

Euskal Herriko Unibertsitatea / Universidad del País Vasco

Kimika fakultatea / Facultad de Química

Kimikako gradua

GRADU AMAIERAKO LANA

***Aspergillus nidulans* onddo eta bakterio
azido laktiko arteko ko-kulturak**

Egilea: Rebeca Mate Infante

Zuzendaria(k): Oier Etxebeste Juarez

Donostia, 2021ko iraila

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

LABURPENA

Hainbat artikulu zientifikok onddo eta bakterioen artean interakzio antifungiko eta antibakterianoak ezartzen direla deskribatu du. Bi mikroorganismo moten interakzioen azterketa, zientzian erabilgarritasun handia izan dezaketen bigarren mailako metabolitoak eta konposatu antibakterianoak identifikatzeko bideratu daiteke GrAL honetan, *Aspergillus nidulans* harizpi itxurako onddoa eta GlycoBAL taldeak isolatutako bakterio azido laktikoen (BAL) hainbat anduien artean (E11, AST1 eta AC1) egon daitezkeen interakzioak aztertu dira. Horretarako, aztergai diren BAL anduien hazkuntza patroien ezaugarritzea burutuko da, onddo-bakterio kointuratan BAL inokulua parekoa izan dadin andui guztientzat. Modu honetan, BAL andui bakoitzaren gaitasun antifungikoaren kuantifikazioa egingo da. BAL anduien hazkuntzaren kuantifikazioa absorbantzia (600 nm-tan) eta osatutako kolonia kopuruan (UFC/mL; unidades formadoras de colonia) oinarrituz burutu da. Lan honetan egindako onddo-BAL arteko kointurek, E11 BAL anduiak efektu antifungiko/fungitastiko indartsuena eta iraunkorra izan dezakeela iradokitzen dute.

ABSTRACT

Several scientific articles describe that antifungal and antibacterial interactions are established between fungi and bacteria. The interaction study of both microorganisms can guide the identification of secondary metabolites and antibacterial compounds that may have scientific applications. Therefore, in this end-of-degree project the hypothetic interactions between the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* and specific lactic acid bacterial (LAB) strains (E11, AST1 and AC1) isolated by the GlycoBAL group have been analyzed. With this aim, a characterization of the growth patterns of LAB strains will be performed, so that the inoculum of LAB strains in fungal-bacterial co-cultures can be equivalent. From these co-cultures, the antifungal capacity of each LAB strains will be quantified. Quantification of the growth of LAB strains has been performed based on absorbance (600 nm) and colony-forming units (CFU). Co-cultures between fungi and LAB strains performed in this work showed that the strain E11 may have the strongest and most lasting antifungal/fungistatic effect.

AURKIBIDEA

1. SARRERA	7
1.1. Bakterioen ezaugarri orokorrak; definizioa, taxonomia, morfologia eta gure bizitzan duten garrantzia.....	7
1.2. Bakterio azido laktikoak (BAL).....	8
1.3. Bakterioen zatiketa zelularra.....	8
1.4. Bakterioen hazkuntza kurba: oinarria eta faseak.	10
1.4.1. Zelula bideragarrien zenbaketa metodoa.....	11
1.4.2. Turbidimetria metodoa.....	12
1.4.3. Hazkuntza kurbaren faseak.	14
1.4.3.1. Egokitzapen-fasea.	15
1.4.3.2. Fase esponentziala.....	16
1.4.3.3. Fase geldikorra.	16
1.4.3.4. Heriotza-fasea.....	16
1.4.4. Bakterioen hazkuntzan eragina duten faktoreak.....	17
1.5. Hazkuntza kurben adierazpen matematikoak.....	17
1.6. Onddoen erreinua.....	18
1.7. <i>Aspergillus nidulans</i> harizpi itxurako onddoa.	18
1.8. Onddo eta BAL arteko ko-kulturen garrantzia.....	19
1.9. Grado amaierako lan honen ikerketaren abiapuntua.	19
2. HELBURUAK	21
3. MATERIAL ETA METODOAK	23
3.1. Erabilitako mikroorganismoak.....	23
3.2. Kultura medioak eta hauen prestaketa.	23
3.3. BAL <i>stock</i> kultiboen prestaketa.	25
3.4. BAL anduien hazkuntza kurben azterketa.	26
3.5. <i>A. nidulans</i> -en espora asexualen suspentsioren prestaketa.	29
3.6. <i>A. nidulans</i> eta BAL-en arteko ko-kulturak.	30
3.6.1. BAL anduien biomasaren kontrola MRS medio solidoan.	31

3.6.2. Ko-kulturak egiteko prozedura.	32
4. EMAITZAK	35
4.1. BAL hazkuntza kurbak.	35
4.1.1. E11 anduiaren hazkuntza kurba.	35
4.1.2. AST1 anduiaren hazkuntza kurba.	37
4.1.3. Bi BAL anduien arteko hazkuntzen arteko konparaketa.	39
4.2. Ko-kulturak.	41
4.2.1. BAL anduien biomasa kontrola.	41
4.2.2. <i>A. nidulans</i> eta BAL anduien arteko ko-kulturak.	41
5. EZTABAIDA	43
6. ONDORIOAK	45
6.1. BAL hazkuntza kurbak.	45
6.2. BAL eta <i>A. nidulans</i> ko-kulturak.	45
7. CONCLUSIONS	47
7.1. BAL growth curves.	47
7.2. Co-cultures of BAL and <i>A. nidulans</i>	47
8. BIBLIOGRAFIA	50

1. SARRERA

Atal honetan, erabilitako bi mikroorganismo taldeen eta metodoen oinarri teorikoa azalduko da. Lehenik eta behin, bakterioetan oinarrituz, hauen ezaugarri orokorrak, bakterio azido laktikoak, bakterioen zatiketa zelularra, hazkuntza kurbaren oinarria eta faseak, eta hau eraikitze erabiltzen diren metodoak azalduko dira. Bigarrenik, onddoen erreinuan zentratuz, *A. nidulans* modelo espeziearen zenbait ezaugarri adieraziko da. Azkenik, bi mikroorganismo hauen ko-kulturen ikerketaren garrantzia azaldu egin da.

1.1. Bakterioen ezaugarri orokorrak; definizioa, taxonomia, morfologia eta gure bizitzan duten garrantzia.

Bakterioak zelula biologiko mota bat dira eta mikroorganismo prokarioten domeinu handia osatzen dute. Lurrean agertu ziren lehen izaki bizidunak dira, duela 3,5 bilioi urte, eta gaur egun, ingurune guztietan (atmosfera, hidrosfera, litosfera eta biosferan) aurkitzen dira. Begi bistaz ikusezinak izan arren, karbono kantitate zelularrean oinarrituz luraren biomasaren %60-a osatzen dute. Bakterioak lurreko biotaren funtsezko osagaiak dira eta ezinbestekoak diren ziklo biogeokimikoak katalizatzen dituzte (Whitman *et al.*, 1998).

Bakterioak, orokorrean, mikrometro gutxi batzuk neurtzen duten zelula bakun bereizigabetzat hartzen dira, hauen luzera diametroan orokorrean 1-10 μm artekoa izanik. Bakterioak oro har deskribapen horretara egokitzen diren arren, bakterio morfologiko eta funtzionalki oso desberdinak daude. Bakterio txikienek 0,15 μm -ko diametroa izan dezakete, eta handienak ordea 700 μm baino gehiago. Morfologiari dagokionez, itxura oso ezberdinak dituzte, esferikoak (*coccus*) eta baziloak (*bacillus*) ugariak izanik (Madigan *et al.*, 2019).

Bakterioen artean, 30 adar filogenetiko nagusi deskribatu dira (Madigan *et al.*, 2019). Hala ere, deskribatutako organismoen artean %90 baino gehiago *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* eta *Bacteroidetes* filoen barruan sailkatzen dira (Madigan *et al.*, 2019). Halaber, 16S rRNA genearen sekuentzien analisiak (Ramazzotti *et al.*, 2018) demostratzen dute 80 bakterio adar filogenetiko baino gehiago daudela (Madigan *et al.*, 2019). Honek agerian uzten du lehen aipatutako aniztasuna. 16S rRNA genea erribosomaren 30S subunitatea osatzen duten RNA-etako bat da eta 1980ko hamarkadan, Carl Woese-k azterketa filogenetikoetan erabiltzeko egokia zela frogatu zuen (Woese & Fox, 1977). Woese lanari esker, bizitzaren zuhaitzak adar berri bat irabazi zuen, eta aurretik ezezagunak ziren organismoak Archaea gisa sailkatu zituen, bakterioekiko eremu filogenetikoki ezberdina dena. Gene honen erabilpenaren arrazoietatik bat

organismo prokariota gehienetan presente dagoela da (Ramazzotti *et al.*, 2018). Lan honetan aztertutako bakterioak, *Firmicutes* filoaren barruan sailkatzen dira.

1.2. Bakterio azido laktikoak (BAL).

Bakterio azido laktikoak (BAL) hartxidura prozesuan azido laktikoa produzitzen duten bakterio talde oso heteroena da (Gopal, 2020). Hartxidura laktikoa mintz plasmatikoa ematen den bide metaboliko anaerobikoa da, hemen glukosa degradatzen da energia metabolikoa lortzeko produktu nagusi bezala azido laktikoa lortuz. BAL-ak esferiko ala bazilo formakoak, gram positiboak, katalasa negatiboak, ez esporulatuak, anaerobioak, aerotoleranteak eta azido laktikoaren ekoizle gisa deskribatzen dira (Gopal, 2020).

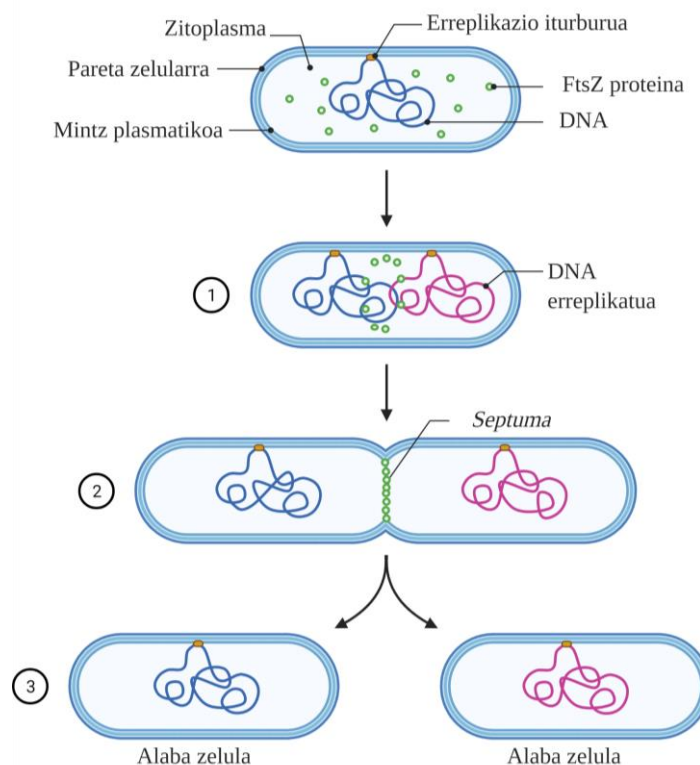
Aplikazioei dagokionez, BAL andui desberdinak industrian zenbait produktuen hartxiduran asko erabiltzen dira, hauek elikagaiei zenbait ezaugarri emateko, hala nola, zapore eta aroma bereizgarriak, eta beste organismo kaltegarrien ekintzaren aurka babesteko erabiltzen dira. BAL-ek paper erabakigarria jokatzen dute elikagaien segurtasunean eta higiean (Heredia-Castro *et al.*, 2017).

BAL gehienak exopolisakarioak (EPS) deituriko polisakaridoak ekoizten dituzte. EPS-ek polisakaridoen talde anitza osatzen dute. EPS-ak kokapenaren (jariatua edo kapsularra), konposaketaren (monomero bakar, homopolisakaridoak edo anitzez, heteropolisakaridoak, osatuak) eta egiturazko ezaugarrien (masa molekularra, adarrak, karga, unitate errepikakorra) arabera bereiz daitezke (Mende *et al.*, 2020). EPS askok eremu estrazelularrean metatzen dira eta kultiboari likatasuna ematen diote (Mende *et al.*, 2020). Biopolimero hauen funtzioak oraindik ez daude guztiz zehaztuta, baina, orokorrean, babes funtzioa dutela onartzen da (Donot *et al.*, 2012). EPS-ek deshidratazioa, mikroorganismo patogeno eta konposatu toxikoen aurrean zelula babesten dute (Korc *et al.*, 2021). Propietate hauei esker, oso erabiliak dira elikagai industrian (Korc *et al.*, 2021), baina baita farmazia eta kosmetikoen industrian ere (Daba *et al.*, 2021).

1.3. Bakterioen zatiketa zelularra.

Mikrobiologian, hazkuntza zelula kopuruaren handipena bezala definitzen da, eta hau, aldi berean, zatiketa zelularren emaitza da. Bakterioak asexualki bikoizten dira erdibiditze izeneko zatiketa zelularra prozesuaren bitartez (“binary fission” ingelesez). Horrela, bakterio-ama batetik, tamaina eta forma beretsuko bi alaba zelula sortzen dira. Zelularen erdibidite

prozesua mutaziorik gabe ematen dela suposatuz, sortutako alaba zelulak genetikoki berdinak izango dira (Madigan *et al.*, 2019). Bakterioen zatiketa zelularra (1go irudia) hiru pausutan bana daiteke: DNAREN bizkoizketa, zelularen elongazioa eta banaketa. Zatiketa zelularren lehenengo pausuan, DNA zirkularra deskribildu eta bikoiztu egiten da; modu honetan, zelula kume bakoitzak DNAREN kopia bat jasoko du (1go irudiaren 1. pausua). Prozesu hau DNA polimerasa konplexu entzimak burutzen du. Honek erreplikazio iturburu edo *ori* (*origin of replication* ingelesez) deituriko sekuentzia identifikatu, honi lotu eta molde bezala duen DNAREN base nitrogenatu konplementarioak gehitzen ditu. Bakterioek kromosoma zirkularra dutenez, bi erreplikazio muturrak elkartzen direnean prozesua amaitzen da eta horrela bi DNA kopia lortzen dira. Ondoren, bigarren pausuan, zelula elongatu eta bi kromosomak banatzen dira zelularen kontrako muturretara (“poloak” bezala ezagutzen direnak) mugituz. Jarraian, zelularen erdian zatigune bat osatzen hasten da, *septum* deiturikoa (1go irudiaren 2. pausua). *Septum*-aren osaketak jarraitzen du bi alaba zelulak banatu arte. *Septum*-a osatzeko FtsZ proteinaren aktibitatea beharrezkoa da, besteren artean. Honek, elongazio orduan zelularen erdian kokatu (ikus 1go irudia) eta polimerizatu ondoren, bi zelulak banatzen dituen “Z eraztuna” sortzen du (Mahone & Goley, 2020). Eraztuna guztiz osatu ondoren bi zelulak banatu eta genetikoki berdinak diren alaba zelulak lortzen dira (1go irudiaren 3. pausua).



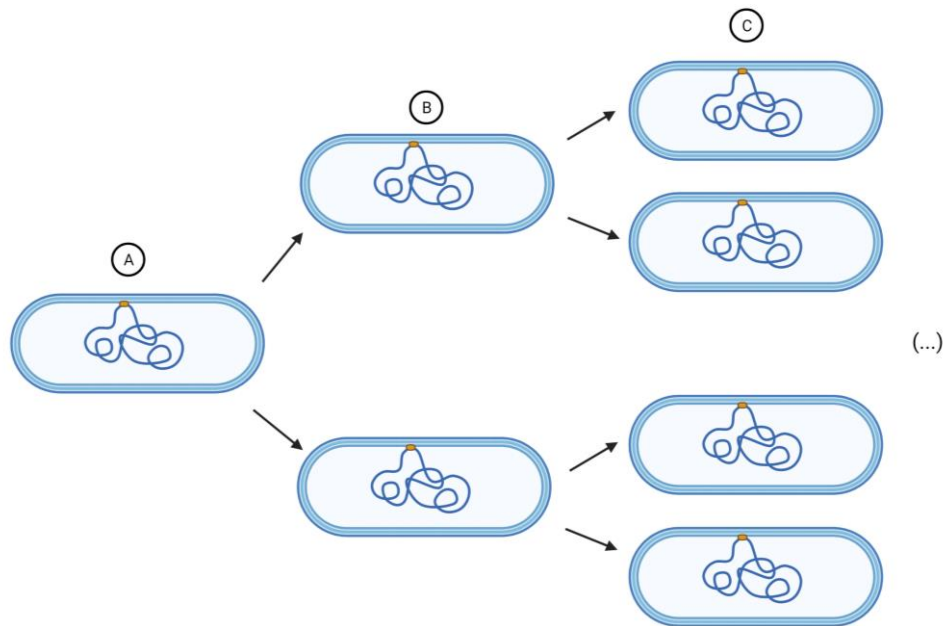
1. irudia. Bazilo morfologia duen bakterio zelula baten zatiketa zelularren irudikapena. Irudiaren goikaldean deskribatutako bakterio zelula bere osagai guztiekin agertzen da. Osagaien artean, urdinez DNA (erreplikazio iturburuarekin), pareta zelularra, mintz plasmatikoa eta FtsZ proteinak adierazten dira. Ondoren, bakterioak jasaten

duen zatiketa zelularra hiru pausutan irudikatuta agertzen da. Prozesuaren pausuak honako hauek dira. 1. DNA-ren erreplikazioa. 2. DNA-ren kopia bakoitzaren banaketa eta FtsZ proteinaren kokapena eta polimerizazioa. 3. *Septum*-aren osaketa eta bi zelula alaben banaketa. Irudia biorender® *software*-tik hartu eta editatu da.

Bakterio zelula batetik bi alaba zelula sortzen direnean belaunaldi bat gertatu dela esaten da, eta prozesu horretarako beharrezkoa den denbora belaunaldi denbora (g) bezala definitzen da. Belaunaldi denbora bakterio espezie bakoitzerako ezberdina da eta elikagai, temperatura eta ezaugarri genetikoaren menpe dago (Madigan *et al.*, 2019). Bakterio batzuk, egoera optimoetan oso azkar ugaltzen dira. Esaterako, *Escherichia coli* 20 minuturo erdibitzen da (Štumpf *et al.*, 2020). Bakterio batzuen ziklo zelularra azkarragoa izan daitekeen arren, orokorrean, askoz motelago erdibitzen dira, ordu edo egunetako belaunaldi denborak izanik.

1.4. Bakterioen hazkuntza kurba: oinarria eta faseak.

Modu honetan, bakterio-populazioaren “bikoizketa lokala” gertatzen da (2. irudia). Zatiketa ondoen sortutako bi zelula alabek ez dute nahitaz bizirik iraun behar. Hala ere, bizirik atera diren kopuruak batzuetan besteko balioa gainditzen badu, bakterio-populazioak hazkuntza esponontziala izango du. Bakterioen hazkuntza kurbaren azterketa ezinbestekoa da eta horregatik mikrobiologo guztien oinarritzko formazioaren parte da. Hazkuntza kurba osatzeko, denboran zehar bakterio-populazioaren handipenaren jarraipena egiten da. Horretarako, hainbat metodo dago: zelula zenbaketa mikroskopia bidez, zelula bideragarrien zenbaketa Petri plakatan, eta kultiboen analisi turbidimetrikoa (Madigan *et al.*, 2019). Lan honetan, erabilitako hiru bakterio anduien hazkuntzen kurben jarraipena egiteko aurretik aipatutako metodoetatik azkeneko biak erabili dira. Horrenbestez, jarraian horien oinarri teorikoa azalduko da.



2. irudia. Bakterio kultibo batean ematen den bikoizketa lokalaren irudikapena. Irudiaren ezker aldean bazilo forma duen bakterio zelula bakarra agertzen da (A). Deskribatutako zelularen erdibitze prozesua gertatu eta gero, genetikoki berdinak diren bi alaba zelula ikusten dira (B). Era berean, lortutako zelula bakoitza erdibitzen denean (C), bakoitzetik beste bi zelula lortzen dira. Baldintza egokietan, zelulen erdibitze prozesua behin eta berriz emango da eta ondorioz bakterio populazioa modu esponontzialean haziko da. n bikoizketa kopurua bezala definitzen bada, 2^n zelula lortzen dira. Irudia *biorender*[®] *software*-rarekin sortu da.

1.4.1. Zelula bideragarrien zenbaketa metodoa.

Metodo honen bitartez kultibo baten zelula bideragarrien kopurua determinatzen da. Zelula bideragarriak bizitzeko gaitasuna duten zelulak bezala definitzen dira. Zelula bideragarrien zenbaketa egiteko bi metodo daude: *spread-plate* metodoa eta *pour-plate* metodoa (Madigan *et al.*, 2019). *Spread-plate* metodoan, kultibo baten lagin diluituaren bolumen jakin bat (0,1 mL edo gutxiago) agarrarekin gogortuta dagoen kultura medioaren gainean isuri eta hagatxo batekin zabaltzen da dena absorbatu arte. *Pour-plate* metodoan, ordea, kultibo baten bolumen zehatza (0,1.-1,0 mL artekoa) esterilizatua dagoen petri plaka baten gainean pipeteatzen da. Ondoren, agarrarekin eta 50 °C-tara egokituta dagoen kultura medioa esterilizatua gehitzen da eta laginarekin nahasten da medioa gogortu arte. Lan honetan, *spread-plate* metodoa erabili da (metodoaren diagrama 3.4. atalean, 8. irudian, ikus daiteke).

Plakan inokulatzen diren zelula bideragarriak bikoizten joango dira koloniak osatuz. Kolonia kopurua UFC (*unidad formadora de colonias* gazteleraz; kolonia osatzeko unitatea) unitateaz kuantifikatzen da. UFC-ak bolumen-unitateko, UFC/mL, edo masa-unitateko, UFC/g, eman daitezke. Aurretik azaldutako bi metodoetan, petri plaketan 30-300 UFC artean

irakurtzeko kultiboaren hainbat diluzio hamartar burutzen da (Madigan *et al.*, 2019). Plaka gainpopulatueta zelula guztiek ez dituzte ongi desberdindutako koloniak sortuko, batzuk fusionatu egingo direlako, kuantifikazioaren errorea handituz (Breed *et al.*, 1916). Gainera, kolonia kantitatea handia bada, zenbaketa zaildu daiteke, honek ere errorea handitzen duelarik. Kolonia kantitate txikietan, ordea, errorea ere handiagoa izango da. Zenbaketa metodo hau desiragarria da zelula bideragarri guztiak modu errezean kuantifika daitezkeelako. Beste metodoetan ordea, adibidez zenbaketa mikroskopikoan, biomasa osoa kuantifikatzen da, hots, zelula bideragarriak eta hilak batera. Hala ere, metodo honek hainbat desabantaila ditu. Batetik, plakak gutxienez 48 orduz kultibatu behar dira, koloniak egoki garatu ahal izateko. Honek kuantifikazioa mantsotzen du. Bestalde, zenbaketan errorea handitu dezakeen faktore ugari dago, hala nola, diluzioak, laginaren zabaltzea plakatan eta abar. Horregatik, zenbaketaren errepikakortasuna bermatzeko, kuantifikazioa bakoitza hainbat alditan egiten da (replikak). Hala eta guztiz ere, askotan lortutako desbideratze estandarrak handiak izaten dira (Madigan *et al.*, 2019).

1.4.2. Turbidimetria metodoa.

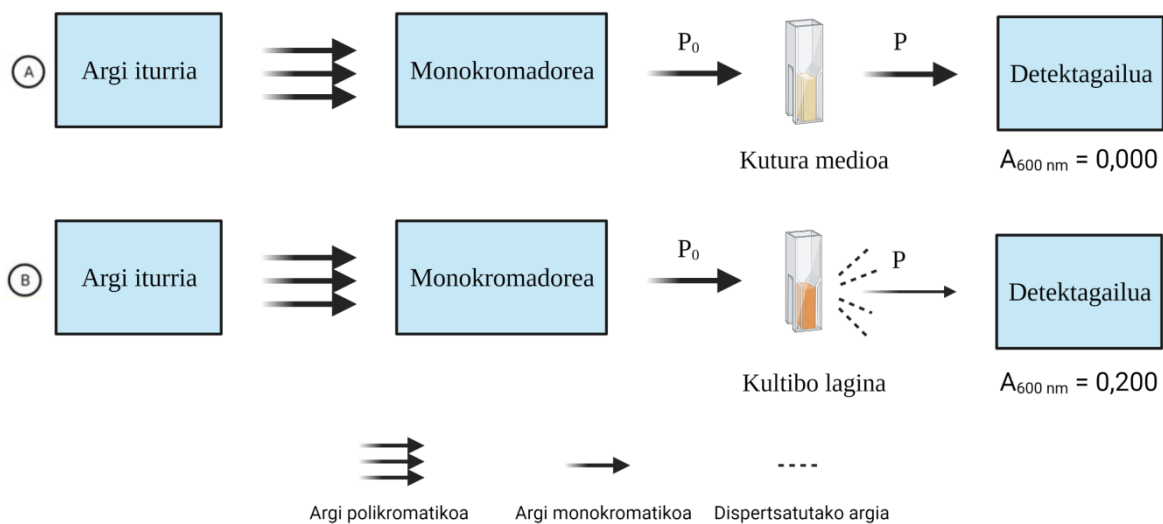
Turbidimetria bakterioen hazkuntza kurba lortzeko erabiltzen den metodo praktikoa da. Honetan kultibo baten uhertasuna neurtzen da. Uhertasuna suspentsioan dauden partikulen eraginez likido baten gardentasunaren murrizketa bezala definitzen da. Turbidimetria metodoan suspentsioan dauden partikulen dispersio efektuaren eraginez transmititutako argiaren intentsitate galera neurtzen da (Tortora *et al.*, 2007). Uhertasuna aparatu ezberdinetan neurtu daiteke baina, lan honetan, espektrofotometroaren bitartez neurtu da. Espektrofotometroa argia emititu (argi polikromatikoa), monokromadore baten bitartez uhin luzera espezifikoa duen argia lortu (argi monokromatikoa) eta laginatik pasatzen den argiaren intentsitatea detektagailu baten bitartez neurtzen duen aparatua da. Emititutako argiaren intentsitatea (I_0) eta irakurritako argiaren intentsitatearen (I) zatiketaren erlazio logaritmikoaren bitartez absorbantzia (A) edo dentsitate optikoa (DO) lortu daitezke (1go ekuazioa) (Harris, 2010).

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right)$$

1go ekuazioa. Absorbantzia eta irakurritako argiaren intentsitatearen arteko erlazio matematikoa.

Bakterioak kultura medio likidoan ugaltzen direnean, zelulak suspentsioan gelditu eta kultiboa uherra bihurtzen da. Kultibo baten bakterio zelulek argia dispersatzeko joera dute eta arrazoi honengatik, hazkuntza kurba lortzeko turbidimetria metodo egokia da. Orokorrean,

bakterio zelulak koloreak dira eta beraz argiaren absortzioa baztergarria da (Madigan *et al.*, 2019). Hala ere, argia absorbatzen duten bakterio zelulak daude, hauek bakterio fototrofikoak dira, eta hauen interakzio nagusia absortzioa izango da eta ez dispertsioa (Madigan *et al.*, 2019). Bakterio baten hazkuntzan zehar, 1.3. atalean azaldu den bezala, bakterio zelula kopuruaren handipena, hots, biomasaren handipena ematen da, eta beraz detektagailura iristen den argiaren intentsitatea (I) txikiagoa eta espektrofotometroak emandako A balioa handiagoa izango dira (3. irudia). Modu honetan, detektagailura iristen den argiaren intentsitatearen murrizketa kultibo horretan dagoen bakterio populazioarekin erlazionatu eta horrela denboran zehar hazkuntza kurba lortu daiteke. Espektrofotometroak uhertasunaren neurketak argiaren intentsitatearen aldaketa logaritmiko bezala ematen ditu eta hau absorbantzia (A) bezala definitu daiteke. A balio horiek plaketan egindako UFC zenbaketekin erlazionatu eta horrela lortutako balioak bakterio kopuru batekin erlazionatu daiteke.



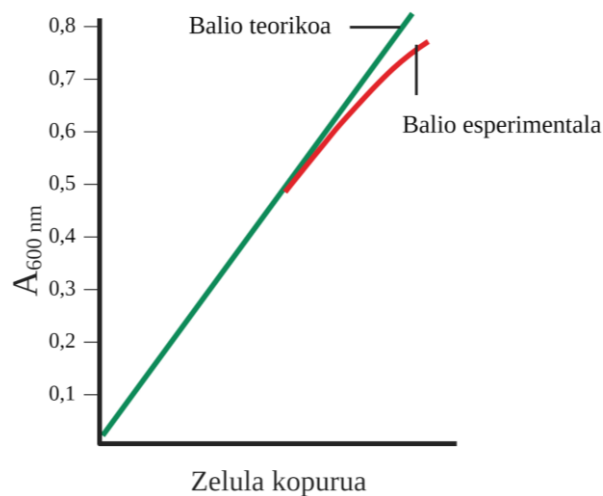
3. irudia. Espektrofotometroaren lan fluxuaren diagrama. Irudiaren A diagraman kutura medioaren, lagina gabe, $A_{600\text{ nm}}$ neurketa agertzen da. Irudiaren B diagraman, ordea, kultibo lagin baten neurketa dago. Honek bakterio zelulak suspentsioan dituen, espektrofotometroak emititzen duen argia dispertsatu eta detektagailura seinale txikiagoa iristen da. A espektrofotometroak emititutako eta detektagailuak irakurritako seinalearen arteko erlazioaren logaritmo bezala ezagutzen denez, detektagailuan iristen den seinalea txikiagoa izanda $A_{600\text{ nm}}$ balioa handiagoa lortzen da. Horrenbestez, geroz eta biomasa kantitatea handiagoa izan, orduan eta $A_{600\text{ nm}}$ balioa handiagoa izango da. Irudia biorender® software-arekin sortu da.

Bakterio kultibo bat uherra ikusten hasteko, mililitroko milioika zelula behar direla estimatzen da, eta espektrofotometroaren bitartez uhertasuna neurtzeko mililitroko 10-100 milioi zelular behar direla kalkulatu da (Tortora *et al.*, 2007). Hori dela eta, bakterio zelula kopuru txikia duten kultiboentzat ez da metodo egokia. Metodo hau erabilgarria da dentsitate txikiko suspentsioekin eta mikroorganismoak zelulabakarrak duten kultiboekin, ezaugarri hauek

zelulak modu homogeneoan banatzea ahalbidetzen baitute. Zelula-tamaina handiagoa duten mikroorganismoekin ere metodo hau ez da egokia izango.

Uhin-luzerari dagokionez, 480-600 nm arteko balioak erabiltzen dira, kultura medioaren arabera egokitzen direnak. Haragi edo legami estraktoa duen kultura medioa erabiltzen bada, neurketak 600 nm-tan egiten dira (Madigan *et al.*, 2019 eta Tortora *et al.*, 2007). Neurketak 480 nm-tan eginez gero, kultura medioak kolore horixka duenez, argia absorbatu eta DO neurketetan interferentziak sortuko ditu (Gerhardt *et al.*, 1994). Koloreak diren medioetan, sentikortasun handiagoa izan dadin, neurketak 480 nm-tan burutzen dira.

Aurretik azaldu den bezala, kultibo lagin baten A balorea eta zelula kopuruarekin erlazionaturik dago. Erlazio hori A tarte batean lineala izango da, 0,1 eta 0,5 baloreen artean hain zuzen ere. Tarte honi eremu lineala deritzo (4. irudia). Eremu linealetik gora neurtutako A balioak, balio teorikoak baino txikiagoak izango dira eta beraz, neurketaren errorea handituko da. Hori dela eta, lan honetan aztertutako lagin bakoitzari behar adinako diluzioa aplikatu zaio neurtutako A-ren baloreak, beti, 0,2 eta 0,3 artean egon daitezten.

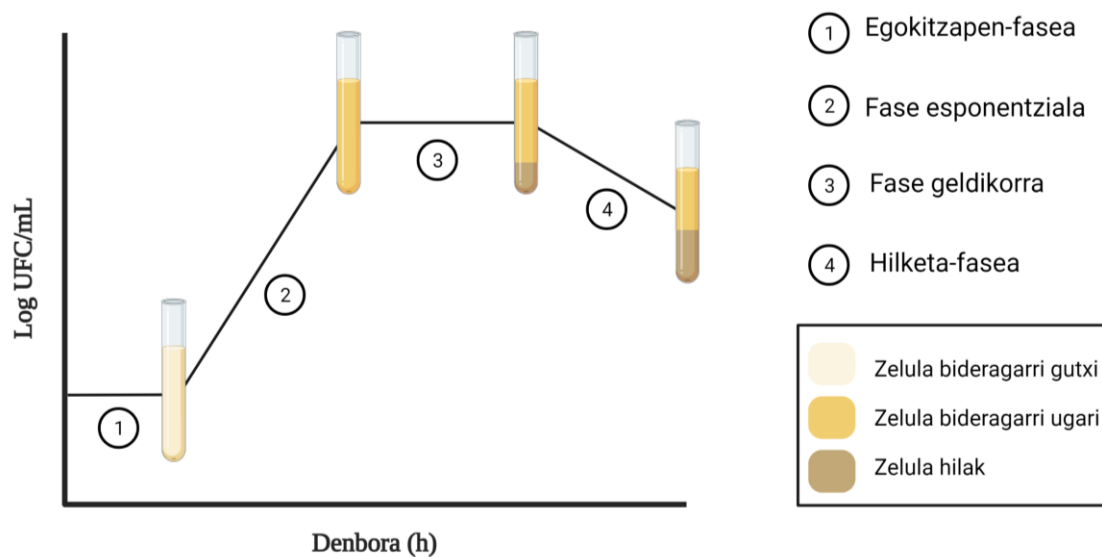


4. irudia. Absorbantzia irakurketa eta zelula kopuruaren arteko erlazioa. Berdez balio teorikoak eta gorri balio esperimentalak irudikatuta daude. Irudian ikus daitekeen bezala, $A_{600\text{ nm}}=0-0,5$ artean erlazioa lineala da, baina $A_{600\text{ nm}}>0,5$ balioetan balio esperimentalak teorikoa baino txikiagoak da. Horrenbestez, A neurketa horietan errorea dago. Errorea ekiditzeko A neurketak eremu linealean burutu behar dira (Gerhardt *et al.*, 1994).

1.4.3. Hazkuntza kurbaren faseak.

Kurba hau kultibo bateko denbora-unitate bakoitzeko zelula kopuruaren hazkundera erakusten duen grafikoa da eta horietatik informazio baliotsua lortzen da (5. irudia). Oro har,

esperimentalki hazitako bakterioek, beharrezkoak diren elikagai guztiekin hazten direnean, antzeko hazkuntza ereduak erakusten dute. Dagoeneko azaldu den bezala, bakterioaren populazioa esponentzialki hazten da, eta beraz, hazkuntza kurbak eskala logaritmikoan irudikatzen dira. Hala ere, bakterioen hazkuntza portaera ez da uniforme eta hazkuntza-kurba tipikoan lau fase antzematen dira; egokitzapen-fasea, fase esponentziala, fase geldikorra eta heriotza-fasea, hurrenez hurren (Madigan *et al.*, 2019 eta Masoodi *et al.*, 2021).



5. irudia. Bakterioen hazkuntza kurba ereduak. Irudi honetan, log UFC/mL-ren balioak denboraren aurrean irudikatzen dira. Kurbaren lau faseak eta fase bakoitzari dagokion kultibosaiodi hipotetikoa baten egoera irudikatzen da.

1.4.3.1. Egokitzapen-fasea.

Lehenengo fase honetan, bakterio zelulen jarduera zelularra dago, baina ez hazkuntza (Masoodi *et al.*, 2021). Bakterio kultibo bat kultura medio fresko batean inokulatzen denean, frogatuta dago zelulen hazkuntzarik ez dagoela, hemen bakterioek tamaina handitzen dute eta metabolikoki oso aktiboak dira, azido nukleikoak, proteinak eta entzimak eta abar sintetizatzen ari direlako. Fase honen iraupena hainbat faktore menpe dago, hala nola, bakterio espeziearen, kultura medioaren konposizioaren eta hazkuntza baldintzen menpe. Inokulua baldintza antzekoetan dagoen kultura medio batean eginez gero, egokitzapen-fasea oso laburra izango da eta, beraz, hazkuntza esponentziala berehala hasiko da. Hala ere, inokulua elikagai urritasuna duen kultura medio batetik egiten bada, zatiketa zelularrarentzako beharrezkoak diren

metabolitoak sintetizatu behar dira eta, ondorioz, egokitzapen fase luzea edukiko du (5. irudiaren 1. puntua).

1.4.3.2. Fase esponentziala.

Bakterio zelulak zatiketa zelularra egiteko prest daudenean, denbora-tarte jakin batean zehar zelula kopuruaren hazkuntza esponentziala ikusten da. Kurbaren tarte honetan zehar, bakterio zelula gehienak zatiketa zelularra abiadura konstantean jasaten ari dira. Fase honetan, horrela, belaunaldi denbora (g) kalkulatu daiteke. Fase esponentziala bakterio espeziearen, beharrezko elikagaien presentziaren eta hazteko baldintzen arabera da (5. irudiaren 2. puntua).

Hala ere, aipatu beharra dago, faseen arteko trantsizioa esperimentalki ez dela beti zuzenean ematen. Ondorioz, beste fase batzuk definitzen dira. Egokitzapen fasea eta gero, bakterioaren hazkuntza azelerazio fase bezala definitzen den fase batetik igaro daiteke. Halaber, fase esponentziala igaro eta gero, bakterioa fase geldikorrean sartu aurretik atzerapen fasea bezala definitzen den faseatik igaro daiteke (Monod, 1949).

1.4.3.3. Fase geldikorra.

Bakterioen hazkuntza esponentziala ez da mugagabea. Bakterioak hazten diren kultura medioaren mantengaiak berritzen ez direnez, momentu batean, hazkuntzarako beharrezkoak diren mantengaiak agortu eta eragin inhibitzaileak dituzten hondakin produktuak pilatzen dira (Masoodi *et al.*, 2021). Gertaera hauek bakterio zelula batzuen hazkuntzaren inhibizioa eragingo dute, bideragarritasuna oztopatuz eta hauen hilketa eraginez. Hala ere, beste bakterio zelula batzuk modu arruntean zatitzen jarraituko dute. Fase honetan, bakterio kultiboaren zelulak abiadura antzekoan hil eta hazten dira. Horregatik, bakterio populazioa konstante mantendu eta hazkuntza kurbak lerro zuzen baten forma hartzen du (5. irudiaren 3. puntua).

1.4.3.4. Heriotza-fasea.

Fase geldikorraren ondoren, bakterio zelulen heriotzak jarraitzen du eta kurbak behera egiten du. Heriotza fasean bakterioak modu esponentzialean hiltzen dira. Beraz, fase esponentzialaren alderantzizko fasetzat hartzen da hau (5. irudiaren 4. puntua).

1.4.4. Bakterioen hazkuntzan eragina duten faktoreak.

Bakterioak azkarren hazi daitezen, kultura medioak beharrezkoak diren osagaiak eduki behar ditu; hala nola, mantengaiak, hazkuntza bultzatzeko faktoreak, energia iturriak, gatzak, tanpoiak, mineralak, metalak, gelifikatzaileak (kultura medio solidoentzako) eta ura (Sandle, 2016). Kultura medioaz gain, ingurune faktoreek ere eragina izango dute. Nagusiki, lau parametrok kontrolatzen dute kultibo bakterianoen hazkuntza: temperatura, pH-a, ur eskuragarritasuna eta oxigenoa, hain zuzen ere (Madigan *et al.*, 2019). Lau parametro hauetatik bat bakterioak jasan dezakeen limitetik kanpo egonez gero, hazkuntza ez da emango nahiz eta kultura medio egokia eduki. Horrenbestez, hazkuntza kurba bat osatzean faktore hauek guztiak kontrolatu behar dira.

1.5. Hazkuntza kurben adierazpen matematikoak.

Hazkuntza kurba definitzen duten ekuazio matematikoak daude. Atal honetan, laburki, GrAL honetan erabili direnak azalduko dira. Fase esponentzialari dagokion kultiboaren biomasaren aldaketa denborarekiko ekuazio matematikoa honekin definitu daiteke (Arana *et al.*, 2010):

$$\frac{dN}{dt} = \mu N$$

2. ekuazioa. Fase esponentziala definitzen duen ekuazio matematikoa. Bakterio biomasaren denborarekiko deribatua (dN/dt), alegia, hazkuntza abiadura, konstante espezifikoa (μ) eta biomasa kantitatearen (N) zuzenki proportzionala da.

2. ekuazioaren deribatua (3. ekuazioa) eta hainbat eragiketa matematikoak egin ostean (4. ekuazioa) erabilgarriak diren beste ekuazioa batzuk lortzen dira.

$$N = N_0 e^{\mu(t-t_0)}$$

3. ekuazioa. Fase esponentziala definitzen duen ekuazioa matematikoaren deribatuaren ebazpenaren emaitza. Ekuazio honek kultibo baten biomasa kantitatea (N) hasierako biomasa kantitatearekin (N_0), konstante espezifikoarekin (μ) eta denbora aldaketa parametroarekin erlazionatzen du.

$$\log N - \log N_0 = \frac{\mu}{2,303} (t - t_0)$$

4. ekuazioa. Fase esponentziala definitzen duen beste ekuazio matematikoa.

Log ($N - N_0$) erlazioa ($t-t_0$) aurrean irudikatuz, zuzenaren maldatik hazkuntza abiadura konstante espezifikoa (μ) kalkulatu daiteke. Gainera, hazkuntza abiadura konstante espezifikoa

belaunaldi denborarekin erlazionatu daiteke (5. ekuazioa) bakterio baten hazkuntzaren karakterizazioa egiteko ezinbesteko parametroa dena.

$$g = \frac{0,693}{\mu}$$

5. ekuazioa. Hazkuntza abiadura konstantea (μ) belaunaldi denborarekin (g) erlazionatzen duen ekuazio matematikoa.

1.6. Onddoen erreinua.

Onddoek organismo eukariotoen talde zabala eta konplexua osatzen dute, lizunak, perretxikoak eta legamiak bezalako organismoak biltzen dituena. Gaur egun, 120,000 espezie inguru deskribatu dira baina estimatzen da 2-4 milioi espezie biltzen duen erreinua dela (Hawksworth & Lücking, 2017). Organismo hauek funtsezko lana betetzen dute ekosistemen funtzionamenduan, materia hila deskonposatzen dute eta zenbait elementuen (karbono, nitrogeno eta fosforo) ziklo biogeokimikoetan ezinbestekoak dira. Halaber, farmazia, kimika, janari, edari, deskontaminazio eta bioerregaietan aplikazio ugari dute (Boddy, 2016). Beste hainbat onddo espezie patogenoak dira, eta landare, animalia gizakientzako eta gaixotasunak sortu ditzazkete. Deskribatutako espezieetatik 300 inguru gizakien patogenoak direla kalkulatu da; hala nola, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* edo *Histoplasma capsulatum* (Tan & Hsu, 2018).

1.7. *Aspergillus nidulans* harizpi itxurako onddoa.

Lan honetan landutako *A. nidulans* onddoa, harizpi itxurako espezie bat da. Harizpi itxurako onddoek hifa izeneko egiturak sortzen dituzte, hauek onddo zelulak dituen egitura zilindriko luze eta estua dira. Hifak punta izeneko eremutik asimetrikoki hazten dira. Halaber, hifak ere adarkatu egiten dira hazkuntza puntu berriak sortuz. Hifek hazkuntzarako beharrezkoak diren konposatuak puntatik onddora garraiatzen dituzte (Riquelme *et al.*, 2018). Milaka hifek mizelioa izeneko egitura eratzen dute, onddoa elikatzen ari den substratoaren barruan edo gainean hazten dena (McConnaughey, 2014).

A. nidulans modelo organismo bezala hartzen da eta ziklo zelularra eta garapen prozesuak aztertzeko aspalditik erabiltzen da (Ojeda-López *et al.*, 2018). Egindako aurkikuntzen oinarri molekularrak interes ekonomiko eta kliniko duten onddo batzuetan eta beste organismo eukarioto batzuetan aplikatu dira zientziari ekarpen handia eskainiz (Rodríguez, 2012). *A.*

nidulans modelo organismo bezala hainbat arrazoiengatik hartzen da, laborategi mailan kultibatu eta manipulatzeko erraztasunarengatik, organismo ez patogenoa izateagatik edo manipulazio genetikoa erreza eta merkea delako (Etxebeste eta Espeso, 2020).

1.8. Onddo eta BAL arteko ko-kulturen garrantzia.

Harizpi itxurako onddoek, horien artean *A. nidulans*, masa molekular txikiko konposatu organikoak ekoizten dituzte, bigarren mailako metabolitoak bezala ezagutzen dira. Hauen sintesia onddoaren genomak dauden gene espezifiko batzuek kodeatzen dituzten proteinen aktibitateari esker ematen da. Bigarren mailako metabolito baten sintesi eta jariatzearen behar diren proteina guztiak, genomak bata bestearen ondoan dauden geneetan taldekatuta daude. Taldekatze edo geneen seguida hauei *cluster* metaboliko deritze (Brakhage, 2013). Metabolito primarioak ez bezala, metabolito sekundarioak ez daude hazkuntzarekin zuzenean erlazionaturik, baina naturan bizirauteko ezinbestekoak dira. Metabolito sekundario hauek industria farmazeutikoan konposatu bioaktiboen iturri gisa erabili daitezkeela ikusi da, hala nola, antibiotiko eta antibakterianoen iturri bezala (Netzker *et al.*, 2015).

Zoritxarrez, bakterioen aldetik antibiotikoekiko erresistentzia duten anduien sorrera handitu egin da azken urteetan. Honek antibiotiko berrien aurkikuntzaren garrantzia eta beharra utzi du agerian (Nathan & Cars, 2014). Arrazoi honengatik, azken urteotan, onddo espezie hauek ekoizten dituzten bigarren mailako metabolitoen ikerketak garrantzia handia hartu du.

Laborategiko kultiboen baldintzatan, metabolito hauen sorrera kantitate txikian ematen da, orokorrean, baldintza hauek, elikagai aldetik, aberatsak direlako eta bestelako mikroorganismoen kompetentziarik ez dagoelako. Horrela, onddoek ez dute kompetentziarik, eta beraz, ez dute metabolito sekundario horien beharrik. Fenomeno horren aurrean, hainbat metodo garatu dira hauen sintesia eragiteko. Metodo horien artean, adibidez, aztertzen ari den onddo hori beste mikroorganismoekin batera, bakterioak orokorrean, kultibatzea da (Netzker *et al.*, 2015). Estres biotiko horren pean, eta bakterioaren aurrean defentsa moduan, onddoak hainbat metabolito sekundarioen sintesia aktibatzen du. Lan honetan, aurretik deskribatutako BAL eta *A. nidulans* mikroorganismoen arteko ko-kulturak aztertu dira.

1.9. Grado amaierako lan honen ikerketaren abiapuntua.

GrAL hau Ziortza Agirrezabala ikaslearen gradu amaierako lanean lortutako emaitzetan dago oinarrituta. Lan horretan, beste ikerketa lerroen artean, hainbat BAL anduik *A. nidulans*

onddoaren (MAD1425 anduia) eragiten dituzten interakzio antifungikoak aztertu ziren. Onddoaren hazkuntza prozesuetan inhibiziorik ematen zen ala ez aztertzeko hainbat prozedura saiatu ziren, eta horietatik bat GrAL hau burutzeko oinarriztat hartu da. Metodologia horretan, aztergai ziren BAL anduiak baldintza eta denbora berdinean zehar hazi ziren MRS izeneko kultura mediodun Petri plakatan, beti ere, glukosa ala sakarosa erabiliz karbono iturri gehigarri bezala. Behin bakterioa hazi zela, kontzentrazio ezberdineko onddoaren suspentsioa gaintetik gehitu eta bi mikroorganismoak denbora eta baldintza jakinetan kultibatzen ziren. Lan horretan, aztertutako BAL anduien artean, E11, AST1 eta AC1 izan ziren aktibitate antifungikoa erakutsi zutenak. E11 izan zen inhibizio eremu handiena eragin zuena, eta AC1-k txikiena (Uranga *et al.*, 2020). AC1 anduiari dagokionez, aipatutako metodologia horretan, aktibitatea antifungikoa erakusten zuen baina beste anduiekin konparatuz efektu inhibitzailea txikiagoa eta gutxiago irauten zuen, denborarekin *A. nidulans* gai izan baitzen hasierako inhibizio zona horretan hazteko. E11-k eta AST1-k hobe eusten zioten efektu inhibitzaileari. Emaitza hauei guztiei erreparatuz, lan honetan, E11, AST1 eta AC1 anduiak aztertzea erabaki da. Lehenik, hiru BAL andui honen hazkuntza kurba lortu izan nahi dira eta ondoren lortutako datuekin, BAL eta onddo arteko ko-kulturak errepikatu dira hiru bakterioak biomasa kontrolatuz.

2. HELBURUAK

Bi ikerketa bide jarraitu dira. Batetik, BAL anduien hazkuntza kurbak lortu dira (E11 eta AST1 anduien kasuan) *A. nidulans* eta BAL-en arteko ko-kulturetan pareko biomasa kantitatea inokulatzeko helburuarekin. Bestetik, BAL-*A. nidulans* ko-kulturak errepikatu dira Ziortza Agirrezabalaren GrAL-ean ikusitako interakzio antifungikoak ezeztatu ala baieztatzeko. Zehazki honako hauek izan dira GrAL honen helburu esperimentalak:

- ✓ E11 eta AST1 BAL anduien hazkuntza kurben osaketa glukosasdun MRS kultura medioan, kultibo denbora ezberdinetako $A_{600\text{ nm}}$ eta UFC/mL baloreetan oinarrituz.
- ✓ Lortutako hazkuntza kurbetan oinarrituz, ko-kultura plaketan pareko biomasa bakterianoa inokulatzeko anduien hazkuntza denborak finkatu.
- ✓ *A. nidulans* eta BAL arteko ko-kulturak aztertu eta onddoaren ernamuintze eta hazkuntzan eragin handiena duen BAL anduia identifikatu.

3. MATERIAL ETA METODOAK

3.1. Erabilitako mikroorganismoak.

Jarraian, GrAL honetan erabili diren mikroorganismo mota (bakterioa eta onddoa), anduiaren izena, espeziea edo genotipoa, eta iturria adierazten dira (1go taula).

	Anduia	Espeziea edo genotipoa	Iturria
Bakterio azido laktikoak (BAL)	E11	<i>Lactobacillus mali</i> C _{UPV} 271. Sagar zukutik isolatua.	GlycoBAL taldeko (biologia laborategia) BAL andui bilduma
	AST1	<i>Lactobacillus sp.</i> Sagar zukutik isolatua.	GlycoBAL taldeko (biologia laborategia) BAL andui bilduma
	AC1	<i>Leuconostoc carnosum</i> C _{UPV} 411. Urdailazpiko egositik isolatua.	GlycoBAL taldeko (biologia laborategia) BAL andui bilduma
<i>Aspergillus nidulans</i>	MAD1425	$\Delta nkuA::argB; argB2; pyrG89; pyroA4; veA1$	(Nayak <i>et al.</i> , 2006)

1go taula. Lan honetan erabilitako onddo eta bakterio anduiak biltzen dituen taula.

3.2. Kultura medioak eta hauen prestaketa.

Mikroorganismo mota bakoitzarentzat kultura medio ezberdin bat erabili da. Bakterioei dagokienez, MRS kultura medioan hazi dira, eta berau prestatzeko osagaien zerrenda 2. taulan agertzen da. MRS medioa karbono iturri espezifikorik gabe prestatzen da eta gero, glukosa azukrearekin osatu da esterilizatzerako orduan azukrearen karamelizazioa ekiditeko. Kultura medioa osatzeko beharrezkoak diren osagaiak gehitu ondoren (glukosa gabe), ur destilatua gehitu, pH-a 6,5-eko baliora doitu eta autoklabean esterilizatzen da 12 minutuz 121 °C-tan. Glukosa disoluzioari dagokienez, beharrezko kantitatea disolbatu eta autoklabean esterilizatzen da (12 minutuz 121 °C-tan). BAL bakterioen hazkuntza aztertzeko medio solidoa eta likidoa erabili dira (medio solidoa % 3 agar-arekin eta likidoa gabe). Aurrekultiboak eta kultiboak medio likidoan burutu dira eta UFC/mL datuak lortzeko medio solidoa erabili da.

Osagaiak	Medio litro bakoitzeko
Peptona	10 g
Haragi estraktua	10 g
Legami estraktua	5 g
Tween 80	1 g
Zitrato diamonikoa	2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
K ₂ HPO ₄	0,05 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	2 g
Sodio azetatoa	5 g
Ur destilatua	750 mL
Azukrea (glukosa)	20 g
Ur destilatua	250 mL

2. taula. MRS hazkuntza medioa likidoa prestatzeko osagai zerrenda litro bakoitzeko. Glukosa erabili da karbono iturritzat, Ziortza Agirrezabalaren GrAL-ean egindako probatan efektu antifungiko nabariagoak lortu zirelako.

A. *nidulans* onddoaren espora asexualen (konidio izenekoak) suspentsioak lortzeko, ordea, berau AMM (*Aspergillus* medio minimoa) kultura medioan hazi da. AMM medioaren prestaketa burutzeko disoluzio desberdinak behar dira, eta hauen konposaketa 3. 4. 5. eta 6. tauletan deskribatzen da. Lehenengo, gatz eta traza elementuen disoluzioa prestatzen da. Horretarako, beharrezkoak diren osagaiak gehitu (4. eta 5. taulak) eta ur destilatuarekin 1 L-ra arte enrasatzen da. Behin gatz eta traza elementuen disoluzioa prest dagoela, disoluziotik 20 mL hartu, 15 g agar bakteriologiko gehitu (kultura medio solidoa), pH-a 6,8-ra NaOH-rekin doitu, ur destilatuarekin 1 L-ra arte enrasatu eta autoklabean esterilizatzen da 12 minutuz 121 °C-tan. Behin esterilizatuta, aurretik prestatuta eta esterilizatuak dauden amonio tartratoa eta glukosa disoluzioak gehitzen dira (3. taula). Azkenik, kultura medioa andui mutanteak hazteko biotina, piridoxina, uridina eta urazilo osagaiak (6. taula) gehitzen dira, hauek kultura medioa erabiliko den momentuan pisatu eta gehitzen dira.

Osagaiak	Medio litro bakoitzeko
Gatz eta traza elementuen disoluzioa (4. taula) 20 mL + agarra 15 g. pH-a 6,8 balioa, 1 L urarekin enrasatu eta esterilizatua dagoen disoluzioa	890 mL
Amonio tartrato disoluzioa 0,5 M (x100)	10 mL
Glukosa disoluzioa %20 (x10)	100 mL

3. taula. AMM medioa prestatzeko osagaien zerrenda litro bakoitzeko.

Osagaiak	Medio litro bakoitzeko
KCl	26 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	26 g
KH ₂ PO ₄	76 g
Traza elementuen disoluziotik (5. taula)	50 mL
Ur destilatua	1 L arte
Esterilizatu autoklabean	

4. taula. Gatz eta traza elementuen disoluzioaren prestaketa.

Osagaiak	Medio litro bakoitzeko
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22 g
H ₃ BO ₃	11 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	5 g
FeSO ₄ ·2H ₂ O	5 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,6 g
CoSO ₄ ·5H ₂ O	1,6 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	1,1 g
Na ₂ EDTA	50 g
Ur destilatua	1 L arte
Esterilizatu autoklabean	

5. taula. Traza elementuen disoluzioaren prestaketa.

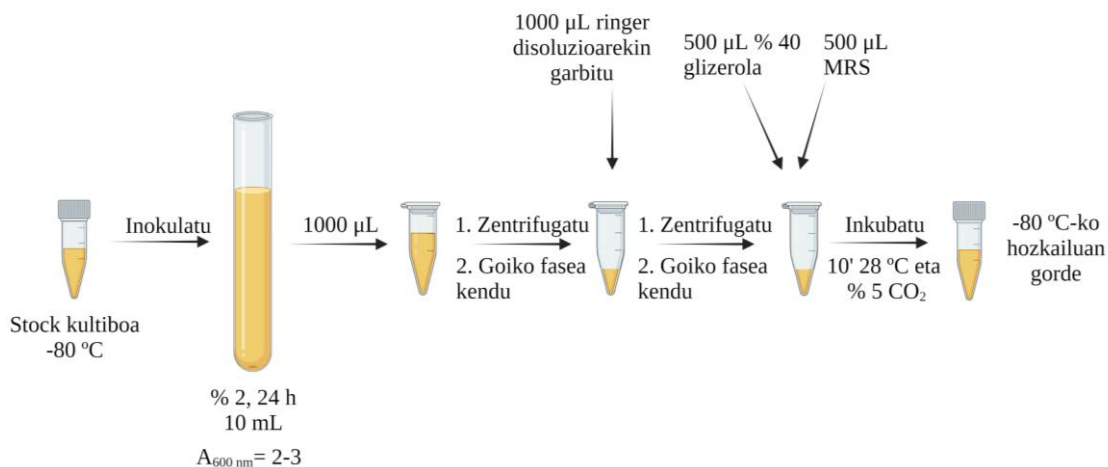
Osagaiak	Prestaketa 100 mL-ko	100 mL-ko
Biotina (x10 ⁴)	10 mg biotina (0,004 mM) filtrazioz esterilizatu	10 µL
Piridoxina (pyro) (x10 ³)	50 mg piridoxina (2,5 mM) filtrazioz esterilizatu	100 µL
Uridina	Momentuan pisatu eta gehitu da	0,122 g
Uraziloa	Momentuan pisatu eta gehitu da	0,056 g

6. taula. Andui mutanteak hazteko gehitutako osagaien zerrenda.

3.3. BAL *stock* kultiboen prestaketa.

BAL anduien hazkuntza aztertzeke eta *A. nidulans*-ekin ko-kulturak burutzeko, lehenik bakterio andui bakoitzarentzat hainbat *stock* lagin prestatu dira. Horretarako, jarraian azaldutako

protokoloa erabili da (6. irudia). $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -tan dagoen *stock* kultibo batetik MRS medio likidoan % 2-ko inokulua egin (MRS 9800 μL -tan, 200 μL *stock* laginatik inokulatu) eta inkubatzeko 24 orduz utzi da, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ -tan eta % 5 CO_2 fluxua bermatzen duen inkubagailuan. Ondoren, absorbantziak (600 nm-tan) Thermo Spectronic® Helios Alpha 9423 UVA 1002E espektrofotometro modeloan PS-ko (poliestirenoa) kubetak erabiliz neurtu dira. Neurtutako $A_{600\text{ nm}}$ baloreak espektrofotometroaren eremu linealean sartzeko, laginak diluitu dira $A_{600\text{ nm}}=0,2-0,3$ baloreetara. Hiru $A_{600\text{ nm}}$ balore neurtu dira lagineko, errepikakortasuna aztertzeko helburuarekin. Absorbantziak andui eta kultiboaren arabera aldakorrak dira, baina, orokorrean, aplikatutako diluzioa kontuan hartuz $A_{600\text{ nm}}=2-3$ artekoa izan da. Gero, kultiboaren biomasa jasotzen da. Horretarako 1000 μL -ko lagina $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -tan, 5 minutuz eta 10000 rpm-tan zentrifugatu eta goiko fasea baztertzen da. Jarraian, dekantatutako biomasa 1000 μL ringer disoluzioarekin garbitu eta, berriz ere, baldintza berdinetan zentrifugatu da. Garbitutako biomasa 500 μL MRS eta 500 μL % 40 glizerola disoluzioetan birsuspenditu eta 10 minutuz inkubatu da ($28\text{ }^{\circ}\text{C}$ -tan eta % 5 CO_2). Azkenik, BAL laginak $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ko hozkailuan gordetzen dira.



6. irudia. BAL *stock* kultiboen prestatetarako protokoloaren diagrama. *Stock* kultibotik 200 μL hartu eta MRS 9,8 mL-tan inokulatu da (% 2-ko inokulua). Absorbantziaren (600 nm) balio egokiak lortu ondoren, 2-3 artekoa, kultibotik 1000 μL hartu, zentrifugatu (5 min, 10000 rpm eta giro tenperaturan) eta ringer disoluzioarekin bitan garbitzen da. Garbitutako biomasa glizeroletan % 40 den disoluzioaren 500 μL -tan eta MRS kultura medioaren 500 μL -tan jasotzen da. Prestatutako *stock* kultiboak $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ko hozkailuan gorde dira.

3.4. BAL anduien hazkuntza kurben azterketa.

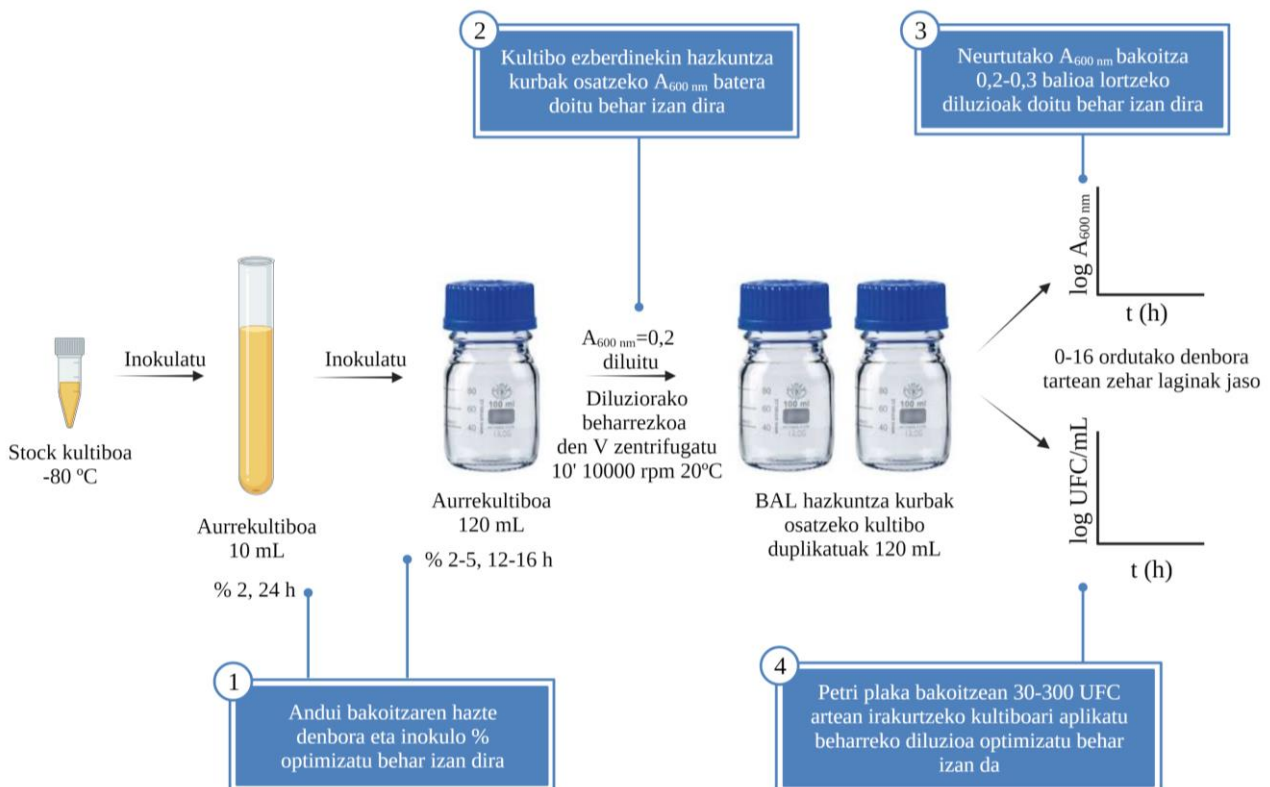
A. *nidulans* eta BAL anduien arteko ko-kulturak egin aurretik, BAL anduien hazkuntza kurbak osatu dira. Modu honetan, andui bakoitzaren hazkuntza patroia eta ko-kultiboetan inokulatuko den bakterio kontzentrazioa (UFC/mL unitateetan) determinatu ahal izango dira. Halaber, anduien egokitzapen-fasea, fase esponenziala, fase geldikorra eta heriotza-fasearen

iraupena ezagutuko da. Bakterioen hazkuntzen kurben osaketa turbidimetria eta bakterio zelula bideragarrien zenbaketa metodoen bitartez burutu da (ikus azalpen teorikoa 1.4.1 eta 1.4.2 ataletan). Zelula bideragarrien zenbaketari dagokionez, *spread-plate* metodoa aplikatu da UFC/mL baloreak lortzeko. UFC baloreei dagokienez, bolumen unitatean neurtu dira (UFC/mL) eta kultibo denbora ezberdinetan hartutako laginei diluzio hamartarrak aplikatuz eta MRS medio solidoaz (% 3 agarrearekin) betetako Petri plakatan inokulatuz eta kultibatuz determinatzen dira. Diluzioak saiodietan ringer soluzioarekin egin dira, plaketan 30-300 kolonia zenbatzeko egokituz. Bakterioen hazkuntza modu ez-automatizatuan aztertu denez eta denbora-tarte zabalagoa aztertzeko, hazkuntza kurbak denbora tarte desberdinak aztertzen dituzten esperimento desberdinetan osatu dira. Alegia, kultibo desberdinak erabili dira hazkuntza kurbak osatzeko. Zehazki, bi denbora tarteak hauek izan dira: 0-10 orduko tarte eta 11 ordutik aurrerako tarte. Modu honetan, $A_{600\text{ nm}}$ eta UFC/mL baloreak denboraren aurrean irudikatu ahal izan dira.

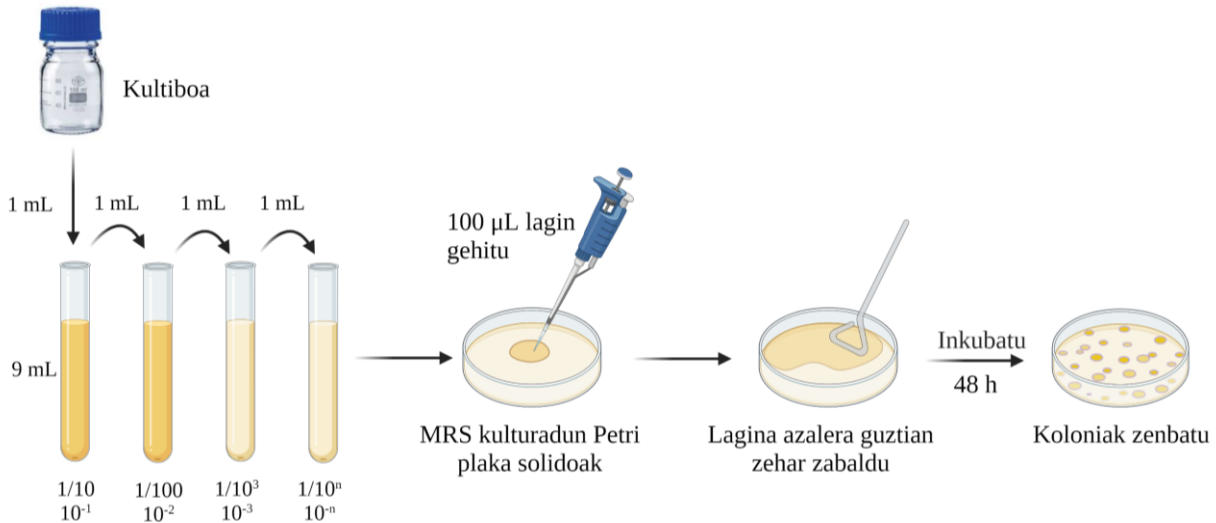
Azterketa honetan zehar hainbat parametro optimizatu behar izan dira. Hasteko, inokulo kantitatea eta hazten utzitako denborak, hazkuntza aztertzerako garaian bakterioak modu aktiboan egoteko egokitu dira, hau da, fase esponenzial hasi berrian egoteko (7. irudiko 1go komentarioa). Inokulo kantitatea eta hazten utzitako denborak, andui eta aztertutako denbora tartearen arabera ezberdinak izan dira. Hazkuntza kurba 11 h-tik aurrera osatzeko protokoloa aldatu behar izan da eta beraz inokulo eta hazkuntza denborak ezberdinak izan dira. Bigarrenik, hazkuntza kurben osaketa kultibo ezberdinekin egin denez, kultibo bakoitzarekin egindako esperimentuak bateragarriak izan daitezten, hazkuntzaren azterketa absorbantzia balio berdinetik hasi da. Azterketa guztiak $A_{600\text{ nm}}=0,2$ baloretik hasi dira (7. irudiko 2. komentarioa). Halaber, $A_{600\text{ nm}}$ balio guztiak 0,2-0,3 baloreetara diluitu dira MRS medioarekin (7. irudiko 3. komentarioa). Bestetik, aurretik aipatu den bezala (azalpen zehatza 1.4.1 atalean), UFC/mL datuak lortzeko plaketan 30-300 kolonia artean edukitzeko egin beharreko diluzioak zehaztu behar izan dira (7. irudiko 4. komentarioa).

Jarraian, erabilitako metodologiaren pausuak azalduko dira. Lehenik eta behin, hazkuntza kurbak aztertzeko beharrezkoa den materiala (MRS kultibo mediodun botilak eta saiodiak, ringer disoluzioaz betetako saiodiak eta MRS medio solidodun Petri plakak) prestatu eta autoklabean 12 minutuz 121 °C-tan esterilizatu da. Petri plakak prestatzeko, MRS kultura medioari (glukosa gabe) % 3 agarra gehitu, autoklabean esterilizatu (12', 121 °C), beharrezkoa den glukosa kantitatea erantsi eta Bunsen txiskeroaren ondoan Petri plakako 10 mL kultura medio isuri dira. MRS mediodun Petri plakak erabili aurretik, hauek 70 °C-tan lehortu eta UV-pean esterilizatu dira. Jarraian, -80 °C-tan dagoen *stock* laginatik (ikus *stock* kultiboak prestatzeko prozedura 3.3. atalean) 10 mL MRS glukosa medioan inokulatu da % 2-ko

kontzentrazioan. Aurrekultiboa 28 °C-tan eta % 5-eko CO₂ fluxua bermatzen duen inkubagailuan hazi da. Anduiaren eta egoeraren arabera hazkuntza denbora egokitu da baina, orokorrean, 24 orduz hazten utzi dira aurrekultiboak. Ondoren, aurrekultiboak 120 mL MRS medioan diluitu dira % 2 -5-eko kontzentrazioetara eta, berriz ere, 12-16 orduz inkubatu dira baldintza berdinetan. Berriz ere, BAL anduiaren eta egoeraren arabera inokulo kantitatea eta hazkuntza denbora egokitu dira. Aipatu beharra dago, hazkuntza kurbak osatzeko biomasa kantitate nahikoa edukitzeko 100 mL-ko botilak erabili direla eta hauek 120 mL-raino bete direla aire kantitatea minimoa izan dadin. Izan ere, gogoratu behar da BAL-ek baldintza anaerobikoak behar dituztela. Gero, BAL anduien hazkuntzaren azterketa hasteko orduan, aurrekultiboa 120 mL MRS medioan $A_{600\text{ nm}}=0,2$ balorera diluitu da bi botilatan kultibo duplikatuak edukitzeko. Horretarako, $A_{600\text{ nm}}$ balio hori lortzeko bolumena 20 °C-tan, 10 minutuz eta 10000 rpm-tan zentrifugatu eta dekantatutako biomasa MRS freskoari gehitu zaio berau ez diluitzeko. Denbora ezberdinetan, kultibo duplikatu bakoitzetik absorbantziak neurtu dira (beti ere, laginak MRS medioarekin diluituz $A_{600\text{ nm}}$ balioak 0,2 eta 0,3 artean izateko). Denbora eta erreplika bakoitzetik hiru $A_{600\text{ nm}}$ balore neurtu dira neurketaren errepikakortasuna aztertzeko. $A_{600\text{ nm}}$ neurtu ondoren, denbora ezberdineko kultiboen zelula bideragarri kopurua kalkulatu da *spread-plate* prozeduraren bitartez (8. irudia).



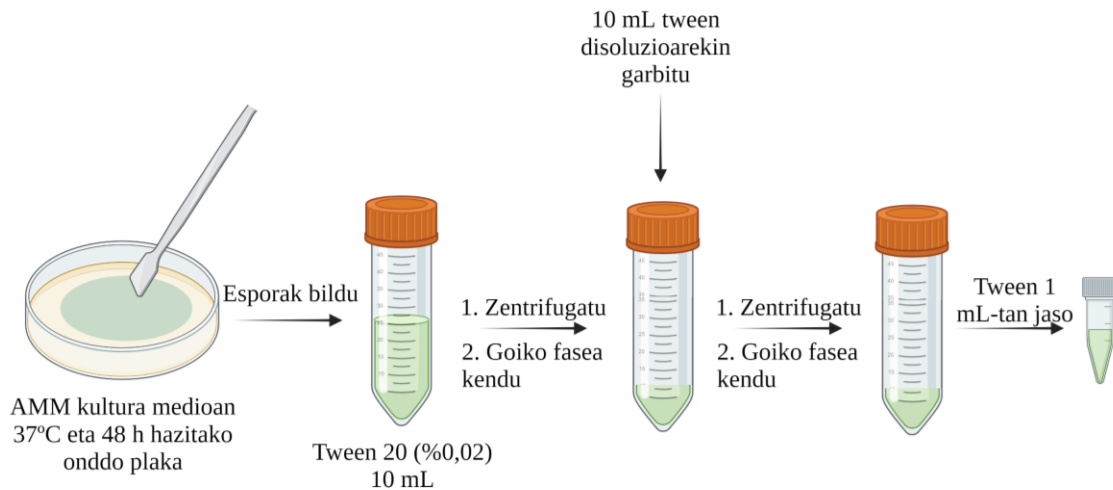
7. irudia. BAL andui bakoitzaren hazkuntza kurba osatzeko jarraitutako metodologiaren diagrama eta prozesuan zehar optimizatu diren parametroak.



8. irudia. Zelula bideragarrien zenbaketa egiteko jarraitutako protokoloa (*spread-plate* metodoa). Lehenik eta behin, kultiboari plaketan 30-300 UFC irakurtzeko beharrezkoak diren diluzio hamartarrak aplikatu zaizkio ringer disoluzioarekin. Horretarako 1:10 diluzioak saioldi batetik bestera egiten dira beharrezko diluzioa lortu arte (30-300 UFC emango lituzkeena). Azken diluzio horren 100 µL, agarra %3-an duen MRS kultura medioaren 10 mL dituen Petri plaka baten gainean isuri eta zabaldu egiten dira, plakak bolumen hori guztiz absorbatu arte. Azkenik, 48 orduz 28 °C-tan eta %5-eko CO₂ fluxua bermatzen duen inkubagailuan plakak hazten utzi eta gainazalean hazten diren koloniak begi bistaz zenbatzen dira.

3.5. A. *nidulans*-en espora asexualen suspentsioren prestaketa.

GrAL honetan burututako onddo eta BAL anduien arteko ko-kulturetan, bakterio kolonien gainera onddoaren espora asexualen (konidioen) suspentsioa isuri da. Aurretik adierazi den bezala, lan honetan, A. *nidulans*-en MAD1425 andua erabili da (Nayak *et al.*, 2006). Ko-kulturatan konidio kopuru jakin bat inokulatzeko, hauen *stock* disoluzioa prestatu eta kuantifikatu behar dira (9. irudia). Lehenik eta behin, onddoa AMM kultura medio solidoan hazi da 37 °C-tan 48 orduz. Kultura denbora horren ondoren, esterilizatutako espatula bat erabiliz, esporak Tween 20 detergente % 0,02 v/v den disoluzio baten 10 mL-tan jaso dira. Ondoren, esporak bitan garbitu dira Tween disoluzio berdinarekin, giro tenperaturan, 10 minutuz eta 4000 rpm-tan zentrifugatuz. Garbitutako esporak Tween disoluzioaren 1 mL-tan kontzentratu dira.



9. irudia. *A. nidulans*-en konidioen *stock* suspentsioaren prestatzeko prozedura. Onddo AMM kultura medioan 37 °C-tan eta 48 orduz kultibatu ondoren, espatula esterilizatu baten bitartez konidioak bildu eta tween 20-tan % 0,02 (v/v) den disoluzio batean isurtzen dira. Jarraian, onddo esporak tween 20 detergentearekin garbitzen dira bitan, 10 minutuz eta 4000 rpm-tan zentrifugatu. Azkenik, garbitutako esporak % 0,02 (v/v) den Tween 20-ren 1 mL-tan jaso, homogenizatu, eta kuantifikatzen dira Thoma kameraren bitartez.

Ko-kultura plaketan konidio kantitate zehatza duen alikuota gehitzen denez, konidio suspentsioaren kontzentrazioa zehaztea ezinbestekoa da. Suspentsioaren konidio kontzentrazioa ezagutzeko Thoma kamera izena duen hemozitometroa erabili da. Porta honek, 1 mm² azalera 25 karratu banaturik ditu eta, aldi berean, karratu hauekako bakoitzaren barnean 16 karratu txikiago daude. Espora kontzentrazioa ezagutzeko, lehenik, esporen *stock* disoluzioaren 1:200 diluzio bat egin eta honen tanta bat isurtzen da Thoma kamararen gainean. Ondoren, 25 karratuetan dauden espora kopurua zenbatzen da eta egindako diluzioa aintzat hartuz, *stock* disoluzioaren espora kontzentrazioa kalkulatu da. *Stock* disoluzio hau hozkailuan parafilmarekin estalita gordetzen dira.

3.6. A. *nidulans* eta BAL-en arteko ko-kulturak.

A. nidulans eta BAL anduien artean sor litezkeen interakzioak (antifungikoak, antibakterianoak...) aztertzeko, bien arteko ko-kulturak burutu dira. BAL anduiak biomasa orden berdinean inokulatuko dira onddoaren hazkuntzan eragin handiena duen BAL anduia identifikatu ahal izateko. Dena den, bakterioak hazkuntza baldintzekiko oso sentikorrak direnez, ezinezkoa da biomasa kontzentrazio berdina lortzeko baldintzak zehaztea. Horrenbestez, biomasa orden berdinean inokulatuko dira. Lortutako hazkuntza kurbetan oinarrituz, E11 eta AST1 anduietat hazkuntza denbora espezifikoak aukeratu da. AC1 anduiarekin, ordea, ez da hazkuntza kurbari lortu, kultibo homogeneousak eta neurgarriak emateko izan diren zailtasunak

direla eta. Ondorioz, BAL andui honekin denboraren estrapolazio bat egin da. Ko-kulturak egiteko jarraitutako metodologian, lehenengo plaka solidoetan BAL anduiak inokulatu, inkubagailuan (28 °C eta % 5 CO₂) 16 orduz hazi eta ondoren, gainetik, onddo suspentsioa gehitzen da. Onddoaren esporak inokulatu baino lehen, hiru BAL anduiak 16 orduko hazkuntza eta gero sortutako biomasa orden berean daudela ziurtatu da (3.6.1. atala), nagusiki bi arrazoiengatik: 1) Ko-kulturetan BAL anduien hazkuntza abiadurak ezberdinak direlako eta, 2) AC1 anduiarentzat hazkuntza denboraren estrapolazio bat egin delako.

3.6.1. BAL anduien biomasaren kontrola MRS medio solidoan.

Lehenengo, hazkuntza kurbatan denborarekiko lortutako UFC/mL balioak oinarrituz hartuz (7. taula), E11 eta AST1 anduietako biomasa orden berdina ematen duten hazkuntza-denborak aukeratu dira. AC1 anduiarekin ordea, UFC/mL daturik ez dagoenez, E11 anduiaren antzeko hazkuntza abiadura duela kontsideratu da, eta honentzat aukeratutako denbora erabiliko da AC1-entzat ere. Edonola, BAL anduien hazkuntza-denbora aukerakeratzeko hurrengo irizpideak jarraitu dira:

- ✓ BAL anduiak bere hazkuntzaren fase esponenzialaren barruan egotea
- ✓ UFC/mL 10¹¹ ordeneko biomasa lortzea
- ✓ Aurreko baldintzak betetzeko hazkuntza denbora hori ahalik eta laburrena izatea

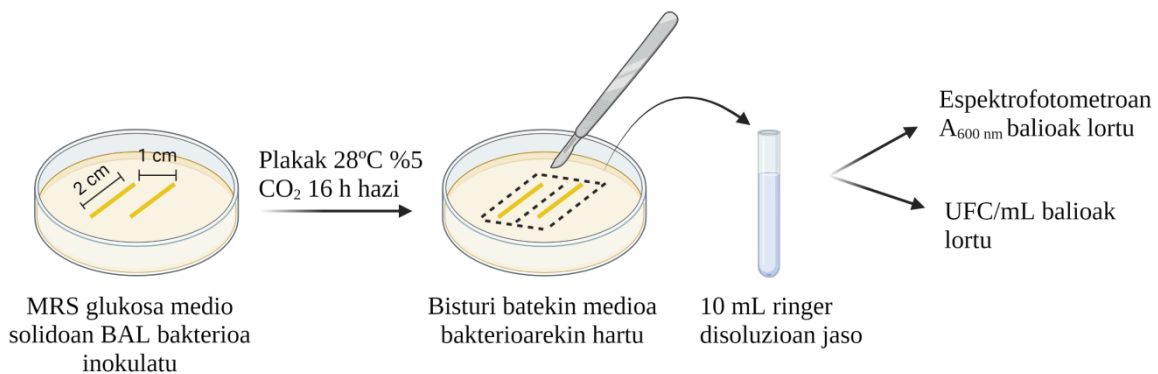
UFC/mL datuak denbora ezberdinetan:						
t (h)	0	2	4	6	8	10
E11 UFC/mL	(21 ± 7) · 10 ⁹	(32 ± 7) · 10 ⁹	(88 ± 8) · 10 ¹⁰	(16 ± 2) · 10 ¹⁰	(23 ± 1) · 10 ¹⁰	(4 ± 2) · 10 ¹¹
AST1 UFC/mL	(24 ± 2) · 10 ⁹	(30 ± 2) · 10 ⁹	(3 ± 2) · 10 ¹⁰	(48 ± 7) · 10 ⁹	(13 ± 1) · 10 ¹⁰	(25 ± 1) · 10 ¹⁰

7. taula. BAL anduien hazte denborak erabakitzeke aintzat hartu diren UFC/mL datuak biltzen dituen taula.

Aurreko irizpideak eta datuak aintzat hartuz, E11 eta AC1 anduiak 4 orduz eta AST1 anduia 8 orduz hazten uztea erabaki da. Denbora aukeraketa eginda, hiru BAL anduiek MRS glukosa kultibo medio solidoan sortzen duten biomasaren kontrola egin da (10. irudia). Esperimentu honetan, hiru BAL anduiak ko-kulturak egingo diren plaketan inokulatu eta 16 ordutara UFC/mL datuak neurtu dira. Jarraian, esperimentua burutzeko jarraitutako pausuak:

Lehenik eta behin, esperimenturako ezinbestekoa den materiala (MRS saiodiak, 5,5 cm-ko eta 9 cm-ko diametroa duten MRS Petri plakak eta ringer saiodiak) prestatu eta autoklabean

esterilizatu da (12' 121 °C-tan). Esperimentu honetan, hazkuntza kurbak egiteko protokolo berdina jarraitu da (ikus 3.4. atala). Lehenengo aurrekultiboa martxan jarri da BAL anduien *stock* disoluziotik 200 µL inokulatuz MRS glukosa medio likidoaren 9,8 mL-tan eta 24 orduz hazi da. Bigarren aurrekultiboa inokulatu (% 2) eta 16 orduz hazi da. $A_{600\text{ nm}} = 0,2$ balorera diluitu ondoren (esperimentu honetan ez dira duplikaturik egin), E11 eta AC1 anduiak inkubagailuan (28 °C eta % 5 CO₂) 4 orduz hazten utziko da eta AST1 8 orduz. Ondoren, BAL andui bakoitza 5,5 cm-ko Petri plaketan inokulatu da. Horretarako, kultiboaren 100 µL zentrifugatu eta 20 µL-tan bersuspenditu da, biomasa bolumen txikiago batean kontzentratzeko helburuarekin. Andui bereko 10 µL-ko bi inokulo egin dira Petri plaka bakoitzean, elkarrengandik 1 cm-ra dauden 2 cm-ko luzerako lerroak marraztuz (ikus 10. irudian). Plakak 28 °C-tan eta % 5-eko CO₂ fluxua bermatzen duen inkubagailuan 16 orduz hazi ondoren, bisturi baten laguntzaz BAL-ak dauden MRS medioa jaso eta ringer disoluzioaren 10 mL-tan homogenizatzen dira (*vortex* irabiagailu bitartez) BAL laginak. Gero, aurretik erabili den protokoloak jarraituz $A_{600\text{ nm}}$ eta UFC/mL datuak lortu dira.

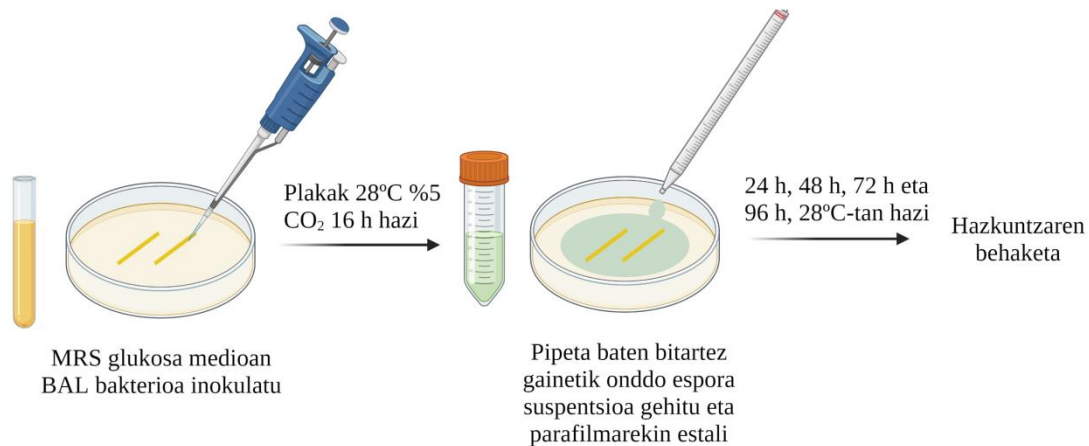


10. irudia. BAL anduien biomasaren kontrolerako prozeduraren irudia. BAL anduiak elkarrekiko 1 cm-ko distantziara dauden 2 cm-ko luzerako lerroak marraztuz inokulatu dira MRS glukosa medio solidoan. Plakak 16 orduz hazi eta gero bisturi batekin bakterio koloniak dituen medioa hartu eta ringer disoluzioaren 10 mL-tan bakterioak jaso eta homogenizatu dira *vortex* irabiagailuaren laguntzaz. Azkenik, $A_{600\text{ nm}}$ eta UFC/mL balioak lortu dira, aurretik deskribatutako prozedurak jarraituz.

3.6.2. Ko-kulturak egiteko prozedura.

Behin BAL anduien hazkuntza denbora definitu dela, bi mikroorganismoen arteko ko-kulturak prestatu dira (11. irudia). BAL anduiak aurreko atalean (3.6.1.) deskribatutako protokolo berdina jarraituz inokulatu dira. Onddoari dagokionez, aurretik prestatua eta kuantifikatuta dagoen espora asexualen *stock* suspentsioa erabili da. Ko-kultura plaketan $6 \cdot 10^5$ konidio/mL inokulatzeko, konididoen *stock* disoluziotik beharrezko bolumena MRS medioarekin diluitu da. Horretarako, lehenik, MRS kultura medioa urtu eta 15mL-ko

polipropilenoazko hodietan 4 mL-ko laginak prestatu eta 50 °C-tan gorde dira (likido egoeran mantentzeko). Inokulatuko ziren Petri plakak adina lagin prestatu dira. Lagin hauen temperatura kontrolatuta eduki behar da, temperatura hori gaituz gero, esporak kaltetu litezkeelako. Horrenbestez, hodi bakoitzari esporen *stock* disoluziotik beharrezko bolumena gehitu, kontuz homogenizatu (burbuilak sor ez daitezten) eta plaken gainean zabaldu da edukia. Azkenik, ko-kultura plakak parafilmarekin estali dira O₂-aren sarrera ekiditzeko eta 28 °C-tan inkubatu dira. 24 h, 48 h, 72 h eta 96 h-tara argazkiak atera dira.



11. irudia. BAL anduiek *A. nidulans*-en MAD1425 anduiaren ernamuntzea inhibitzen duen ala ez aztertzeko prozedura. BAL anduiek elkarrekiko 1 cm-ko distantziara dauden 2 cm-ko luzerako lerroak marraztuz MRS glukosa medio solidodun Petri plaketan inokulatzen dira. Plakak 28 °C-tan %5 CO₂ inkubagailuan hazten dira 4 orduz E11 eta AC1 anduiek eta 8 orduz AST1 anduia. Bakterioak hazi eta gero onddo esporen suspentsioa pipeta baten bitartez plaka osoaren gaituz zabaltzen da.

4. EMAITZAK

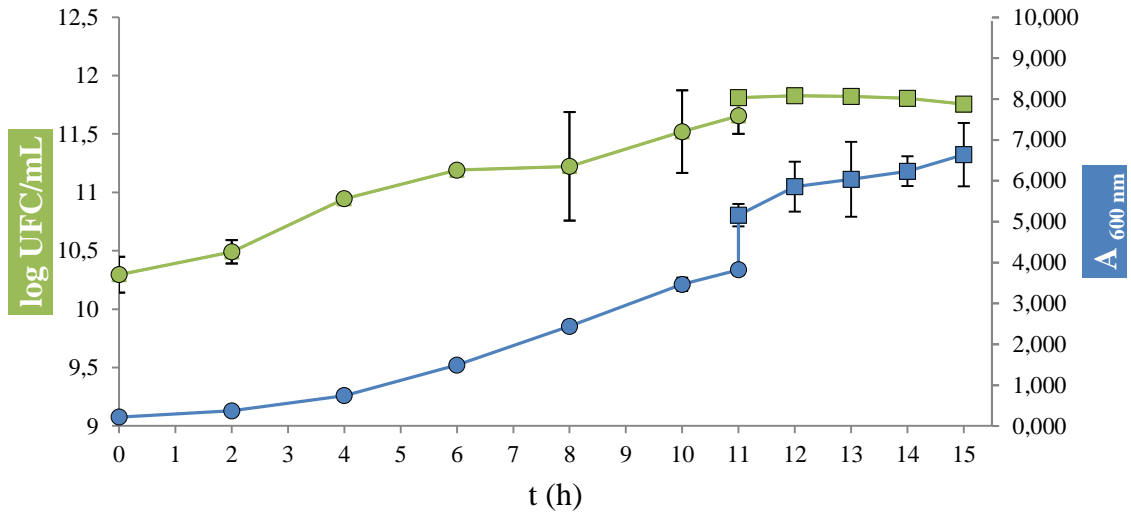
Atal honetan, lortutako BAL anduien hazkuntza kurbak eta aztertutako BAL anduien eta *A. nidulans* arteko interakzioak aurkeztuko dira.

4.1. BAL hazkuntza kurbak.

E11 eta AST1 BAL anduien hazkuntza kurbak lortu dira, 3.4. ataleko metodologia jarraituz eta prozesuan zehar zenbait parametro optimizatuz. AC1 anduiaren kasuan, ez da bere hazkuntza kurba lortu. Material eta Metodoak sekzioan aipatu bezala, kultiboak manipulatzeko zailtasunak direla eta. Hazkuntza kurbak MRS glukosa kultura medioan hazitako kultiboekin lortu dira. Lortutako emaitzak atal hauetan banatu dira; E11 anduiaren hazkuntza kurba, AST1 anduiaren hazkuntza kurba eta bi anduien arteko hazkuntzen konparaketa. Hazkuntza kurbak lortzeko, kultiboak 15-16 ordutan zehar hazi eta aztertu dira eta, ondorioz, kurba bakoitzaren osaketa bi kultibo ezberdinekin burutu da. . Bi kultibo hauek elkarren artean desberdintzeko, grafikoan puntu bakoitza forma desberdinarekin (borobila edo karratua) irudikatuko da. Gainera, BAL andui bakoitzarekin bi grafiko lortu dira, $A_{600\text{ nm}}$ eta UFC/mL balioak denboraren aurrean irudikatuz. UFC/mL datuak ardatz logaritmikoan irudikatu dira. Edonola, emaitzak modu argiagoan aurkezteko, bi parametroak ($A_{600\text{ nm}}$ eta UFC/mL balioak; bakoitza kolore ezberdinarekin) batera irudikatu dira.

4.1.1. E11 anduiaren hazkuntza kurba.

Lehenik, E11 anduiaren hazkuntza kurba lortu da (12. irudia). Hazkuntza faseei dagokienez, hasteko ez da egokitzapen faserik ikusten, eta E11 anduia hasieratik hazten da. Hasierako tarte horretan, 0 eta 4 orduen artean, azelerazio fasea ikusten da: alegia, bakterioa hazten ari da baina ez esponentzialki. Laugarren ordutik aurrera, E11 modu esponentzian hazten da, hots, fase esponentzialaren hasiera momentu honetan emango litzateke, gutxi gorabehera. Fase esponentzialaren iraupena, nagusiki $A_{600\text{ nm}}$ balioetan bereziki oinarrituz 0 eta 10 orduen artekoa izango litzateke. Hala ere, UFC/mL datuei erreparaturaz, 8. orduari dagokion puntuan, biomasa kantitate txikiagoa dago, baina desbideratze estandarra oso handia denez, ez da kontuan hartu eta oraindik fase esponentzian dagoela ondorioztatu da. Hamaikagarren ordutik aurrera, UFC/mL kurba moteldu eta lerro zuzen batera iristen da, fase geldikorra, hain zuzen ere. Azkenik, log UFC/mL datuek erakusten dute E11-k hilketa-fasea duela, bakterio zelula bideragarrien kopurua txikitzen delako. Puntu horretan, $A_{600\text{ nm}}$ datuak, ordea, handiagoak dira, biomasa guztia neurtzen baita.



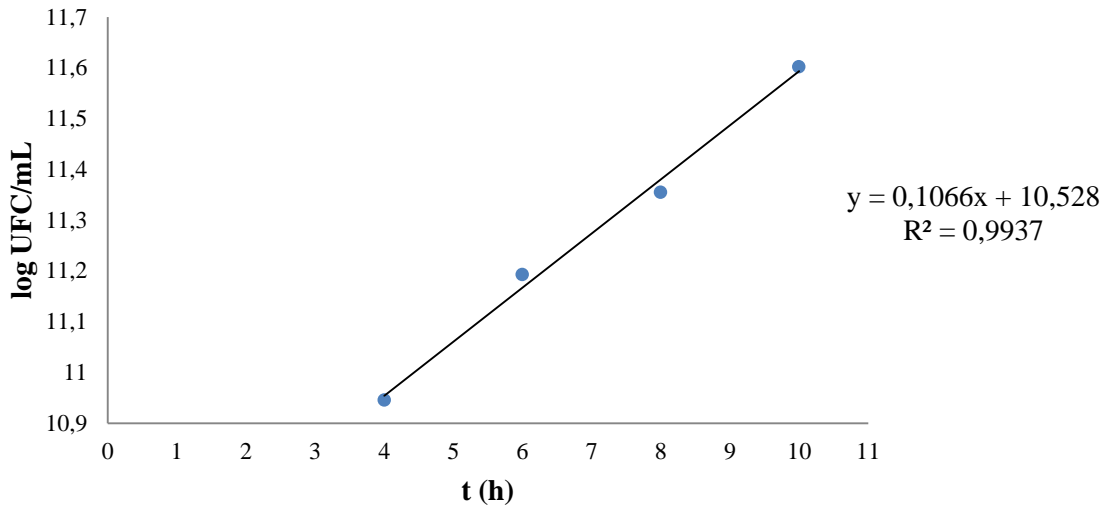
12. irudia. E11 anduiaren hazkuntza kurbak erakusten dituen grafikoa. Ezkerreko ardatz bertikalean, UFC/mL datu logaritmikoak (berdez) irudikatuta daude eta eskuineko ardatz bertikalean ordea, $A_{600 \text{ nm}}$ datuak (urdinez) ikus daitezke. Datuak denboraren aurrean irudikatu dira. Halaber, kurba bakoitza lortzeko erabili diren bi kultiboaren datuak forma desberdinekin irudikatu dira: 0-11 orduen arteko datuak forma zirkularrekin irudikatuta daude eta 11-15 ordu artekoak, ordea, karratu formaz. Neurketak bi orduro egin dira 11. ordura arte, eta ordu horretatik aurrera, orduro. Puntu bakoitzean bi kultibo bi erreplikaren batez besteko datuak irudikatu dira, euren desbideratze estandarrekin. Era berean, duplikatu bakoitza hiru $A_{600 \text{ nm}}$ balio eta bi UFC/mL datutatik lortu da. Azelerazio-fasea 0 eta 4. orduen artean egongo litzateke, fase esponontziala 4 eta 10. orduen artean, fase geldikorra 11-14. ordu artean eta azkenik hilketa-fasea 16. orduan hasiko litzatekeela ikusten da.

Aurretik adierazi den bezala, 0-16 ordu tarte hori aztertzeko, grafikoa bi kultibo ezberdinekin eraiki da. Erabilitako bi kultiboak, protokoloak adierazten duen bezala, biomasa kantitate berdineran egokitzen saiatu da, bien hazkuntzen azterketa bateragarriak izateko. Hala ere, 11. orduan, $A_{600 \text{ nm}}$ eta UFC/mL datuak hartu dira, bi kultiboak hazkuntzaren momentu berdinean dauden ala ez aztertzeko helburuarekin (8. taula). Datuei erreparatuz gero, 12-15 orduen arteko azterketa egiteko kultiboak (karratu formarekin irudikatutakoa grafikoa) besteak (0-11 ordu) baino $A_{600 \text{ nm}}$ eta UFC/mL balore handiagoak ematen ditu. Beraz, bigarren denbora tarte honetan, bakterio zelula kantitate handiagoa dagoela ondorioztatzen da. Horrela, erabilitako bi kultiboak ez dira guztiz bateragarriak, hazkuntza kurbaren errorea handituz.

	$A_{600 \text{ nm}}$	UFC/mL
0-10 h arteko azterketa (zirkuluak grafikoa)	$3,8 \pm 0,1$	$(5 \pm 2) \cdot 10^{11}$
12-15 h arteko azterketa (karratuak grafikoa)	$5,1 \pm 0,3$	$(7 \pm 2) \cdot 10^{11}$

8. taula. E11 anduiaren 11. orduko $A_{600 \text{ nm}}$ eta UFC/mL datuak.

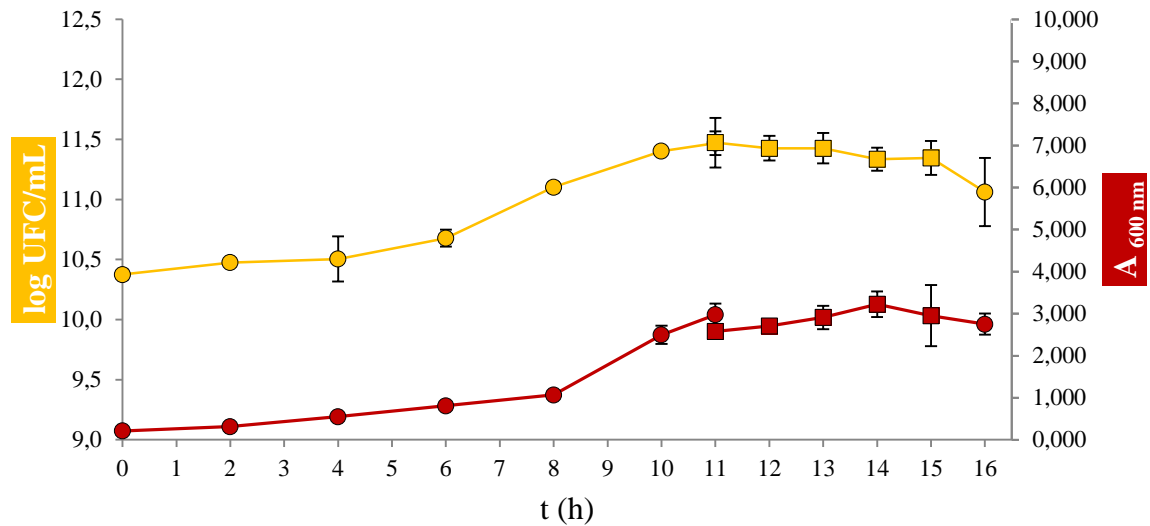
Belaunaldi denbora (g) ere kalkulatu da, horretarako 1.5. atalean azaldutako adierazpen matematikoak hartu dira aintzat. Fase esponentziala definitzen duen ekuazio matematikoan (1.5. ataleko 4. ekuazioa) oinarrituz, fase esponentzialeko erregresio zuzenaren (13. irudia) maldatik μ kalkulatu da, $0,2455 \text{ h}^{-1}$ balioa lortuz. Ondoren, 1.5. ataleko 5. ekuazioa erabiliz g atera da, 2,824 h balioa lortuz.



13. irudia. E11 anduiarentzat fase esponentzialaren UFC/mL datuak denboraren aurrean irudikatzen dituen grafikoa. Eskuinaldean datuen erregresio linealaren ekuazio matematikoa eta korrelazio-indizea (R^2) ikus daitezke. $R^2 > 0,9$ izanda datu eta erregresio-zuzenaren arteko doiketa ona dela esan daiteke. Halaber, maldarekin andui honen hazkuntza definitzen duten hainbat parametro kalkulatu daiteke, hazkuntza abiadura konstante espezifikoak (μ) eta erdibitze-denbora (g), hain zuzen ere.

4.1.2. AST1 anduiaren hazkuntza kurba.

Behin hazkuntza kurbaren protokoloa zehaztu eta E11 anduiarentzat hazkuntza kurba lortu eta gero, AST1 anduiarentzat hazkuntza kurba lortu da (14. irudia). Jarraian, grafikoa ikusitako hazkuntza faseak aipatuko eta hauen iraupenak adieraziko dira. Hasteko, ez da egokitzapen faserik ikusten. Hasieran, 0 eta 6. orduen artean, azelerazioa fasea legoke. Ondoren, UFC/mL datuetan oinarrituz, 6. ordutik aurrera fase esponentzialaren hasiera legoke eta 10. ordura arte iraungo luke. Hala ere, $A_{600 \text{ nm}}$ datuei erreparaturaz, 10-14 denbora tartean, balioek igotzen jarraitzen dutela ikusten da. Honen arrazoia materia hila metatzen ari dela izan daiteke. Gero, fase geldikorra ikusten da, kurba 10-15 ordu artean apaltzen dela ikusten baita. Azkenik, UFC/mL datuen beherakada ematen da, hilketa-fasea hasi dela ondorioztatu daitekeelarik.



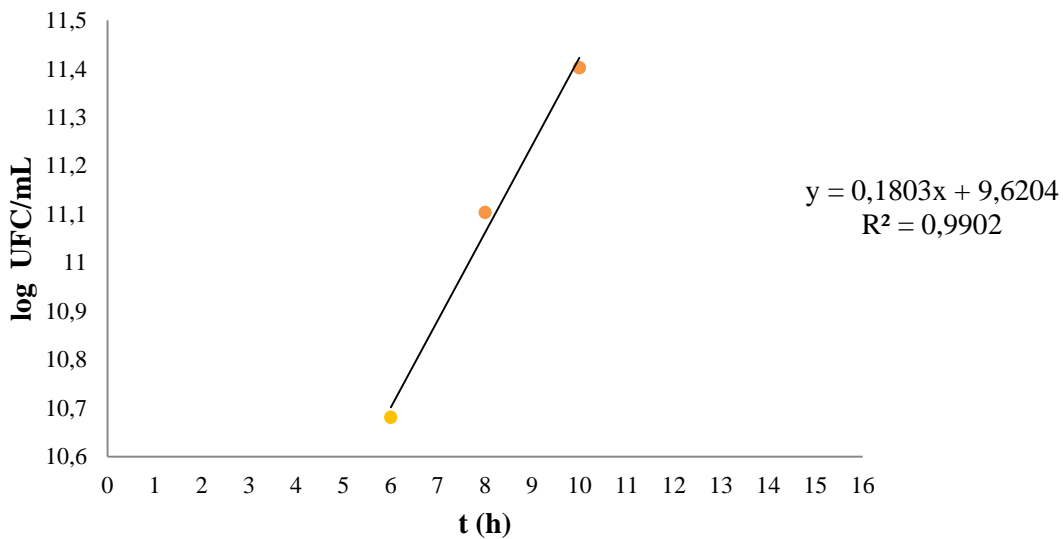
14. irudia. AST1 anduiaren hazkuntza kurbak erakusten dituen grafikoa. Ezkerreko ardatz bertikalean, UFC/mL datu logaritmikoak (laranjaz) irudikatuta daude eta eskuineko ardatz bertikalean ordea, A_{600 nm} datuak (gorrix) ikus daitezke. Datuak denboraren aurrean irudikatu dira. Halaber, kurba bakoitza lortzeko erabili diren bi kultiboen datuak forma desberdinekin irudikatu dira: 0-11 orduen arteko datuak forma zirkularrekin irudikatuta daude eta 11-16 ordu artekoak, ordea, karratu formaz. Neurketak bi orduro egin dira 11. ordura arte, eta ordu horretatik aurrera, orduro. Puntu bakoitzean bi kultibo bi erreplikaren batez besteko datuak irudikatu dira, euren desbideratze estandarrekin. Era berean, duplikatu bakoitza hiru A_{600 nm} balio eta bi UFC/mL datutatik lortu da. Azelerazio fasea 0-6 orduen artean dago, fase esponontziala 6-10 artean, fase geldikorra 11-15 artean eta hilketa-fasea 15. ordutik aurrera hasten da.

AST1 anduiaren kasuan, erabilitako bi kultiboak 11. orduko datuak (9. taula) nahiko antzekoak dira, beraz bien arteko bateragarritasuna ona da eta biak hazkuntzaren fase berdinean daudela ondorioztatu daiteke.

	A _{600 nm}	UFC/mL
0-10 h arteko azteketa (zirkuluak grafikoa)	3,0 ± 0,3	(30 ± 7) · 10 ¹⁰
12-15 h arteko azterketa (karratuak grafikoa)	2,6 ± 0,1	(3 ± 4) · 10 ¹¹

9. taula. AST1 anduiaren 11. orduko A_{600 nm} eta UFC/mL datuak biltzen dituen taula.

Hazkuntza abiadura konstante espezifikoa (μ) eta belaunaldi denbora (g) beste anduiarekin bezala kalkulatu dira. Fase esponontzialeko erregresio zuzenaren (15. irudia) maldatik μ kalkulatu da, 0,4152 h⁻¹ balioa lortuz. Ondoren, 1.5. ataleko 5. ekuazioa erabiliz g kalkulatu da, 1,669 h balioa lortuz.

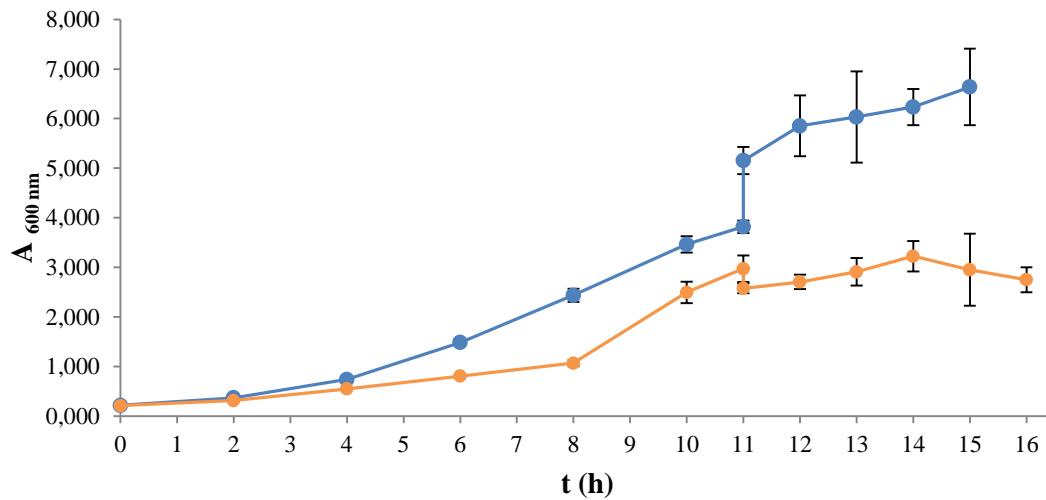


15. irudia. AST1 anduiarentzat fase esponenzialaren UFC/mL datuak denboraren aurreko irudikapena. Eskuinaldean datuen erregresio linealaren ekuazio matematikoa eta korrelazio-indizea (R^2) ikus daitezke. $R^2 > 0,9$ izanda datu eta erregresio-zuzenaren arteko doiketa ona dela esan daiteke. Halaber, maldarekin andui honen hazkuntza definitzen duen hainbat parametro kalkulatu daitezke, hazkuntza abiadura konstante espezifikoa (μ) eta belaunaldi denbora (g), hain zuzen ere.

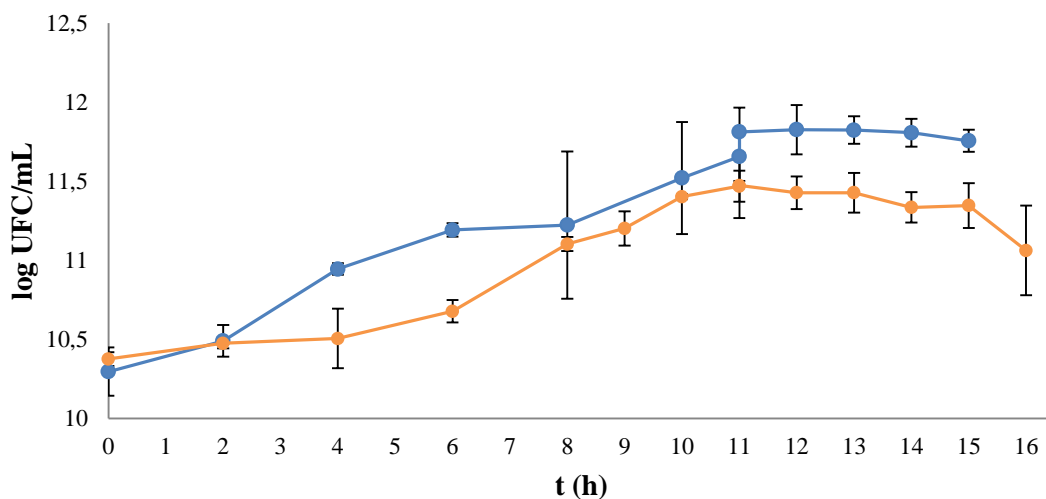
4.1.3. Bi BAL anduien arteko hazkuntzen arteko konparaketa.

Bi BAL anduien hazkuntza ereduak ezberdinak dira. Izan ere, bi BAL anduien hazkuntza kurbak elkarrekin irudikatuz gero, hazkuntza patroien ezberdintasunak modu argian ikusten dira (16. eta 17. irudiak). Fase esponenzialari dagokionez, bi ezberdintasun azpimarra daitezke. Batetik, BAL anduiaren ingurunerako egokitzapena eta fase esponenziala definitzen dituzten parametroen arteko ezberdintasunak. AST1-k E11-k baino denbora gehiago behar du fase esponenziala hasteko. Ondorioz, ingurunera egokitzeko denbora handiagoa behar duela esan liteke. E11-k, ordea, ingurunera lehenago egokitu eta bere fase esponenziala AST1 anduiak baino lehenago hasten du. Bestetik, fase esponenzialaren maldari erreparatuz gero (ikusi 10. taulako μ zutabeko datuak), AST1 E11 baino malda handiagoarekin hazten da. Era berean, erdibitze-denborak konparatuz gero (ikusi 10. taulako g zutabeko datuak), AST1-k E11-k baino erdibitze denbora txikiagoa dauka. Datu hauekin AST1-k E11-k baino hazkuntza azkarrago duela ondorioztatu daiteke. Bi patroi hauek, egokitzapen fasearena eta fase esponenzialarena, eragiten dute gero ko-kulturetarako medio likidoko kultiboetan, E11 lau orduz eta AST1 10 orduz hazi behar izatea, egokitzapen-azelerazio fasea AST1-en handiagoa delako.

Halaber, BAL anduien biomasari erreparatuz, E11 anduiaren $A_{600\text{ nm}}$ eta UFC/mL datuak AST1 anduiarenak baino askoz ere handiagoak dira. Ondorioz, hazkuntzan zehar E11-tik AST1-etik baino biomasia gehiago lortzen da. Honek agerian uzten du E11 erdibitze prozesu luzeagoa duela eta arrazoi honengatik biomasia kantitate gehiago lortzen da.



16. irudia. Bi BAL anduien $A_{600\text{ nm}}$ datuak denboraren aurreko irudikapena. Urdinez E11 anduiaren datuak daude irudikatuta eta laranja AST1 anduiarenak.



17. irudia. Bi BAL anduien UFC/mL datuak denboraren aurreko irudikapena. Urdinez E11 anduiaren datuak irudikatuta daude eta laranja AST1 anduiarenak.

	μ (h ⁻¹)	g (h)	Biomasa kantitate maximoa (UFC/mL)
E11	0,2455	2,824	$(7 \pm 2) \cdot 10^{11}$
AST1	0,4152	1,669	$(30 \pm 7) \cdot 10^{10}$

10. taula. BAL anduien hazkuntza kurbetatik kalkulatuako μ eta g parametroak erakusten dituen taula.

4.2. Ko-kulturak.

Emaitzak bi ataletan banatu dira; 4.2.1. sekzioan BAL anduien biomasaren kontrolean lortutako balioak erakusten dira, eta 4.2.2. sekzioan A. *nidulans* eta BAL anduien arteko ko-kulturetan lortutako emaitzak.

4.2.1. BAL anduien biomasa kontrola.

Ko-kulturak egin aurretik, hiru BAL anduiak, E11, AST1 eta AC1, MRS glukosa mediodun Petri plaketan inokulatu eta 16 orduko hazkuntzaren ondoren, biomasa orden berdinean dauden ala ez aztertu da (11. Taula). E11 eta AST1 anduien kasuan, 10^8 UFC/mL ordeneko biomasa lortu da; AC1 anduiaren kasuan, ordea, hamar aldiz gehiago.

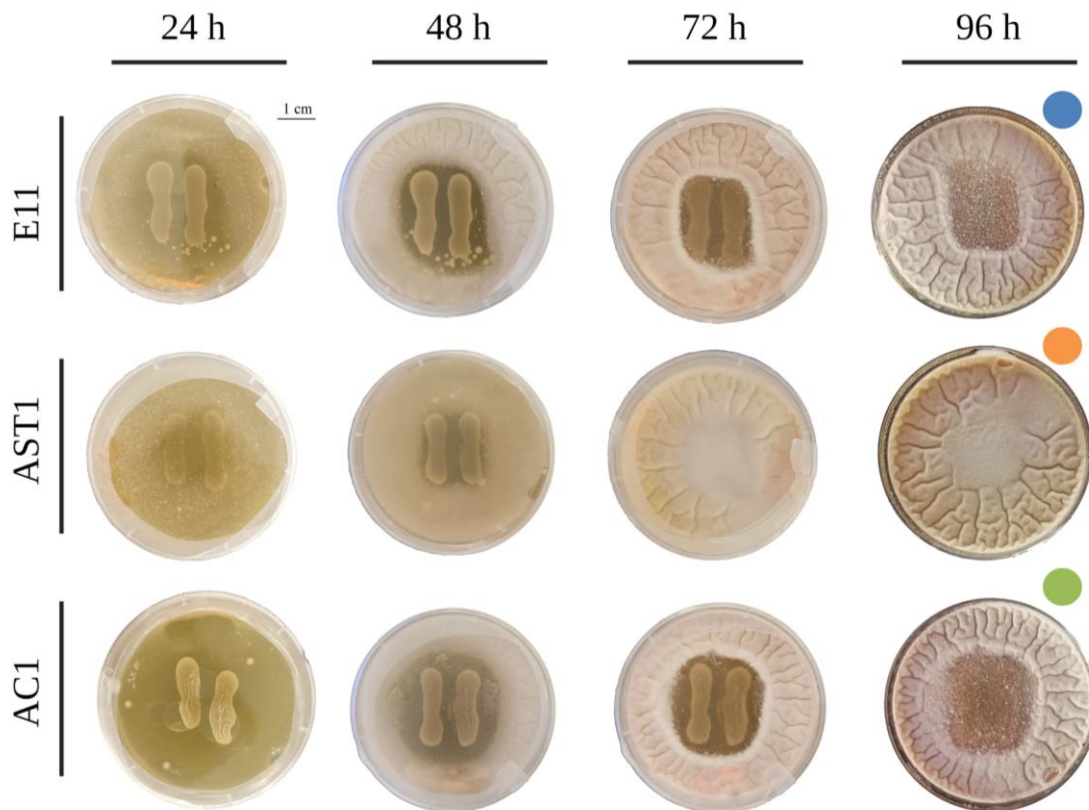
	UFC/mL (16 h)
E11	$(29 \pm 8) \cdot 10^7$
AST1	$(32 \pm 7) \cdot 10^7$
AC1	$(28 \pm 3) \cdot 10^8$

11. taula. Hiru BAL anduien UFC/mL datuak glukosadun MRS medio solidoan inokulatu eta 16 orduko hazkuntza eta gero. Hirurak biomasa orden berdinean dauden ala ez aztertu nahi zen.

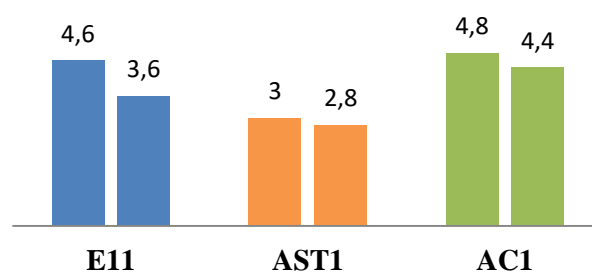
4.2.2. A. *nidulans* eta BAL anduien arteko ko-kulturak.

BAL anduiak hazten ari diren lekuan A. *nidulans* onddoaren MAD1425 anduiaren konidioak ernamuntzeko gai diren ala ez aztertzeko egindako esperimentuan lortutako emaitzak

18. irudian erakusten dira. Orokorrean, BAL anduiek glukosadun MRS kultura medioan onddoaren ernamuntzea eragozten dutela ikusi da, bakterio kolonien inguruan onddoaren hazkuntzaren inhibizio eremu bat sortzen baitute. Inhibizio eremuei dagokionez, AC1 anduiarena izan da handiena, ondoren E11-ri dagokiona eta azkenik AST1 anduiarena (19. irudia).



18. irudia. BAL anduien eta *A. nidulans* onddoaren arteko ko-kulturen argazkiak erakusten dituen irudia. E11, AST1 eta AC1 anduiei zegokien argazkiak onddoaren konidioen inokulaziotik 24, 48, 72 eta 96 ordura hartu ziren. Hiru BAL anduiek aktibitate antifungiko/fungistatikoak erakusten dute, AC1-k inhibizio eremu handiena erakutsiz, E11-k tartekoa eta AST1-k txikiena. BAL andui bakoitzarentzat hiru plaka inokulatu ziren, errepikakortasuna aztertzeko.



19. irudia. BAL anduiek onddoaren konidioen inokulaziotik 48 ordura eragindako inhibizio eremuaren diametroak adierazten dituen irudia (bi balio ematen dira anduiko). Kolore bakoitzak andui ezberdinari erreferentzia egiten du, hauek 18. irudian zehazten direlarik. Irudian agertzen diren datuak cm-tan daude emanak.

5. EZTABAIDA

Egindako ikerketa lanean, BAL anduiek onddoaren ernamuntze patroietan eragina dutela ikusi da. Ondorioz, E11, AST1 eta AC1 BAL anduiak eta *A. nidulans* onddoaren artean interakzio antifungikoak egon litezkeela esan daiteke. Bi mikroorganismo mota hauen arteko interakzioen ondorioz etorkizunean balio handia eduki dezaketen bigarren mailako metabolitoak identifika litezke.

BAL anduien artean, emaitzetan AC1-k inhibizio ale handiena erakutsi du, ondoren E11-k eta azkenik AST1-k. Hala ere, AC1 eta E11-ren inhibizio eremuen diametroak oso antzekoak dira eta AC1 10 aldiz biomasa gehiagorekin inokulatu denez, E11-k inhibizio handiagoa eragin lezake. Hipotesi hau baieztatu edo ezeztatu ahal izango litzateke AC1 anduiarentzat hazkuntza kurba lortuko balitz eta ko-kulturak hiru anduien biomasa kantitateak orden berdinean inokulaturik errepikatuko balira. Lortutako emaitzak neurri batean bat datozte Ziortza Agirrezabalaren gradu amaierako lanean ateratako emaitzekin. Batetik, E11 inhibizio eremu handiena sortzen duen BAL anduia da. Baina, ordea, azterketa honetan, AST1 anduiak inhibizio txikiena erakutsi du eta ez, aipatutako lanean bezala, AC1 anduia.

Beste aldetik, egindako ko-kulturak MRS glukosa kultura medioan burutuak daude. Jakina da beste karbono iturri batekin, bi mikroorganismoen arteko interakzioak aldakorrik direla. Horrenbestez, bi mikroorganismo hauen ko-kulturak sakaroadun MRS medioan egitea interesgarria izango litzateke.

Ko-kultura hauetan, onddo eta bakterioen aldetik bigarren mailako metabolitoak ekoizteko beharrezkoak diren proteinak kodetzen dituzten geneak aktibatzen direla pentsa liteke. Honetatik abiatuz, zein gene kodeatzen dituzte eta zehazki konposatu horiek zeintzuk diren aztertzeke lerroak zabaltzen dira. Horretarako, BAL anduien genomaren (DNA) zein transkriptomaren (RNA) sekuentziazioa egin beharko lirateke. BAL anduien genomaren azterketa Annette Marreroren GrAL-ean burutu da dagoneko. DNA sekuentziak eskura edukitzeak, BAL horiekin analisi transkriptomikoak egitea (RNA-seq, zehazki) ahalbidetuko du, onddoaren presentziaren ondorioz adierazpenean igotzen diren geneak eta jeisten direnak identifikatuz. Hala ere, kontutan hartu behar da, eragin antifungiko/fungistatiko duen edo duten konposatu horiek, beharbada BAL anduiek momentu oro ekoizten dituztela, eta ez bakarrik onddoa presente dagoenean. Beraz, gerta liteke RNA-seq-ean oinarritutako azterketa batek (onddoaren presentzia edo ausentzia gertatzen diren espresio aldaketak aztertuz) aktibitate antifungiko/fungistatiko horretarako garrantzitsuak izan daitezkeen geneak identifikatzen ez laguntzea. Kasu honetan, bestelako gerturaketa esperimentalak bilatu beharko lirateke.

6. ONDORIOAK

GrAL ikerketa honetan ateratako ondorioak erakutsiko dira. Hauek bi puntuetan banatu dira; BAL hazkuntza kurbak eta BAL eta *A. nidulans* mikroorganismo arteko ko-kulturak.

6.1. BAL hazkuntza kurbak.

- E11 eta AST1 BAL anduien hazkuntza kurbak bi teknika esperimentalen bitartez lortu dira. Esan daiteke beraz, haien hazkuntza ezagutu eta karakterizatu egin dela.
- E11 BAL anduia AST1 anduiarekin konparatuz hazkuntza azkarrago erakutsi du. Alegia, AST1 anduiak azelerazioa-fase luzeagoa du.
- Erabilitako bi teknikak aproposak dira hazkuntza kurbak lortzeko, hala ere, haien artean hainbat ezberdintasun esanguratsu ikusi dira.
 - Turbidimetria metodoa oso azkarra da eta datuen artean desbideratze estandar txikiak erakutsi ditu. Hala ere, biomasa totalaren informazioa eskaintzen du, hau da, hilik dauden zelulen eta zelula bideragarrien informazioa.
 - Zelula bideragarrien metodoa mantsagoa da, 48 h gutxienez itxaron behar delako koloniak ikusteko, eta errore esperimentalen ondorioz datuen artean desbideratze estandar handia ikusi da. Hala eta guztiz ere, zelula bideragarrien biomasa ezagutu daiteke eta hori abantaila handia da turbidimetria metodoarekin konparatuz.

6.2. BAL eta *A. nidulans* ko-kulturak.

- E11, AST1 eta AC1 BAL andui espezifikoak *A. nidulans* onddoaren germinazioa neurri ezberdinetan eragiten dutela ikusi da. Andui hauek aktibitate antifungikoa dituztela ondorioztatzen da.
- Anduien artean AC1 eta E11 inhibizio ale handienak erakutsi dute. AC1 inhibizio alea E11 baino pixkat handiagoa izan da baina 10 aldiz biomasa handiagoa duenez, aktibitate antifungiko handiena E11 duela ondorioztatu da.

7. CONCLUSIONS

The conclusions obtained in this end-of-degree study will be shown. These will be given in two sections; 7.1. LAB growth curves, 7.2. Co-cultures of BAL and *A. nidulans*.

7.1. BAL growth curves.

- The growth curves of the E11 and AST1 LAB strains have been obtained by two experimental techniques. Therefore, in this project the growth of these strains have been characterized.
- E11 LAB strain have shown faster growth compared to the AST1 strain. Furthermore, AST1 strain has a longer acceleration phase.
- Both techniques are appropriate to obtain growth curves, although significant differences have been observed between them.
 - Turbidimetry is the faster method and the data obtained have shown little standard deviations. However, it provides information on total biomass; this includes non-viable and viable cells.
 - The viable cell method is slower, since a minimum period is needed by the bacterial colonies to grow, and a high standard deviation has been observed between the data due to experimental errors. However, it is possible to know the biomass of viable cells, which is a great advantage compared to the turbidimetry method.

7.2. Co-cultures of BAL and *A. nidulans*.

- The specific strains of LAB E11, AST1 and AC1 affect the germination of the fungus *A. nidulans*. It is concluded that these strains have antifungal activity.
- AC1 and E11 strains have shown the highest levels of inhibition. AC1 inhibition has been slightly higher than E11, but having 10 times more biomass, it has been concluded that the highest antifungal activity is E11.

8. BIBLIOGRAFIA

- Arana, I., Orruño, M., & Barcina, I. (2010). Cálculo De Los Parámetros Que Definen El Crecimiento Bacteriano. *Cómo Resolver Aspectos Prácticos de Microbiología*, 7. https://ocw.ehu.es/file.php/48/Tema_4._calculo_de_los_parametros_que_definen_el_crecimiento_bacteriano.pdf
- Boddy, L. (2016). Fungi, Ecosystems, and Global Change. In *The Fungi: Third Edition* (Third Edition). 361-362. doi:10.1016/B978-0-12-382034-1.00011-6
- Brakhage, A. (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, 11(1), 21–32. doi:10.1038/nrmicro2916
- Breed, R., & Dotterer, W. (1916). the Number of Colonies Allowable on Satisfactory Agar Plates. *Journal of Bacteriology*, 1(3), 321–331. doi:10.1128/jb.1.3.321-331.1916
- Daba, G., Elnahas, M., & Elkhateeb, W. (2021). Contributions of exopolysaccharides from lactic acid bacteria as biotechnological tools in food, pharmaceutical, and medical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 173, 79–89. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.01.110
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C., & Schorr, S. (2012). Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 951–962. doi:10.1016/j.carbpol.2011.08.083
- Etxebeste, O., & Espeso, E. A. (2020). *Aspergillus nidulans* in the post-genomic era: a top-model filamentous fungus for the study of signaling and homeostasis mechanisms. *International Microbiology*, 23(1), 5-22. doi:10.1007/s10123-019-00064-6
- Gerhardt, P., Murray, R., Wood, W., & Krieg, N. (1994). Methods for General and Molecular Bacteriology. *American Society of Microbiology*. 135-292. ISBN-10: 1555810489
- Gopal, P. K. (2020). Lactic Acid Bacteria: An Overview. In *Reference Module in Food Science*. doi:10.1016/b978-0-12-818766-1.00018-0
- Harris, D. (2010). *Quantitative Chemical Analysis*. England. W. H. Freeman and Company. 445-446. ISBN-13: 978-1-4292-1815-3
- Hawksworth, D. L., & Lücking, R. (2017). Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiol Spectr*, 5(4). doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016

- Heredia, P., Hernández, A., González, A., & Vallejo, B. (2017). Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: Mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia*, 42(6), 340–346.
- Jay, J. (2004). Total Bacterial Count. *Microbiological Analysis*, 768–773.
- Korcz, E., & Varga, L. (2021). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Techno-functional application in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 110, 375–384. doi:10.1016/j.tifs.2021.02.014
- Madigan, M., Bender, K., Buckley, D., Sattley, M., & Stahl, D. (2019). *Brock Biology of Microorganisms*. Person. ISBN-13: 978-1-292-23510-3
- Mahone, C., & Goley, E. (2020). Bacterial cell division at a glance. *Journal of Cell Science*, 133(7), 1–7. doi:10.1242/jcs.237057
- Masoodi, K., Lone, S., & Rasool, R. (2021). Growth of bacterial cultures and preparation of growth curve. *Advanced Methods in Molecular Biology and Biotechnology*, 163–166. doi:10.1016/b978-0-12-824449-4.00030-x
- McConnaughey, M. (2014). Physical Chemical Properties of Fungi. *Reference Module in Biomedical Sciences*. doi:10.1016/b978-0-12-801238-3.05231-4
- Mende, S., Rohm, H., & Jaros, D. (2020). Lactic Acid Bacteria: Exopolysaccharides. *Reference Module in Food Science*. doi:10.1016/b978-0-08-100596-5.22982-x
- Monod, J. (1949). The Growth of Bacterial Cultures, *Annual Reviews in Microbiology*, 3(11), 371–394.
- Nathan, C., & Cars, O. (2014). Antibiotic Resistance: Problems, Progress, and Prospects. *The New England Journal of Medicine*, 689–691.
- Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C. E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S. L., . . . Oakley, B. R. (2006). A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 172(3), 1557–1566. doi:10.1534/genetics.105.052563
- Netzker, T., Fischer, J., Weber, J., Mattern, D., König, C., Valiante, V., . . . Brakhage, A. (2015). Microbial communication leading to the activation of silent fungal secondary metabolite gene clusters. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAR), 1–13. doi:10.3389/fmicb.2015.00299

- Ojeda, M., Chen, W., Eagle, C. E., Gutiérrez, G., Jia, W. L., Swilaiman, S. S., ... Dyer, P. S. (2018). Evolution of asexual and sexual reproduction in the aspergilli. *Studies in Mycology*, 91, 37–59. doi:10.1016/j.simyco.2018.10.002
- Ramazzotti, M., & Bacci, G. (2018). 16S rRNA-Based Taxonomy Profiling in the Metagenomics Era. *Metagenomics: Perspectives, Methods, and Applications*, 103-119. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102268-9.00005-7>
- Riquelme, M., Aguirre, J., Bartnicki, S., Braus, G., Feldbrügge, M., Fleig, U., . . . Fischer, R. (2018). Fungal Morphogenesis, from the Polarized Growth of Hyphae to Complex Reproduction and Infection Structures. *Microbiol Mol Biol Rev*, 82(2). doi:10.1128/MMBR.00068-17
- Rodríguez, A. (2012). Señales Autoreguladoras y su Papel en la Conformación del Micelio Fúngico (tesis doctoral, Euskal Herriko Unibertsitatea).
- Ruas, P., & De Los Reyes, C. (2005). Invited review: Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 88(3), 843–856. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)72750-8
- Sandle, T. (2016). Microbiological culture media. *Pharmaceutical Microbiology*, 47–61. doi:10.1016/b978-0-08-100022-9.00005-0
- Štumpf, S., Hostnik, G., Primožič, M., Leitgeb, M., Bren, U. (2020). Generation Times of *E. coli* Prolong with Increasing Tannin Concentration while the Lag Phase Extends Exponentially. *Plants*. 9(12). doi:10.3390/plants9121680
- Tan, G. S. E., & Hsu, L. Y. (2018). Overview of Fungal Infections. In *Reference Module in Biomedical Sciences*. doi:10.1016/b978-0-12-801238-3.98320-x
- Tortora, G., Funke B., & Case, C. (2007). Introducción a la microbiología (9. Edición). Buenos Aires. Médica Panamericana. ISBN: 978-950-06-0740-7
- Uranga, J., Llamas, M. G., Agirrezabala, Z., Dueñas, M. T., Etxebeste, O., Guerrero, P., & de la Caba, K. (2020). Compression molded soy protein films with exopolysaccharides produced by cider lactic acid bacteria. *Polymers*, 12(9). doi:10.3390/POLYM12092106
- Woese, C., & Fox, G. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(11), 5088–5090.

- Whitman, W., Coleman, D., & Wiebe, J. (1998). Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12), 6578–6583. doi:10.1073/pnas.95.12.6578