oxysporum*.
2. Determinación de la calidad del ensayo de qPCR por medio del análisis de la consistencia entre réplicas, eficiencia, sensibilidad y especificidad.
3. Validación del ensayo diseñado empleando muestras extraídas del cultivo de ambos microorganismos en presencia de polietileno.

## 3. Material y Métodos

### 3.1. Microorganismos

Las cepas microbianas empleadas en este trabajo fueron *B.subtilis* RBM2 y *F.oxysporum* RHM1. Ambas cepas forman parte de la colección de microorganismos del grupo de investigación BIO-175 de la Universidad de Almería, y se conservaron a 4 °C en placas o tubos inclinados de APHA o PDA (Panreac) para la bacteria y el hongo, respectivamente. Para el mantenimiento a largo plazo, se criogenizaron a -80 °C en crioviales (Deltalab®).

### 3.2. Desarrollo experimental

Los experimentos realizados en este trabajo se dividieron en tres fases experimentales secuenciales, enlazadas a su vez cada una de ellas con los objetivos específicos previamente descritos. Las fases experimentales son las siguientes:

- Fase experimental 1 (Objetivo 1): Determinación del método óptimo de extracción de ADN de *B. subtilis* en mezcla con *F. oxysporum*, y validación preliminar de los cebadores seleccionados para la cuantificación de *B. subtilis* mediante PCR convencional.
- Fase experimental 2 (Objetivo 2): Construcción de la curva estándar para la cuantificación absoluta de *B. subtilis* en mezclas con *F. oxysporum*, estudio de la sensibilidad, especificidad y eficiencia de la reacción de qPCR y comprobación de la consistencia entre las réplicas intraensayo, interensayo, así como los límites de detección del mismo.
- Fase experimental 3 (Objetivo 3). Validación de la aplicación del ensayo qPCR diseñado en Fase experimental 2 para la cuantificación de *B. subtilis* en cultivo con *F. oxysporum* en medio con polietileno lineal de baja densidad (LLDPE) como única fuente de carbono.

### 3.3. Fase experimental 1: Método óptimo de extracción de ADN de *B. subtilis* en mezcla con *F. oxysporum*.

Esta fase experimental, cuyo desarrollo se ilustra en la Figura 4, tuvo como objetivo determinar qué método de extracción es el apropiado para la obtención de ADN de la bacteria a partir de una mezcla con el hongo. Para ello, se prepararon dos suspensiones puras en solución salina estéril (NaCl 0,9%, p/v) de *B. subtilis* y *F. oxysporum* en tubos eppendorf de 1,5 ml, empleando biomasa de cultivos frescos de cada microorganismo preincubados en placas Petri con APHA (Panreac) durante 24 h, en el caso de *B. subtilis*, y en PDA (Panreac) durante 5 días en el caso de *F. oxysporum*. La turbidez de dichas suspensiones se ajustó a un valor de 0,5 en la escala McFarland (equivalente a una concentración celular de  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml y a una absorbancia de 0,065 a 660 nm), mediante incorporación de células o esporas de cada microorganismo. A continuación, se combinó 1 ml de la suspensión estandarizada de cada microorganismo en un tubo

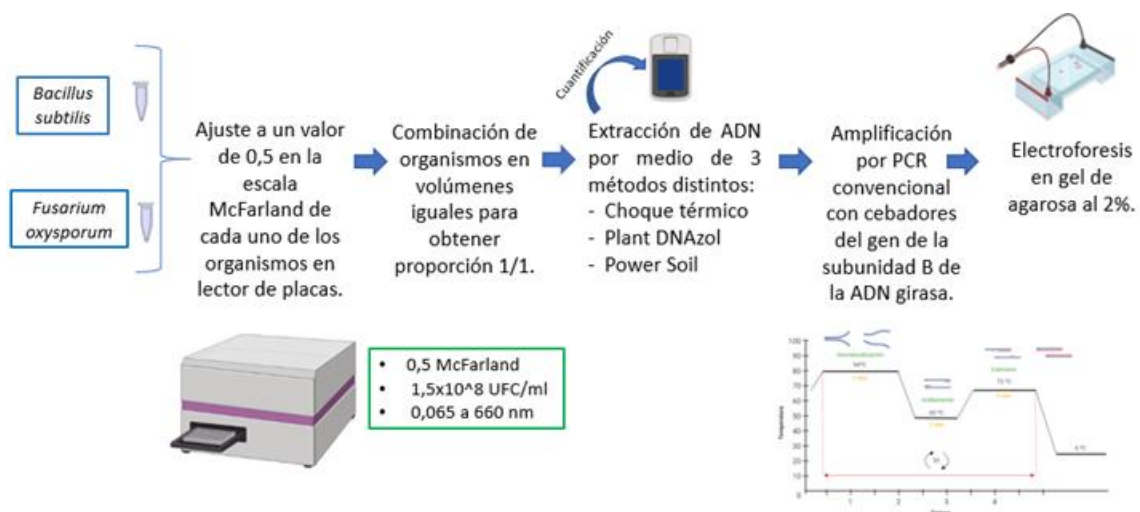
ependorf de 2 ml, que se empleó para llevar a cabo la extracción de ADN mediante tres procedimientos:

- Kit de extracción PowerSoil® DNA Isolation Kit (Qiagen) según especificaciones del fabricante.
- Choque térmico: La suspensión celular se sometió a 100 °C durante 5 min en bloque térmico, seguido de inmersión en hielo durante 5 min.
- PlantDNAzol (Qiagen) según especificaciones del fabricante.

Tras realizar las extracciones, se cuantificó el ADN empleando fluorímetro Qubit™ (Invitrogen) y, a continuación, se amplificó el gen de la subunidad B de la ADN girasa de *B. subtilis*, con objeto de determinar el método de extracción más eficaz, a la vez que se comprobaba el funcionamiento de los cebadores de forma preliminar a su validación final en qPCR, en la siguiente fase. Para la amplificación se emplearon los cebadores específicos del gen mencionado (Tabla 1). La mezcla de la reacción para la amplificación contenía aproximadamente 2 µL de la muestra problema, que se ajustó dependiendo de la concentración de ADN (25 y 30 ng/µL para una correcta amplificación), 10µL de mix PCR BioMix Red (Bioline), 0,4 µL de cada cebador y agua estéril hasta 20 µL. La amplificación se realizó en un termociclador MyCycler (Biorad, California, EE. UU) en las siguientes condiciones: 95 °C/2 min, 40 ciclos de 95 °C/30 seg, 60 °C / 45 seg , 72 °C/45 seg y un ciclo de elongación final de 72 °C/2 min. Los productos de PCR se cargaron en gel de agarosa al 2% añadiendo 0,002% de GelRed (Biotium) y fueron sometidos a electroforesis durante 1 h 20 min a 120 mA empleando un marcador DNA ladder (50-10.000pb DirectLoad™ Wide Range DNA Marker, Sigma-Aldrich,USA).

**Tabla 1.** Cebadores del gen de la subunidad B de la ADN girasa de *B. subtilis* (Xie et al., 2020).

Gyr B Forward	5'-CGGTCGTAACGCACTATC-3'
Gyr B Reverse	5'-AGGGTCCGGGACAAAATGTGTGCG-3'



**Figura 4.** Flujo de trabajo ejecutado en la fase experimental 1: Extracción de ADN de la bacteria en mezcla con el hongo.

### 3.4. Fase experimental 2: Curva estándar para la cuantificación absoluta de mezclas de *B. subtilis* con *F. oxysporum*.

El desarrollo experimental de esta fase se esquematiza en la Figura 5. Para determinar la especificidad, sensibilidad y eficiencia de la qPCR en la cuantificación de *B. subtilis* en mezcla con *F. oxysporum* se elaboraron combinaciones de ambos microorganismos con distintas concentraciones celulares de cada uno. Para ello, se prepararon tubos falcon con 5 ml de suspensiones celulares de cada microorganismo ajustadas al 0,5 en la escala McFarland (suspensión estándar), de acuerdo con el protocolo descrito en la Fase experimental 1. A continuación, se combinaron diferentes volúmenes de cada suspensión estandarizada, tal y como se refleja en la Tabla 2. Cabe destacar que, dado que se conoce la concentración celular teórica (UFC/mL) de las suspensiones estandarizadas a partir de las que se prepararon las distintas mezclas, es posible determinar la concentración celular de cada uno de los microorganismos en la mezcla.

**Tabla 2.** Volumen de la suspensión estándar de cada microorganismo en la mezcla.

Código de la mezcla	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
P2	0,25 ml	1,75 ml
P3	0,5 ml	1,5 ml
P1	1 ml	1 ml
P5	1,5 ml	0,5 ml
P4	1,75 ml	0,25 ml

A partir de cada una de las mezclas se extrajo el ADN mediante choque térmico empleando el protocolo descrito en Fase 1 y se cuantificó la concentración de ADN de cada combinación mediante Qubit.

Para la preparación de la **recta de calibración o estándar** a emplear en la qPCR se tomó el ADN de P1 por contener a los dos microorganismos en igual proporción. Los valores de concentración de ADN de dicha muestra, obtenidos en el fluorímetro Qubit, se emplearon para calcular el número de copias teórico del gen de la subunidad B de la ADN girasa de *B. subtilis* y ajustar las diluciones de la muestra a efectuar para que estuvieran dentro de los límites de detección de la técnica qPCR. Para ello se empleó la siguiente fórmula (Scott Adams, 2006):

Fórmula [1]

$$\text{Moléculas de ADN} = \frac{\text{Masa (gramos)} \times \text{Número de Avogadro}}{\text{Peso molecular medio de una base} \times \text{Longitud del ADN molde}}$$

Donde:



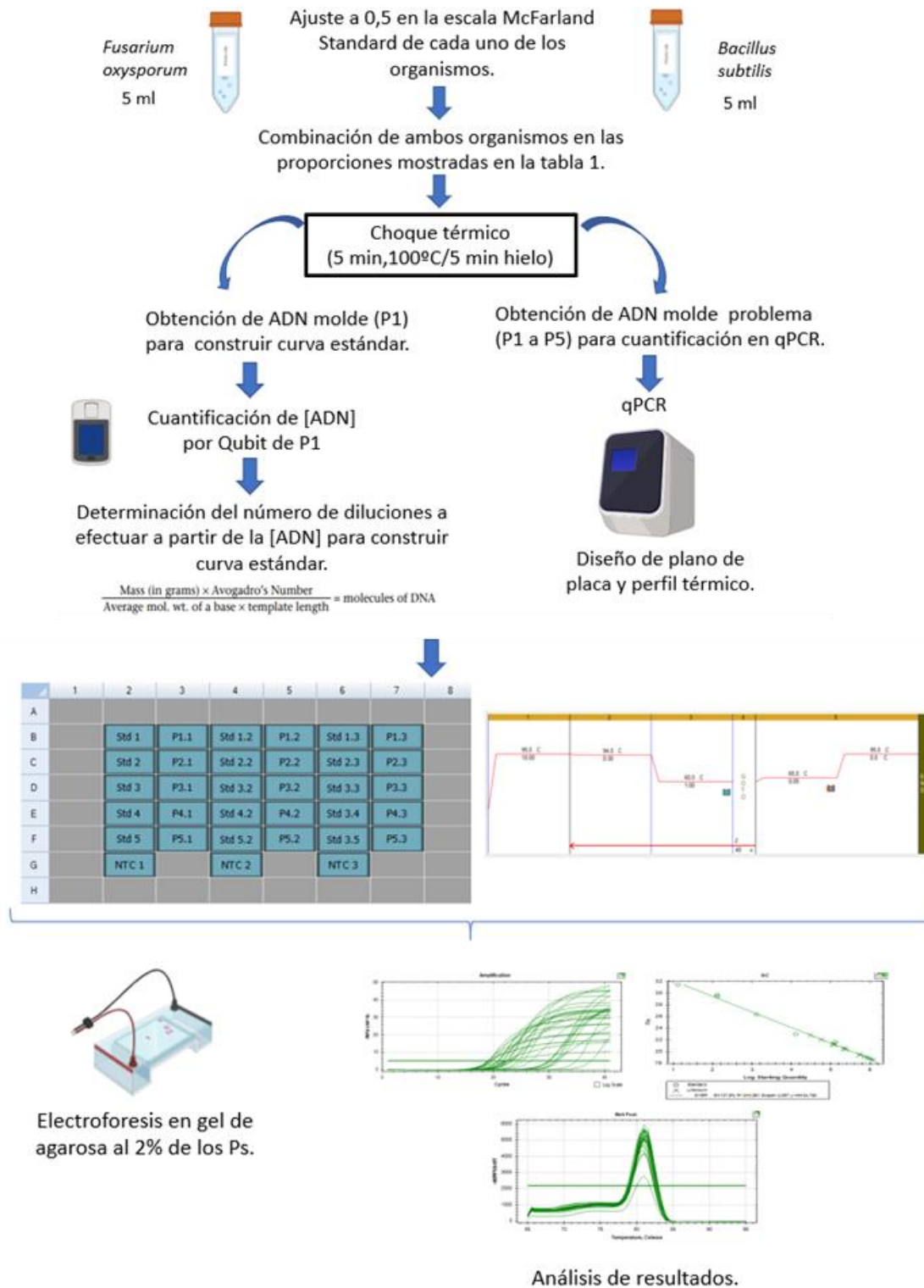
- La masa es aquella obtenida a partir de la concentración de productos de PCR (amplicones), mientras que la concentración de ADN que se tiene es la debida a la mezcla del genoma completo de dos organismos distintos. Por ello, este valor se obtuvo multiplicando la concentración que devuelve el Qubit por 1  $\mu\text{L}$ , por 158 bp (tamaño de amplicón en el caso de *B. subtilis*), por  $10^{-9}$  (conversión de  $\mu\text{L}$  a gramos) y, todo ello, dividido entre  $4,2 \times 10^6$  bp (tamaño del genoma completo de *B. subtilis*).
- El Peso molecular medio de una base para molde de ADN bicatenario es de 660 g/mol/base.
- La longitud del ADN molde es de 158 bp.

De esta manera, tras efectuar los cálculos, el número de moléculas de ADN en la mezcla P1 era del orden de  $10^5$ , por ello, con 5 diluciones decimales seriadas bastó para construir la curva estándar. A continuación, se transfirió 1  $\mu\text{L}$  de la muestra P1 a un tubo de PCR que contenía 9  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas Nuclease-Free Water (Qiagen®) llevándose a cabo las diluciones decimales seriadas en un total de cinco tubos de PCR con mismo volumen de agua libre de nucleasa hasta alcanzar la dilución -5. La mezcla para la amplificación estuvo constituida por 0,4  $\mu\text{L}$  de cebador de síntesis GyrB Forward y 0,4  $\mu\text{L}$  cebador GyrB Reverse (Xie et al., 2020), 10  $\mu\text{L}$  de mix KiCqStart SYBR Green qPCR ReadyMix (Sigma-Aldrich,USA) y 7,2  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas. Finalmente, se incorporó a cada uno de los máster mix, 2  $\mu\text{L}$  de ADN procedente de cada una de las diluciones decimales para construir la curva estándar. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador CFX96 Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-rad Laboratories, Inc.)

Las distintas diluciones de ADN de P1 para la curva estándar (Std) y las extracciones de ADN de las mezclas (P1 a P5) fueron amplificadas mediante qPCR empleando las mezclas de reacción citadas anteriormente. Los ensayos de qPCR se ejecutaron por triplicado. Dentro de cada ensayo, cada muestra problema, así como los estándares, también se analizaron por triplicado (Bustin y Nolan, 2004), tal y como se especifica en la imagen del plano de placa de la Figura 5. También se incluyeron NTCs (no template control) como controles negativos de la reacción, constituidos por 0,4  $\mu\text{L}$  de cebador de síntesis GyrB Forward y 0,4  $\mu\text{L}$  cebador GyrB Reverse, 10  $\mu\text{L}$  de mix KiCqStart SYBR Green qPCR ReadyMix (Sigma-Aldrich,USA) y 9,2  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas.

El perfil térmico empleado para la amplificación por qPCR del gen GyrB fue: 10 min a 95 °C (desnaturalización inicial), seguido de 40 ciclos de dos etapas, la primera 30 seg a 94 °C (desnaturalización) y la segunda 1 min a 60 °C (anillamiento y extensión), y una etapa final de desnaturalización con un incremento de 0,5 °C cada segundo, desde 65 °C a 95 °C (Xie et al., 2020) (Figura 5). Se determinó la temperatura de fusión teórica del amplicón mediante el software Umelt Quartz (<https://www.dna-utah.org/umelt/quartz/um.php>), especificando una termodinámica de tipo Unified SL (Santa Lucía, 1998) como modelo termodinámico y una concentración de iones magnesio de 0,15 mM.

Los amplicones de qPCR fueron cargados en gel de agarosa al 2% y sometidos a electroforesis durante 1h 20 min a 120 mA, para corroborar la especificidad de la reacción y apoyar los resultados del análisis del pico de fusión, obtenidos en la qPCR.



**Figura 5.** Flujo de trabajo ejecutado en la fase experimental 2: construcción de la curva estándar y cuantificación de la bacteria en distintas mezclas con el hongo (P1 a P5).

### 3.5. Fase experimental 3: Validación del ensayo qPCR en cultivo con LDPE.

Para validar la eficacia y aplicación del ensayo de qPCR en el seguimiento del crecimiento de *B. subtilis* en co-cultivo con *F. oxysporum* en medio con plástico como única fuente de carbono, se preparó un cultivo de ambos microorganismos en dicho medio y se recogieron muestras a distintos tiempos de incubación para la cuantificación de *B. subtilis* mediante qPCR. El protocolo global se muestra en la Figura 6 y se detalla a continuación.

Se prepararon tres matraces réplicas de 250 ml que contenían 25 mL de medio de cultivo constituido por medio mínimo de sales de Janshekar (Janshekar et al.1982) y 1% (p/v) del polímero plástico LLDPE (polietileno lineal de baja densidad) en polvo esterilizado con etanol al 70% (Cabrera et al., 2021) (Tablas 3 y 4). Estos matraces fueron inoculados con 175 µl de una suspensión de *B. subtilis* y 175 µl de *F. oxysporum*, previamente ajustadas a 0,5 en la escala McFarland, tal y como se especifica en la fase 1.

**Tabla 3.** Composición del medio cultivo.

Componente	Cantidad
LLDPE en polvo	1 %
Solución sales A	100 ml
Solución sales B	100 ml
Solución de sales C	100 ml
Agua destilada	700 ml

**Tabla 4.** Medio mínimo de sales (Janshekar et al., 1982)

	Componente	g/L
Solución A	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	16
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5
Solución B	NaCl	2,5
	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	5,8
	CaCl <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O	0,13
Solución C	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	12,5
	(NH <sub>4</sub> ) NO <sub>3</sub>	10
	FeCl <sub>3</sub> 6 H <sub>2</sub> O	0,025

Los medios inoculados se incubaron durante 28 días en agitación (110 rpm) y 30 °C. Cada cuatro días se tomaron muestras (1 mL) para la cuantificación de *B. subtilis* mediante qPCR y recuento en placa de los dos microorganismos. La monitorización de la pureza del consorcio reveló que desde el inicio se produjo una contaminación en una de las tres replicas (Replica 1), por ello, todos los resultados se referirán a las réplicas 2 y 3. La cuantificación de *B. subtilis* en cada muestra mediante qPCR se realizó empleando el protocolo detallado en la fase experimental 2 (extracción ADN, curva estándar, mezcla de reacción y condiciones de qPCR). El recuento de la bacteria y el hongo se llevó a cabo mediante dilución decimal seriada de la muestra y siembra en placa en medios específicos para cada microorganismo, APHA (Panreac) para *B. subtilis* y Rosa de Bengala (RB) (Panreac) para *F. oxysporum*. Brevemente, en cada muestreo se recogió 1 mL del cultivo y, a partir de él se realizaron diluciones decimales seriadas en solución salina estéril (NaCl, 0,9% p/v), que se sembraron en los medios de cultivo indicados, repartiendo el volumen inoculado (0,1 mL) en toda la superficie de la placa con la ayuda de bolitas de vidrio estériles, que se retiraron antes de llevar las placas a incubación. Las placas se incubaron a 30 °C durante 2 días (bacteria) y 4 días (hongo). Tras el período de incubación se contaron las colonias en aquellas placas que presentaron un número significativo y contable. En la rama izquierda de la Figura 6 se muestra la secuencia de trabajo para obtener las UFC/ml, mientras que, en la rama derecha, se esquematizan la correspondiente al análisis molecular. Se incluyeron dos réplicas de curvas estándar, así como dos réplicas de controles negativos NTCs.

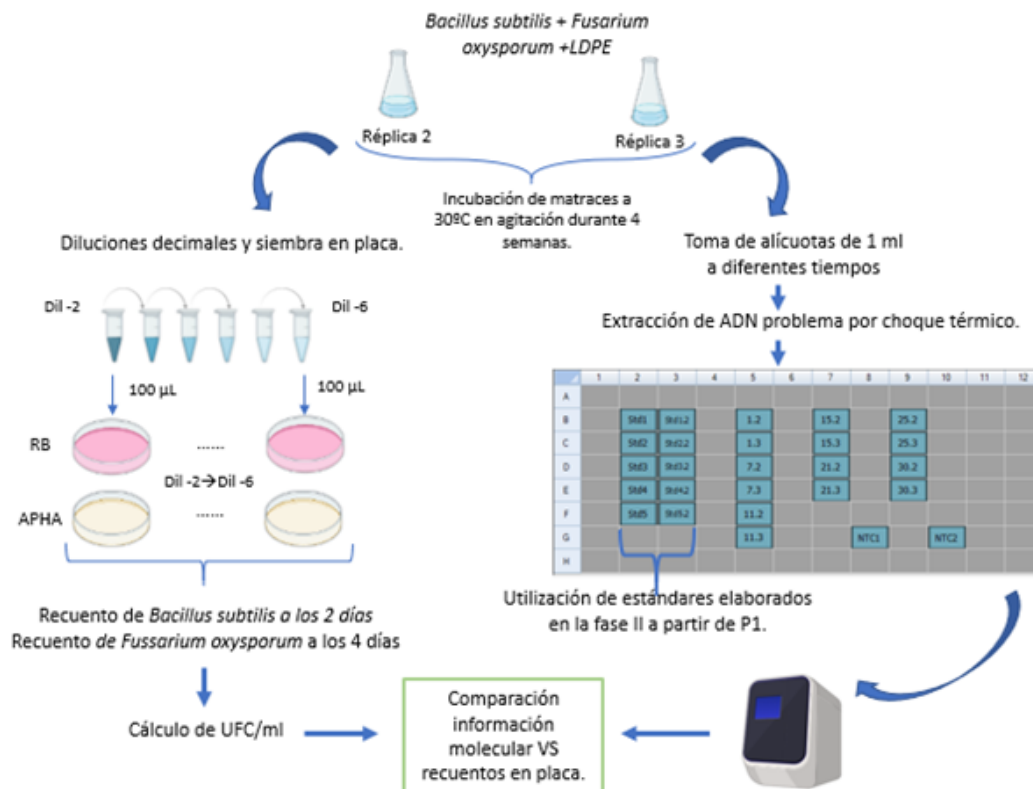


Figura 6. Flujo de trabajo seguido en la fase experimental 3.

### 3.6. Análisis de datos

Para el análisis de los datos obtenidos por medio de qPCR en las fases experimentales 2 y 3, se empleó el software "Bio-rad CFX Manager". En primer lugar, se procedió al análisis de las curvas de amplificación, para posteriormente, revisar y ajustar tanto el umbral como la línea base. A continuación, se comprobó que no ocurrió amplificación real en los NTCs y se procedió a la exclusión de los puntos de la recta de calibración que perjudicaban a la calidad de la recta. Finalmente, se procedió al análisis de las muestras por medio de los ciclos umbrales (Ct) y cantidades iniciales de ADN estimadas (SQ). Los Ct y SQ de las muestras obtenidos en la fase experimental 2, se exportaron a una hoja de cálculo Excel, donde se calculó la media, desviación estándar y porcentaje de coeficiente de variación, parámetros necesarios para la determinación de la reproducibilidad de los ensayos (varianza intra e interensayo).

Para la determinación de la temperatura de fusión teórica (Tm) del gen de la subunidad B de la ADN girasa, se obtuvo previamente la secuencia del amplicón, así como su contenido en guanina-citosina (%GC). Para ello, se empleó el software libre PCR In-silico (San Millán et al., 2013) (Bikandi, San Millán y Rementeria 2004), en el que se seleccionó a *B. subtilis*, y se introdujeron los cebadores de síntesis para el gen GyrB, especificando cero mismatches excepto uno solo en un nucleótido al final del extremo 3'. Una vez obtenido el amplicón (158 bp y un %GC de 49) se copió la secuencia en la interfaz del software uMelt Quartz™ (Dwight et al., 2011) donde se fijó una termodinámica de tipo Unified SL (Santa Lucía, 1998) y una concentración de iones magnesio libres de 0,15 mM.

## 4. Resultados y Discusión

A continuación, se describen y discuten los resultados obtenidos en cada una de las tres fases experimentales.

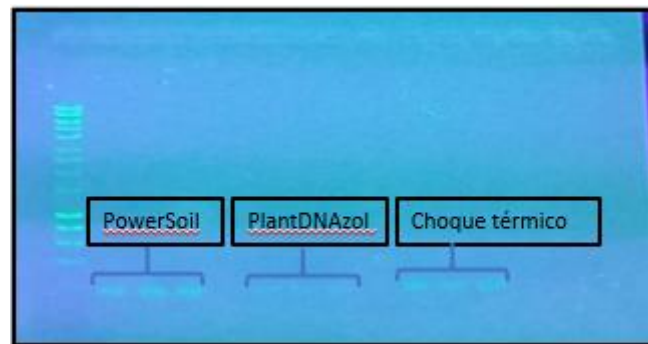
### 4.1. Experimento 1: Elección del método de extracción de ADN y validación preliminar de los cebadores GyrB de *B. subtilis*.

La finalidad última de este trabajo era optimizar un método para la cuantificación por qPCR de una bacteria (*B. subtilis*) en co-cultivo con un hongo (*F. oxysporum*). Inicialmente, tal y como se argumentó en la justificación de este trabajo, la idea era optimizar el método para la cuantificación de los dos miembros del consorcio. Por esta razón, se planteó la necesidad de disponer de un método que permitiese extraer eficazmente el ADN de ambos microorganismos a partir de un cultivo líquido, de modo que la misma muestra extraída fuese, a su vez, susceptible posteriormente de cuantificación en la reacción qPCR específica para la bacteria y el hongo. Por esta razón se ensayaron tres métodos de extracción de ADN a partir de una suspensión estandarizada de los dos microorganismos, incluyendo: PowerSoil, que constituye uno de los métodos más exitosos para la extracción de ADN microbiano a partir de muestras ambientales (suelo, compost, etc.) (Iturbe-Espinoza et al., 2021); choque térmico, que tiene probada eficacia en la extracción del ADN de la cepa de *B. subtilis* empleada en este trabajo (Jurado et al., 2015); y PlantDNAzol, kit adecuado para la extracción del ADN

del hongo empleado en este trabajo (López-González et al., 2015). La concentración de ADN obtenida mediante la extracción con cada uno de los métodos se muestra en la Tabla 5 y el gel de agarosa tras la amplificación del gen Gyr B de *Bacillus* a partir de cada uno de dichos extractos por PCR convencional se muestra en la Figura 7.

**Tabla 5.** Concentraciones de ADN ( $\mu\text{g/mL}$ ) de los extractos obtenidos a partir de una mezcla 1/1 de *B. subtilis* y *F. oxysporum* mediante tres métodos de extracción.

	PowerSoil	Choque térmico	Plant DNAzol
<b>Réplica 1</b>	1,17	0,85	0,23
<b>Réplica 2</b>	1,66	0,66	0,35
<b>Réplica 3</b>	1,42	0,72	0,12
<b>Media<math>\pm</math>Desviación estándar</b>	1,41 $\pm$ 0,25	0,74 $\pm$ 0,09	0,23 $\pm$ 0,11



**Figura 7.** Amplicones del gen de la subunidad B de la girasa de *B. subtilis*, visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Todos los productos de PCR aparecieron a la altura esperada (158 pb, aproximadamente).

Los datos de extracción fueron consistentes con la intensidad de banda mostrada en el gel de agarosa: cuanto mayor era la concentración de ADN de partida, mayor fue la intensidad de banda en el gel después de la reacción de amplificación. De esta manera, PowerSoil™ fue el método de extracción que mayor intensidad de banda devolvió. A pesar de estos resultados, finalmente se eligió el choque térmico como método de extracción preferente, debido al menor tiempo que se requiere para llevarlo a cabo, por ser más económico que PowerSoil™, y porque finalmente el microorganismo objeto de estudio fue exclusivamente la bacteria. Por otro lado, en esta fase se confirmó de forma preliminar la especificidad de la reacción empleando los cebadores diseñados por Xie et al. (2020) para diferenciar especies de *B. subtilis*, dado que los cebadores consiguieron devolver una banda única, aun partiendo de una concentración de ADN muy baja. Los cebadores elegidos generan un amplicón de 158 bp de tamaño, característica indispensable en el desarrollo de un ensayo de qPCR. Otra característica importante, es la capacidad de los cebadores de detectar de forma específica el gen diana (Canfora et al., 2016). Además, estos cebadores poseen la capacidad de diferenciar a *B.subtilis* de otros miembros del género *Bacillus*. Este hecho es fundamental en futuros estudios en los que se pretenda monitorizar el crecimiento de *B.subtilis* en consorcio con otros miembros del mismo género.

## 4.2. Experimento 2: Diseño del ensayo qPCR y análisis de calidad del ensayo.

Con objeto de diseñar un ensayo para el estudio de *B. subtilis* en la fase III, se procedió a validar la especificidad de los cebadores y la sensibilidad analítica del ensayo por medio de la siguiente secuencia de acciones (Figura 5): ajuste de los dos microorganismos citados a un valor de 0,5 en escala McFarland, combinación de los dos microorganismos en 5 proporciones distintas, uso de la proporción P1 (1/1) para la construcción de la curva estándar, análisis de todas las proporciones (P1 a P5) mediante qPCR y análisis de los resultados.

De esta manera, tras ejecutar los ensayos por triplicado a través de la secuencia de acciones antes mencionada, se procedió a analizar los distintos parámetros indicadores de la calidad de los ensayos, incluyendo su sensibilidad, especificidad y eficiencia. Como modelo a seguir para el análisis de los resultados se consideraron los trabajos de Geetha et al. (2020) y Scott Adams (2006).

### Validación de la sensibilidad del ensayo.

Una vez se comprobó que en las curvas de amplificación (no presentadas en este trabajo) no aparecía ningún artefacto, se procedió al análisis de las curvas estándar de cada réplica. Tanto la línea base como el umbral empleado fueron autocalculados por el software Bio-rad CFX Manager™, seleccionando para la línea base, límites superiores dinámicos. Es conveniente recalcar, antes de analizar cada parámetro para cada réplica, que la eficiencia de amplificación se encuentra íntimamente relacionada con la pendiente de la recta por medio de la siguiente ecuación Pfaffl (2004):

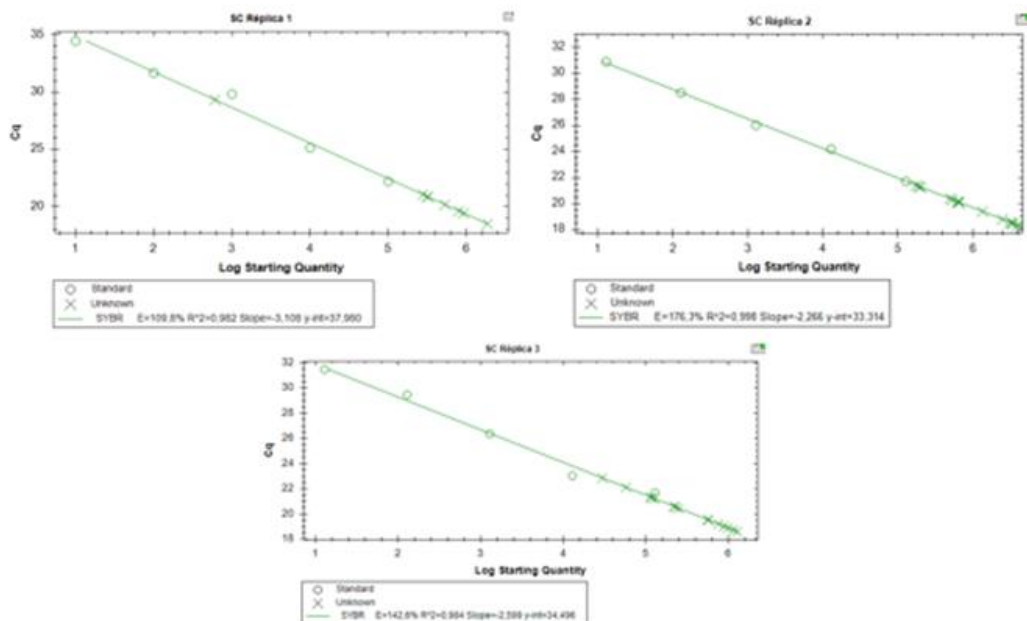
Fórmula [2]

$$Eficiencia = 10^{\left(\frac{1}{Pendiente}\right)} - 1$$

De acuerdo con ello, la eficiencia de amplificación disminuye conforme la pendiente aumenta (se vuelve más negativa). Esto quiere decir que la sensibilidad del ensayo se ve perjudicada, ya que se requiere un mayor número de copias iniciales para alcanzar el límite de detección o, dicho de otra manera, un mayor número de ciclos son necesarios para detectar el mismo número de moléculas de ADN molde.

En la Figura 8 se muestran las curvas estándar generadas para cada una de las tres réplicas del ensayo de qPCR, así como los parámetros indicativos de la eficiencia de cada una de ellas. En las réplicas 2 y 3, la eficiencia de amplificación estuvo muy por encima (142% y 176%) del rango óptimo (90-110%). La eficiencia, tal y como se indicó al comienzo de esta sección, está relacionada con el valor de la pendiente de la recta. Las réplicas 2 y 3 presentaron una pendiente más positiva en comparación con la réplica 1, lo que explica sus elevados valores de eficiencia de amplificación. Esto es indicativo de que, probablemente, un número menor de copias del gen ha sido necesario para alcanzar el límite de detección. Una de las causas de la elevada eficiencia de amplificación puede ser la inhibición de la ADN polimerasa, ocasionada a su vez por presencia de elementos derivados de la etapa de purificación del ADN (etanol, fenol, SDS...). En este caso, dado que no se llevó a cabo purificación de ADN previo a la

amplificación por qPCR, la causa de la elevada eficiencia de amplificación ha de ser la contaminación cruzada (poca higiene de la cabina de flujo, puntas de pipeta contaminadas o sin filtro...), la formación de dímeros de cebadores (opción poco probable, como se verá en el siguiente apartado de análisis de la especificidad de la reacción), o de activadores de la ADN polimerasa como causa más probable. Otro parámetro relacionado de forma indirecta con la eficiencia y la pendiente es el y-intercept (punto de corte con el eje Y). Como se puede observar, la réplica 1 mostró un y-intercept que se encontraba ligeramente por encima del rango óptimo de 33-37 de ciclo umbral. El valor de este parámetro es obtenido a partir del punto en el que la curva estándar corta al eje "Y", y es una medida de la sensibilidad del ensayo y de cómo de precisa ha sido la cuantificación del ADN molde. Por ello, podemos afirmar que en la réplica 1 la cuantificación efectuada no es 100% precisa. Respecto a las réplicas 2 y 3, mostraron un y-intercept dentro de rango, indicando que la sensibilidad de las réplicas era buena y que la cantidad de ADN molde de partida se había determinado correctamente.



	Eficiencia de amplificación	R2	Pendiente	Y- intercept (Ct)	Ct NTC
<b>Réplica 1</b>	109,8%	0,982	-3,108	37,98	36,15
<b>Réplica 2</b>	176,3%	0,984	-2,266	33,314	34,55
<b>Réplica 3</b>	142,6%	0,984	-2,599	34,496	35,9
Valores de un ensayo idóneo	90%-110%	1	-3,32	33-37	35<x>40

**Figura 8.** Curvas estándar de la réplica 1 (arriba a la izquierda), 2 (arriba a la derecha) y 3 (abajo centro) del ensayo diseñado en la fase 2; y tabla comparativa entre las distintas réplicas del ensayo de los parámetros clave en el análisis de la calidad del ensayo de qPCR (inferior centro): Eficiencia de amplificación calculada a partir de la pendiente según fórmula [2]; R2-coeficiente de regresión; Ct-ciclo umbral; NTC-control sin molde (no template control); Valores idóneos según Pfaffl (2004). Los valores fuera de rango idóneo se resaltan coloreados.



A pesar de lo antes citado, en todas las réplicas el coeficiente de regresión R<sup>2</sup> se acercó a 1, lo que indica que los datos experimentales se ajustaron bien a la línea teórica, y que la precisión del pipeteo y de las diluciones fueron buenas. Además, en todas las réplicas los ciclos umbrales de los NTC se encontraron dentro del rango óptimo y, de media, dichos ciclos umbrales se encontraban 10 puntos por encima del ciclo umbral más alto obtenido en las muestras problema. Esto corrobora que la amplificación ocurrió de forma específica y no se amplificó ningún contaminante. En el siguiente apartado, se describen los datos que apoyan este aspecto.

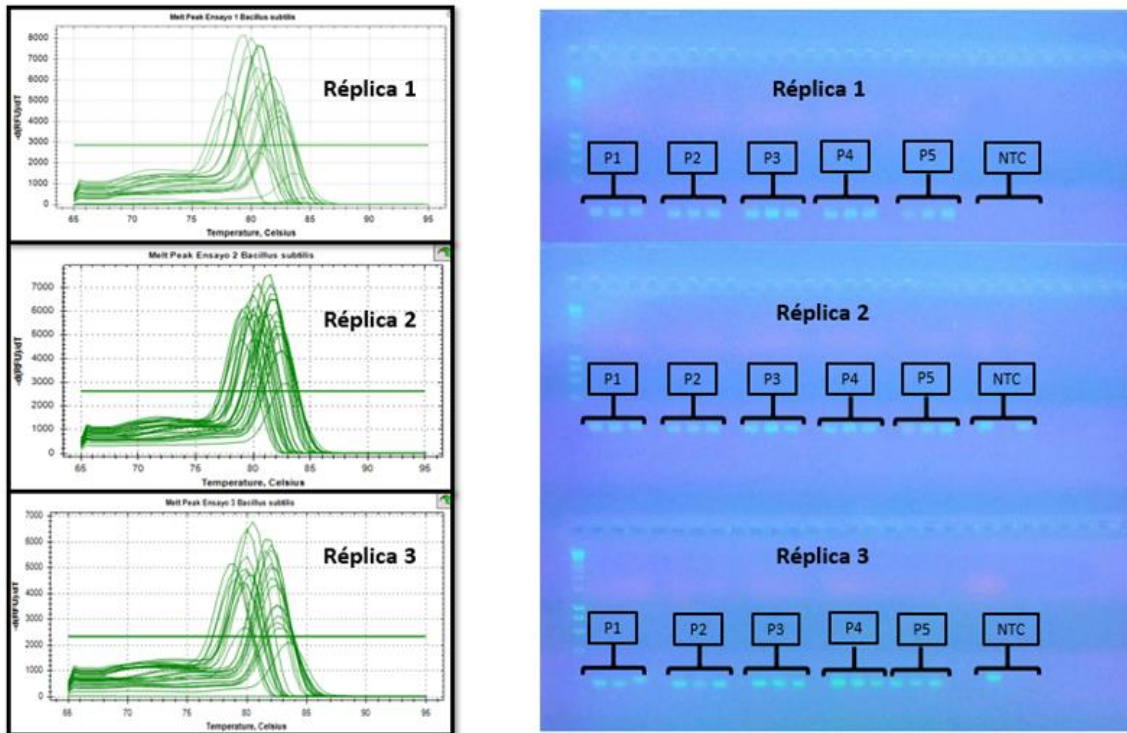
Por otro lado, cabe destacar que la fórmula empleada en la determinación del número teórico de moléculas de ADN para la construcción de la curva estándar (Fórmula [1]), permitió obtener, con un error de sólo 10 copias del gen, el número de moléculas presentes en la solución madre (P1) utilizada para la elaboración de la curva estándar. De forma que, en la dilución -5 de las curvas estándar, se consiguió detectar un número de tan sólo 10 copias del gen. Estos resultados están en consonancia con la información derivada del análisis del y-intercept.

En suma, y tomando en consideración lo antes citado, podemos afirmar que el ensayo diseñado posee una alta sensibilidad y es capaz de detectar y cuantificar con precisión el gen de la subunidad B de *B. subtilis* en presencia de material genético de *F. oxysporum*.

#### Validación de la especificidad de los cebadores

Para validar la especificidad de los cebadores se estudiaron los picos de fusión de los amplicones generados tras la etapa final de desnaturalización en qPCR de cada una de las réplicas del ensayo de la fase experimental 2 (Figura 9, sección izquierda). Como se puede apreciar, en todas las réplicas se obtuvo un conjunto de tres picos con temperaturas de fusión que variaron desde 78 °C hasta 83 °C, lo que es indicativo de que la reacción de amplificación no había ocurrido de forma específica, y que se habían generado varios amplicones. A priori, una posible explicación para la aparición de más de un pico de fusión es, que a medida que las hebras del ADN de doble cadena se disocian, las regiones del amplicón más estables (con un mayor contenido G/C) no se separan de forma inmediata. Estas regiones estables mantienen la configuración de ADN de doble cadena hasta que se alcanza una temperatura tal que provoca la disociación de las hebras (Bruzzzone et al., 2013). Para confirmar la presencia o ausencia de más de un amplicón, se determinó, por medio del software uMelt Quartz™ (Dwight et al., 2011) la temperatura de fusión teórica del amplicón, que resultó ser de 81,5 °C. Este valor teórico difirió en 0,5 °C de la temperatura de fusión obtenida tras el análisis de reproducibilidad intraensayo e interensayo de la temperatura de fusión (Figura 10). Para corroborar de forma definitiva la especificidad del ensayo, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa de los amplicones de qPCR de cada muestra problema. Como se puede observar en las imágenes de estos geles en la Figura 9, en todas las réplicas se obtuvo una sola banda a la altura esperada (158 pb) para cada una de las muestras problema, confirmando que la amplificación había ocurrido de forma específica. Cabe destacar la aparición de dos de los NTCs en la réplica 2 del ensayo y de un NTC en la réplica tres del ensayo (Figura 9) . Como se comentaba en el apartado de

análisis de la sensibilidad, los ciclos umbrales promedio de las réplicas de los NTCs se encontraban dentro del rango óptimo ( $35 > Ct < 40$ ), indicando que la amplificación ocurrió de forma específica. Por ello, el origen de la aparición de estos NTCs ha de ser con una alta probabilidad, contaminación cruzada procedente de errores de pipeteo o de arrastre de material genético de un pocillo a otro a la hora de cargar las muestras en la placa de qPCR.



**Figura 9.** Izquierda: picos de fusión de cada réplica del ensayo. En estas gráficas se representa la caída de fluorescencia  $-d(RFU)/dt$  con el paso del tiempo respecto a la temperatura en °C. Derecha: Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones de qPCR de cada muestra problema (P1 a P5) de cada réplica.

Generalmente, un ensayo se considera aceptable cuando posee un coeficiente de variación (%CV) inferior a 10% para la variabilidad intraensayo e inferior a 15% para la variabilidad interensayo. Los coeficientes de variación intra e interensayo obtenidos para la temperatura de fusión fueron muy inferiores a los límites citados, confirmando que el ensayo es altamente reproducible (Tabla 6).

**Tabla 6.** Media, desviación estándar (SD) y coeficiente de variación (%CV) intraensayo e interensayo de la temperatura de fusión (Tm) del amplicón.

<b>Variación intra ensayo (Tm)</b>			
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>CV(%)</b>
<b>Réplica 1</b>	82,03	0,47	0,57
<b>Réplica 2</b>	81,87	0,43	0,53
<b>Réplica 3</b>	82,03	0,61	0,75

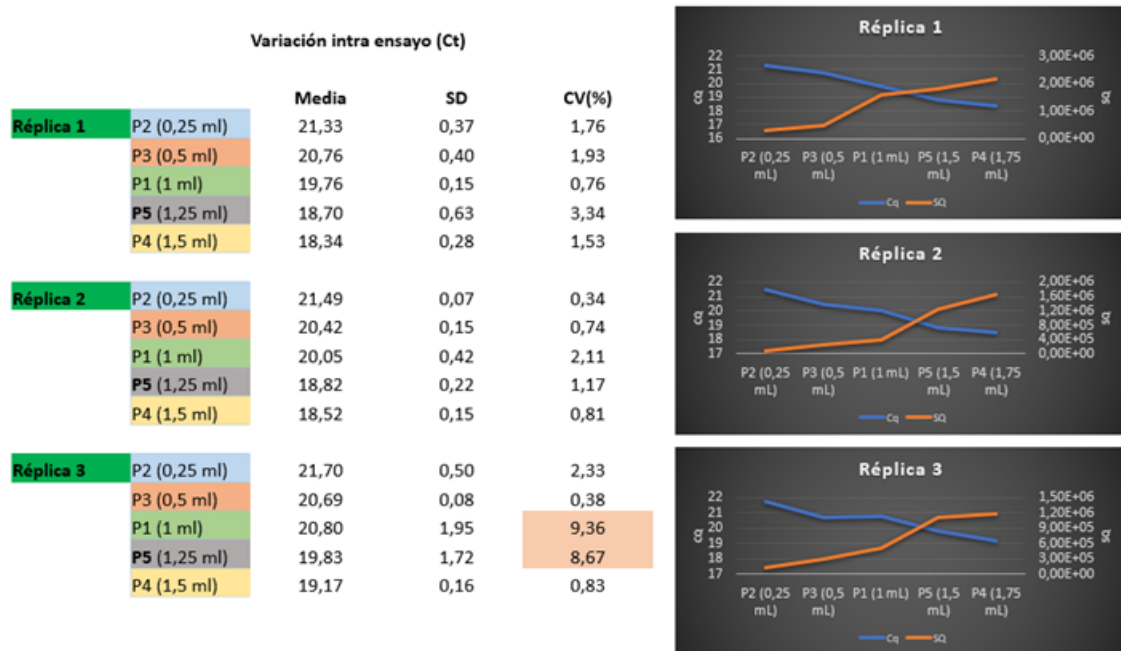
  

<b>Variación inter ensayo (Tm)</b>			
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>CV(%)</b>
<b>Media</b>	81,98	0,50	0,61

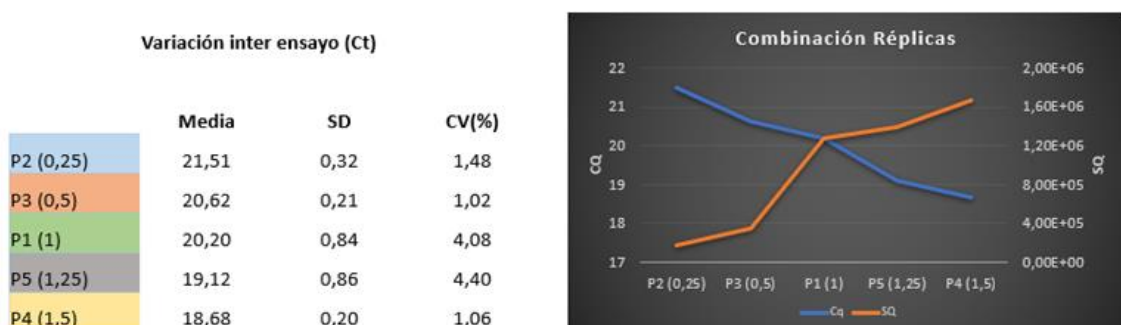
### Impacto de las distintas proporciones de microorganismos sobre el Cq y SQ y validación de la sensibilidad del ensayo.

En la sección derecha de la Figura 10 se representa una comparación entre las distintas cantidades (en volumen) de *B. subtilis* en las mezclas problema (eje X) con respecto al ciclo de cuantificación (Cq) (eje Y primario) y con respecto a la cantidad de copias iniciales del gen cuantificadas (SQ, starting quantity) (eje Y secundario) previo a amplificación de cada una de las réplicas del ensayo. Como se puede observar, conforme se incrementa la cantidad (volumen de solución) de *B. subtilis*, se aprecia un aumento en la cantidad de número de copias del gen cuantificadas, confirmando la tendencia esperada. De igual forma, a medida que aumenta la cantidad de *B. subtilis*, decrece el ciclo umbral al que se detecta fluorescencia. Esto es debido a que, cuanto menor sea el volumen de *B. subtilis*, menor será la carga microbiana y, con ello, más baja será la concentración de ADN presente: de esta manera, en la P4 (proporción con mayor cantidad de ADN teórica) se detecta la emisión de fluorescencia en el ciclo 19 aproximadamente, mientras que en la P2 (proporción con menor volumen de *B. subtilis*) la emisión de fluorescencia se detecta en el ciclo 22, aproximadamente. Cuanto menor sea la cantidad de ADN molde, la fluorescencia se detectará a ciclos más tardíos y viceversa. Otra tendencia que merece la pena destacar, es el incremento de la cantidad de ADN estimada en consonancia con el aumento del volumen de *B. subtilis*: cuanto mayor sea el volumen de *Bacillus*, mayor será la cantidad teórica de ADN y mayor será el número de copias del gen estimadas. Por último, se puede observar también la relación entre el ciclo umbral y el SQ: existe una clara correlación negativa entre ambos parámetros ya que, conforme aumenta la cantidad de ADN estimada, la fluorescencia se va detectando progresivamente en ciclos más tempranos. De esta manera, una cantidad de ADN de  $1,65 \times 10^5$ , devuelve un Cq de 18,52; mientras que una cantidad de ADN de  $10 \times 10^4$  devuelve un Cq de 21,5. Además, en la Figura 11 sección derecha se representa una combinación de las representaciones gráficas mostradas en la Figura 10, confirmando la tendencia descrita anteriormente.

Por otro lado, en la sección izquierda de las Figuras 10 y 11, se representa la variabilidad intraensayo y la variabilidad interensayo, respectivamente. Como se comentaba en el apartado de validación de la especificidad de los cebadores, los valores de %CV aceptables han de encontrarse por debajo de 10%, para la variabilidad intraensayo y de 15% para la variabilidad interensayo. En consonancia con los %CV obtenidos en el apartado anterior, los valores obtenidos se encontraban muy por debajo de los límites establecidos, indicando que el ensayo es altamente reproducible y es capaz de discriminar una muestra de otra.

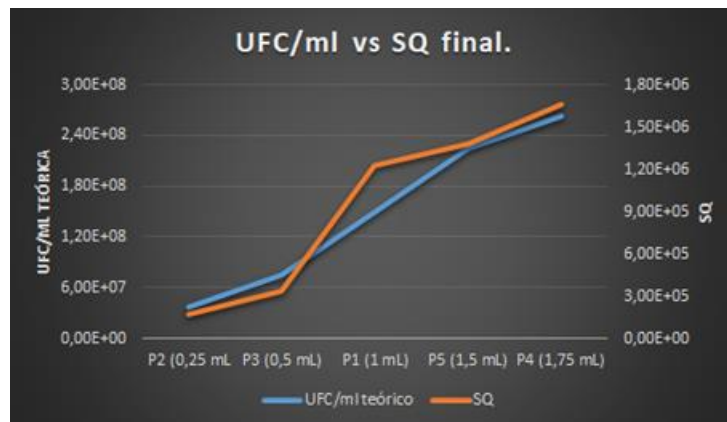


**Figura 10.** Izquierda: Media , desviación estándar (SD) y coeficiente de variación (%CV) de los valores de ciclo de cuantificación (Cq) para cada proporción (volumen de *B. subtilis* en la mezcla) de cada réplica. Derecha: representación de las distintas proporciones en volumen de *B.subtilis* frente al ciclo de cuantificación (Cq) (eje Y primario) y a la cantidad de ADN de partida estimada (SQ) (eje Y secundario) para cada réplica.



**Figura 11.** Media, desviación estándar y coeficiente de variación calculados como media de los valores de ciclo de cuantificación (Cq) para cada proporción (volumen de *B. subtilis* en la mezcla) de cada una de las réplicas. Derecha: combinación de las tendencias mostradas en las gráficas de cada una de las réplicas representadas en la Figura 10.

Por último, en la Figura 12 se puede observar la tendencia esperada del incremento de las UFC/ml teóricas con respecto a la cantidad de ADN (SQ) determinada por qPCR. Las UFC/ml teórica final y la SQ final, se calcularon como el promedio de las UFC/ml teórica y las SQ particulares de cada réplica del ensayo.



**Figura 12.** Representación gráfica de las UFC/ml teóricas y de la cantidad de ADN estimada (SQ) frente a las distintas proporciones en volumen de *B. subtilis* en mezcla con *F. oxysporum*. Los datos son la media de las tres réplicas del ensayo de la fase 2.

### 4.3. Experimento 3: Validación de la aplicación del ensayo de qPCR.

Tras comprobar la sensibilidad, eficacia, precisión y reproducibilidad del ensayo qPCR con los cebadores de la ADN girasa de *B. subtilis*, en mezclas preparadas de *B. subtilis* y *F. oxysporum*, se procedió, finalmente, a validar la aplicabilidad del ensayo qPCR para la monitorización de *B. subtilis* en un cultivo de ambos microorganismos en polietileno como única fuente de carbono. Para ello se tomaron muestras a distintos tiempos (cada 7 días durante un total de 28 días) a partir de dos matraces réplica del cultivo. Tal y como se mencionó previamente, inicialmente se dispuso de tres cultivos (matraces) para el estudio, pero uno de ellos (matraz 1) se contaminó, de modo que los análisis se realizaron exclusivamente en los dos matraces no contaminados (matraces 2 y 3).

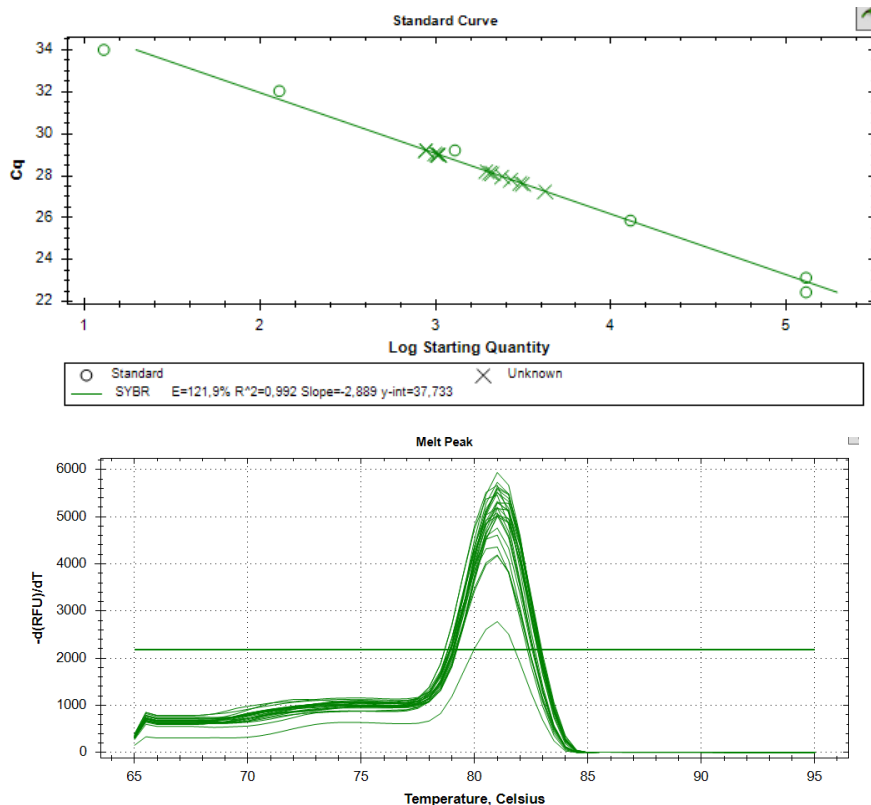
Como se puede apreciar en la imagen superior de la Figura 13, la curva estándar presentó unos parámetros con los siguientes valores:

- Eficiencia de amplificación, E: 121,9%
- Coeficiente de linealidad  $R^2$ : 0,992
- Pendiente: - 2,889
- Y-intercept: 37,73

Siguiendo el mismo método de análisis de resultados de la sensibilidad del ensayo de la fase 2 y ajustándose a los valores óptimos presentados en la tabla de la Figura 8 podemos afirmar que la eficiencia de amplificación se encuentra fuera del rango óptimo de  $90\% < E < 110\%$ , indicando que el ensayo precisó de un menor número de copias del gen para alcanzar el límite de detección. Estos resultados confirman la tendencia observada en las réplicas del ensayo de la fase 2, en el que 2 de las 3 réplicas mostraron una elevada eficiencia de amplificación. El motivo del elevado valor de este parámetro, es muy probablemente que esté causado por activadores de la ADN polimerasa. Por otro

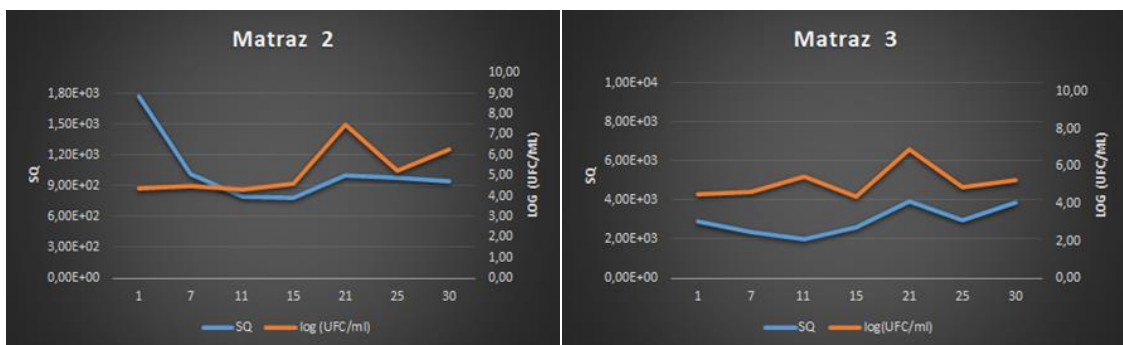
lado, la pendiente se alejó del valor óptimo de -3,32 (pendiente de un ensayo con E=100%), tendencia esperada que puede explicarse a través de la ecuación presentada en el apartado del análisis de sensibilidad de la fase 2 (Ecuación [2]). Por otro lado, el coeficiente de regresión lineal se acercó a 1, indicando que los datos experimentales se ajustaban a la línea teórica y que la precisión del pipeteo fue buena. Por otro lado, el valor de y-intercept excedió solo 0,73 puntos del límite superior del rango óptimo, pudiendo afirmar que la sensibilidad del ensayo y que la estimación de la cantidad de ADN fue buena. Por último, los NTCs mostraron Ct=35, valor que coincide con el límite inferior del rango óptimo, indicando que la reacción había ocurrido de forma específica, tal y como confirmó la curva de fusión y que no se había amplificado ningún contaminante. En general, los valores de los parámetros continuaron con la tendencia observada en las réplicas del ensayo de la fase 2, corroborando que el ensayo diseñado es específico.

En el gráfico inferior de la figura 13, se muestra una representación de la caída de fluorescencia respecto a la temperatura. Como se puede apreciar, todos los amplicones devolvieron una temperatura de fusión de 81 °C, valor que se encuentra 0,5 °C por debajo de la temperatura de fusión estimada por Umelt Quartz™ y 1 °C por encima de la temperatura de fusión calculada a partir de las gráficas de picos de fusión de las réplicas del ensayo de la fase 2. Estas variaciones son ínfimas y pueden considerarse como inherentes a los ensayos.



**Figura 13.** Imagen superior: curva estándar del ensayo con LDPE de la fase 3. Imagen inferior: pico de fusión del amplicón del gen GyrB del ensayo de la fase 3.

Para finalizar, en la Figura 14 se representan las cantidades de ADN estimadas (SQ) y los recuentos de *B. subtilis* (Log UFC/mL) para cada uno de los tiempos de incubación en los dos cultivos (matraces 2 y 3). En el matraz 2, se puede apreciar un descenso de la cantidad de copias iniciales del gen cuantificadas desde el día 1, hasta el día 15, momento a partir del cual se detectó un incremento de la cantidad de ADN, alcanzando el máximo en el día 21, para experimentar un posterior ligero descenso. Por otro lado, la carga microbiana se mantuvo estable, desde el día 1 hasta el día 15, para incrementarse posteriormente, alcanzando el máximo a los 21 días de cultivo, coincidiendo con el máximo detectado mediante qPCR, para volver a descender posteriormente. En el matraz 3, las variaciones fueron similares a lo observado en el matraz 2, con picos de copias y recuentos celulares a los 21 días y posterior descenso; sin embargo, en este caso no ocurrió el descenso acusado de copias de ADN de *B. subtilis* desde el día 1 al 15 detectado en el matraz 2. Este aspecto debe ser evaluado con detalle. En general, el perfil temporal de recuentos de la bacteria y copias de ADN de la misma en el matraz 3 fueron más coherentes que en el matraz 2. Las medidas detectadas mediante ambos métodos fueron prácticamente paralelas, tal y como cabría esperar de la información similar aportada por ambas técnicas. La estabilidad en los valores durante los primeros 15 días de cultivo puede ser debida a que la bacteria ha de sintetizar toda la maquinaria molecular necesaria para adaptarse a las condiciones restrictivas del medio de cultivo, en el que el polietileno es la única fuente de carbono. En cuanto al descenso brusco del número de copias de ADN del día 1 a 11, puede deberse a la presencia de ADN libre procedente de la fase de extracción de ADN o, por otro lado, puede ser ADN procedente de células no viables que perecieron en la primera etapa de adaptación al medio de cultivo.



**Figura 14.** Evolución de la cantidad de ADN (SQ) y de las células viables (UFC/ml) de *B. subtilis* en co-cultivo con *F. oxysporum* en medio con polietileno como única fuente de carbono. Se representan los valores obtenidos en cada una de las réplicas de cultivo empleadas (matraces 2 y 3). Los resultados del matraz 1 no se incluyeron debido a que se detectó una contaminación. El eje X representa el tiempo de cultivo en días.

## 5. Conclusiones

Los resultados obtenidos permitieron obtener las siguientes conclusiones:

1. El kit PowerSoil y el choque térmico son métodos de extracción adecuados para la obtención de ADN de *B. subtilis* mezclado con *F. oxysporum*. Los cebadores de síntesis para el gen de la subunidad B de la DNA girasa (GyrB) permiten amplificar el ADN extraído, por lo que se valida de forma preliminar su especificidad para la detección de *B. subtilis* en la mezcla.
2. El ensayo de qPCR con SYBR green configurado para cuantificación absoluta mediante recta de calibrado específica y con cebadores GyrB especie-específicos para *Bacillus* permite la detección y la cuantificación reproducible, específica y sensible de *B.subtilis* combinado en distintas proporciones con *F. oxysporum*.
3. El ensayo de qPCR diseñado es aplicable para el seguimiento de *B.subtilis* en cultivo mixto con *F.oxysporum* y en medio con polietileno como única fuente de carbono.

## 6. Bibliografía

- Adams, S (2006). Data analysis and reporting, Real-time PCR edited by M. Tevfik Dorak (pp. 40-57). Taylor and Francis.
- Bilodeau GJ, Koike ST, Uribe P, Martin FN. (2012) Development of an assay for rapid detection and quantification of *Verticillium dahliae* in soil. *Phytopathology* 102:331–343
- Bruzzone CM, Tawadros PS, et al. (2013) Enhanced Primer Selection and Synthetic Amplicon Templates Optimize High-Resolution Melting Analysis of Single-Nucleotide Polymorphisms in a Large Population. *Genet Test Mol Biomarkers*, 17(9):675–680.
- Bustin SA, Nolan T (2004) Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech* 15: 155–166
- Bustin SA: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000, 25:169-19
- Bustin, S. A., & Nolan, T. (2004). Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of biomolecular techniques: JBT*, 15(3), 155.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., et al. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797
- Cabrera, M. (2021). Diseño de un consorcio microbiano degradador de polietileno de baja densidad y validación de su actividad. Trabajo Fin de Grado en Biotecnología. Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Almería.
- Canfora, L., Malusa, E., Tkaczuk, C., Tartanus, M., Łabanowska, B.H. and Pinzari, F. (2016) Development of a method for detection and quantification of *B. brongniartii* and *B. bassianai* in soil. *Sci Rep* 6, 22933.



- Covarelli L, Beccari G, Steed A, Nicholson P. (2012) Colonization of soft wheat following infection of the stem base by *Fusarium culmorum* and translocation of deoxynivalenol to the head. *Plant Pathol* 61:1121–11.
- de Silva, D, Wittwer, CT. 2000. Monitoring hybridization during polymerase chain reaction.
- Debode J, Van Hemelrijck W, Baeyen S, Creemers P, Heungens K, Maes M. (2009) Quantitative detection and monitoring of *Colletotrichum acutatum* in strawberry leaves using real-time PCR. *Plant Pathol* 58:504–514
- Demontis MA, Cacciola SO, Orru M, Balmas V, Chessa V, Maserti BE, Mascia L, Raudino F, Magnano Di San Lio.
- Dwight Z, Palais R, Wittwer CT. (2011) uMELT: prediction of high-resolution melting curves and dynamic melting profiles of PCR products in a rich web application. *Bioinformatics*. 27(7):1019– 1020
- Guy RA, Kapoor A, Holicka J, Shepherd D & Horgen PA (2006) A rapid molecular-based assay for direct quantification of viable bacteria in slaughterhouses. *J Food Protect* 69: 1265–1272.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., and Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 10, 413–417.
- J. Chromatog. Biomed. Sci Appl.*, 741(1), 3–13.
- Janshekar, H. (1985). Microbial enhanced oil recovery processes. *Microb Oil Recov*, 1, 54-84.
- Jimenez-Fernandez D, Montes-Borrego M, Navas-Cortes JA, Jimenez-Diaz RM, Landa BB. (2010) Identification and quantification of *Fusarium oxysporum* in plants and soil by means of an improved specific and quantitative PCR assay. *Appl Soil Ecol* 46:372–382.
- Klenow H and Henningsen I (1970). «Selective Elimination of the Exonuclease Activity of the Deoxyribonucleic Acid Polymerase from *Escherichia coli* B by Limited Proteolysis». *Proc Natl Acad Sci* 65: 168-175. PMID 4905667. doi:10.1073/pnas.65.1.168
- Klenow H and Henningsen I (1970). «Selective Elimination of the Exonuclease Activity of the Deoxyribonucleic Acid Polymerase from *Escherichia coli* B by Limited Proteolysis». *Proc Natl Acad Sci* 65: 168-175. PMID 4905667. doi:10.1073/pnas.65.1.168
- Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. *Frontiers in microbiology*, 8, 108
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., Stahlberg, A+, and Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.* 27,95-125.
- Lees AK, Sullivan L, Lynott JS, Cullen DW. (2012) Development of a quantitative real-time PCR assay for *Phytophthora infestans* and its applicability to leaf, tuber and soil samples. *Plant Pathol* 6:867–876.
- Li Y, Minerdi D, Garibaldi A, Gullino ML. (2009) Molecular detection of *Phytophthora cryptogea* on *Calendula officinalis* and *Gerbera jamesonii* artificially inoculated with zoospores. *J Phytopathol* 157:438–445.
- Lievens B, Brouwer M, Vanachter ACRC, Cammue BPA, Thomma BPHJ. (2006) Real-time PCR for detection and quantification of fungal and oomycete tomato pathogens in plant and soil samples. *Plant Sci* 171:155–165.

- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods.*, 25(4): 402-408, 2001.
- López-González, J. A., Vargas-García, M.C., López, M. J., Suárez-Estrella, F., del Mar Jurado, M., & Moreno, J. (2015). Biodiversity and succession of mycobiota associated to agricultural lignocellulosic waste-based composting. *Bioresource Technology*, 187, 305-313.
- Nitsche, A (2007). Oligonucleotide Design for in-house real-time PCR applications in microbiology. *Real-time PCR in microbiology, from diagnosis to characterization* (pp. 41-71). Caister Academic Press. Norfolk, UK.
- Nitsche, A (2007). Oligonucleotide Design for in-house real-time PCR applications in microbiology. *Real-time PCR in microbiology, from diagnosis to characterization* (pp. 41-71). Caister Academic Press. Norfolk, UK.
- Park, S., Hanning, I., Jarquin, R., Moore, P., Donoghue, D., Donoghue, A. and Ricke, S., 2011. Multiplex PCR assay for the detection and quantification of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella* serotypes in water samples. *FEMS Microbiology Letters*, 316(1), pp.7-15.
- Pfaffl M (2004) Quantification strategies in real-time PCR. In: *A–Z of Quantitative PCR* (ed Bustin SA) pp 441–492. International University Line, La Jolla, CA
- Pfaffl MW, Hageleit M: Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechn Lett* 2001, 23:275- 282.
- Pfaffl, M.W., Georgieva, T.M., Georgiev, I.P., Ontsouka, E., Hageleit, M., and Blum, J.W., Real time RT-PCR quantification of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF-1 receptor, IGF-2, IGF-2 receptor, insulin receptor, growth hormone receptor, IGF-binding proteins 1, 2 and 3 in the bovine species. *Domest Anim Endocrinol.*, 22(2): 91-102, 2002.
- Reynisson, E, Josefsen, MH, Krause, M, Hoorfar, J. 2006. Evaluation of probe chemistries and platforms to improve the detection limit of real-time PCR. *J. Microbiol. Methods*, 66(2), 206–16.
- Ririe, KM, Rasmussen, RP, Wittwer, CT. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.*, 245(2), 154–60.
- Rychlik, W. (1995). Priming efficiency in PCR. *Biotechniques* 18,84-90.
- Saiki et al. (1988). «Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase». *Science* 239: 487-91. PMID 2448875. doi:10.1126/science.2448875.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., et al. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350–1354.
- San Millán RM, Martínez-Ballesteros I, Rementeria A, Garaizar J, Bikandi J. 2013. Online exercise for the design and simulation of PCR and PCR-RFLP experiments. *BMC Research Notes* 6:513.
- SantaLucia, J. (1998). A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(4), 1460-1465.

- Sanzani, S. M., Li Destri Nicosia, M. G., Faedda, R., Cacciola, S. O., & Schena, L. (2014). Use of quantitative PCR detection methods to study biocontrol agents and phytopathogenic fungi and oomycetes in environmental samples. *Journal of Phytopathology*, *162*(1), 1-13.
- Scott Adams, P (2006). Data analysis and reporting. *Real-time PCR* (pp. 39-59) . Taylor & Francis.
- Tajadini, Mohamad Hasan, Mojtaba Panjehpour, and Shaghayegh Haghjooy Javanmard. "Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes." *Advanced Biomedical Research*. Medknow Publications & Media Pvt Ltd, 2014. Web. 13 Mar. 2017.
- Tsao PH. (1970) Selective media for isolation of pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol* 8:157–186
- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Gundry, C.N., and Elenitoba-Johnson, K.S., Real-time multiplex PCR assays. *Methods.*, *25*(4): 430-42, 2001.
- Xie, S., Yu, H., Wang, Q., Cheng, Y., & Ding, T. (2020). Two rapid and sensitive methods based on TaqMan qPCR and droplet digital PCR assay for quantitative detection of *Bacillus subtilis* in rhizosphere. *Journal of applied microbiology*, *128*(2), 518-527.
- Yang, S., and Rothman, R. E. (2004). PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect. Dis.* *4*, 337–348.
- Zhou, L, Wang, L, Palais, R, Pryor, R, Wittwer, CT. 2005. High-resolution DNA melting analysis for simultaneous mutation scanning and genotyping in solution. *Clin. Chem.*, *51* (10), 1770–7.