

ZIENTZIA ETA TEKNOLOGIA FAKULTATEA. LEIOA

GRADU AMAIERAKO LANA BIOTEKNOLOGIA

Itsas-bakterioak: isolamendua, karakterizazioa
eta interes bioteknologikoa duten entzimen
produkzio-gaitasuna

Ikaslea: *Tena Garitaonaindia, Mireia*

Data: *2016ko Ekaina*

Zuzendariak

Dr. Iñigo Azúa Pérez

Dra. Itxaso Artolozaga Bengoetxea

**Urte
akademikoa**
2015/16

AURKIBIDEA

1. SARRERA	1
2. HELBURUA	4
3. MATERIAL ETA METODOAK	4
3.1. LAGINKETA	4
3.2. ISOLAMENDUA, KONTSERBAZIOA ETA BERRESKURAPENA	5
3.3. ISOLATUTAKO BAKTERIOEN KARAKTERIZAZIO MAKROSKOPIKOA	7
3.4. ISOLATUTAKO BAKTERIOEN KARAKTERIZAZIO MIKROSKOPIKOA	7
3.5. ISOLATUTAKO BAKTERIOEN AKTIBITATE ENTZIMATIKO ESTRAZELULARREN DETEKZIOA	7
4. EMAITZAK	9
4.1. ITSASOKO BAKTERIOEN ISOLAMENDUA, KONTSERBAZIOA ETA BERRESKURAPENA	9
4.2. ISOLATUTAKO BAKTERIOEN KARAKTERIZAZIO MAKROSKOPIKOA	10
4.3. ISOLATUTAKO BAKTERIOEN KARAKTERIZAZIO MIKROSKOPIKOA	13
4.4. ISOLATUTAKO BAKTERIOEN AKTIBITATE ENTZIMATIKO ESTRAZELULARREN DETEKZIOA	14

5. EZTABAIDA.....	17
6. ONDORIOAK	22
7. BIBLIOGRAFIA	23
1. ERANSKINA.....	i
2. ERANSKINA.....	iv
3. ERANSKINA.....	vii

1. SARRERA

Itsasoko mikroorganismoek ozeanoko energiaren eta materia organikoaren zikloak kontrolatzen dituzte. Horregatik azken urteotan, itsasoetako biodibertsitatea eta konkretuki mikroorganismoek ozeanoen egituran eta funtzioan duten eragina aztertu izan da. Honekin batera, mikroorganismoen potentzial entzimatikoa eta hauetatik lortu daitezkeen entzimen bilaketan ere aritu dira, produktu bioteknologiko berrien garapenean, hain zuzen ere.

Aurreko mendean emandako biologia molekularreko tekniken garapenei esker ozeanoetako dibertsitatea eta produktu bioteknologiko berrien aurkikuntza posiblea izan da. Fluoreszentzia mikroskopioari esker itsasoko bakterioen ugartasunaren berri izan genuen (Hobbie *et al.*, 1977), izan ere, bakterioen %0,1-1 baino gutxiago hazi daitezke kultura-medio estandarretan (Staley eta Konopka, 1985). Pasa den mendean garatutako iragazketa metodo espezifikoak edota isolamendu eta hazkuntza metodo bereziak ez ziren nahikoak izan ozeanoko biodibertsitatearen konplexutasuna hobeto ezagutzeko. Hala ere, filogenian oinarritutako tekniken garapenari esker itsasoko dibertsitatea gehiago analizatzea eta ulertzea posiblea izan da. PCRaren (Mullis, 1988) aplikazioen garapenak bakterioen 16S RNAr-aren azterketa baimendu zuen, naturako aniztasuna aditzera eman zuena, baita itsas mikrobiologian ere. Honi esker, itsasoko mikroorganismoen dentsitate erlatiboaren berri izan genuen; izan ere, SAR11 (*Pelagibacter ubique*) da honen adibiderik argiena, itsas-bakterio hau planetako mikroorganismorik ugariena dela ondorioztatu baitzen 16S RNAr-ren azterketaren bidez (Morris *et al.*, 2002). Mikroorganismo hauek eta beste asko nonahi agertu arren, laborategian kulturatzea oso zaila da. Baina zergatik da hain zaila itsas-bakterioak kulturatzea, batzuk hain ugariak izanda? Arrazoi desberdinak egon daitezke. (i) Laborategiko kulturetan naturan bakterioen artean gertatzen diren interakzioak galdu egin daitezke. (ii) Hazkuntza tasa azkarragoa duten mikroorganismoek besteen hazkuntza geldotu edo inhibititu dezakete. (iii) Bakterioentzat itsasoko elikagai iturria zein den ez dago guztiz argi eta beraz baldintzak imitatzea zaila egiten da. (iv) Birus infekzioak eragindako hazkuntzaren gelditzea beste arrazoi bat izan daiteke: hau fago baten infekzioagatik edo bakterioak

elikagaien kontzentrazio altuetan jartzeagatik ziklo litikora pasatu den fagoengatik gerta daiteke. (v) Laborategian erabilitako kultura-medioen elikagaien kontzentrazio altuak inhibitzaileak izan daitezke itsas-bakterioentzako, batez ere ingurune oligotrofikoetan bizi ohi direnentzako. (vi) Zenbaitetan itxurazko hazkuntzarik ez duten kultura-medio likidoak baztertzen dira zelulen dentsitate txikiak neurtzeko metodorik ez dagoelako (Joint *et al.*, 2010).

Itsasoko dibertsitatea hainbat ikerketa talderen eskutik aztertu izan da. Hain zuzen ere, ikerketa honetan 2015eko *Ocean Sampling Day* (OSD) egunean (ekainaren 21ean) hartutako laginekin aritu gara. OSD Itsas Bioteknologian edo Bioteknologia Urdinean lan egiten duten ikerlarien talde lana da, non egun berean ikerketa talde desberdinek munduko itsas desberdinetako ur laginak hartzen dituzten bertako dibertsitatea deskribatzeko eta produktu bioteknologiko berriak definitzeko (Kopf *et al.*, 2015). Honela, ozeano desberdinetako kostaldeko mikroorganismoen ikerketa genetikoak egiten eta euren potentzial metabolikoaren ezagumena lortu daiteke. Gainera, itsasoan baldintza oso desberdinetako inguruneak (tenperatura, gatzen eta elikagaien kontzentrazio eta presio hidrostatis desberdinak) daudenez, habitat horietako mikroorganismoek aktibitate interesgarriak dituzten entzimak eduki ditzakete, momentura arte ezezagunak diren produktu edo entzimak topatzea ere posiblea izanez. Kultura-medio egokien edo horien informazio genetikora jotzeko tresna teknologikoen garapenak ozeanoen azterketa eta ustiapena posiblea egiten du, interes industrial, farmazeutiko edo biologikoa duten entzimak edo produktu berriak lortuz. Hala, itsas-bakterioetatik lortutako produktuen zerrenda etengabe luzatuz doa, nahiz eta itsasoko biodibertsitatearen azterketa eta esplotazioa oraindik garapen fasean egon. Orain arte lortu diren 20000 itsas produktuen artean, gehienak isolatu eta kulturatu daitezkeen mikroorganismoetatik lortu dira, gehienetan bakterioetatik (Schweder *et al.*, 2005).

Itsasoko mikroorganismoak entzimen iturri interesgarriak dira, hauek ingurune oligotrofikoetan, gatz kontzentrazio altuetan, tenperatura tarte desberdinetan... bizi daitezkeelako. Gaur egungo helburua katalisi kimikoa ekiditea da, katalisi entzimatikoaari esker askotan kimikoki ezinezkoak diren erreakzioak burutzea ere posiblea delako eta katalisi entzimatiakoaren erreakzioak baldintza leunagoetan egin daitezkeelako; adibidez, tenperatura baxuagoetan, pH neutroan, presio atmosferikoan

edo disolbatzaile organikoak ekidinez. Gainera, katalizatzen duten erreazioarekiko eta erabiltzen duten substratuarekiko oso espezifikoak dira, askotan enantiomeroak ere desberdintzea posiblea izanik. Ez hori bakarrik, ingeniariak genetikoari esker entzimak hobetu daitezke katalisia tenperatura altuagoetan, pH optimoaren tarte zabalagoan... burutu dezaten.

Industrian entzima estrazelularrak dira gehien erabiltzen direnak. Mikroorganismoek entzima hauek sintetizatu eta ondoren kanpora jariatzen dituzte pisu molekular handiko substratuak degradatzeko (liseriketa estrazelularra) eta sortzen diren unitate txikiagoak zelulara barneratzeko. Amilasak, zelulasak, proteasak, lipasak eta nukleasak interes bioteknologiko industrialak duten entzima hidrolitikoak dira (Kirk *et al.*, 2002). Entzima hauek medio urtsuetan hidrolisiak bideratzen dituzte polisakaridoak, proteinak, lipidoak eta azido nukleikoak unitate txikiagoetara degradatuz. Amilasak (EC. 3.2) almidoiaren gain eragiten duten glukosidasak dira, lotura glukosidikoak apurtzen dituzte sakarido txikiagoak eta monosakaridoak emanez. α -amilasak (endoamilasa) eta β -amilasak (exoamilasa) daude; lehenengok kateak erdiko puntuetatik mozten dituzte kate laburrak lortuz eta bigarrenok kateen muturretako lotura glukosidikoak hidrolizatzen dituzte. Amilasak (batez ere α -amilasak) ehungintzan, nekazaritzan eta elikagaien industrian (gozogarriak, pentsuak...), industria kimikoan (garbigarriak), garagardoaren industrian eta paper eta orearen industrian erabiltzen dira (Gupta *et al.*, 2003). Zelulasa entzimek geroz eta interes handiagoa dutela ikusi da (Kuhad *et al.*, 2011), izan ere, planetako polisakaridorik ugariena (zelulosa) hidrolizatzen duten entzimak dira hauek. Ehungintzan, industria kimikoan (garbigarriak), nekazaritzako elikagaien industrian (pentsuak...), paper eta orearen industrian (zelulosa zuntzen hidrolisian) eta industria farmazeutikoan ere funtzioa dute zelulasek (Kuhad *et al.*, 2011). Azken urteotan bioerregaien garapenarekin batera, zelulasen bilaketa ere asko emendatu da zelulosa hondakinetatik bioetanola lortzeko. Entzima industrialen barne proteasek (EC 3.4) ere interes izugarria daukate. Elikagaien industrian asko erabiltzen dira entzimak elikagaiei propietate funtzional desberdinak ematen dizkietelako; adibidez testura hobetzeko edo gehigarri bezala asko erabiltzen dira. Horrez gain, industria kimikoan oso garrantzitsuak dira, batez ere garbigarrien osieran (Gavrilescu eta Chisti, 2005).

Desoxierribonukleasa (DNAsa) eta fosfatasen (EC. 3.1) garrantzi bioteknologikoa maila txikiagoko teknologietan datza batez ere. DNAsa entzimak biologia molekularrean (ingeniaritza genetikoan, hain zuzen) oso erabilgarriak dira hauei esker DNA gune zehatzetatik moztea posiblea delako (Rittle eta Perbal, 2008). Bestalde, fosfatasak hainbat molekuletatik (nukleotidoak, proteinak, alkaloideak...) fosfato taldeak kentzen dituzten entzima hidrolitikoak dira, hau da, desfosforilazioak burutzen dituzten entzimak dira. Oso sentikorrek diren fosfatasak biologia molekularrean eta immunologian oso erabiliak dira (Hoppe, 2003), adibidez, ELISA teknikan antigorputzei lotuta erabiltzen dira antigenoen detekziorako.

2. HELBURUA

Lan honen helburua Ekialdeko Kantauri itsasoko itsas-bakterioak isolatzea, karakterizatzea eta interes bioteknologikoa duten aktibitate entzimatiarren produkzio-gaitasuna analizatzea da. Helburu orokor hau lortzeko ondoko helburu partzialak planteatu dira:

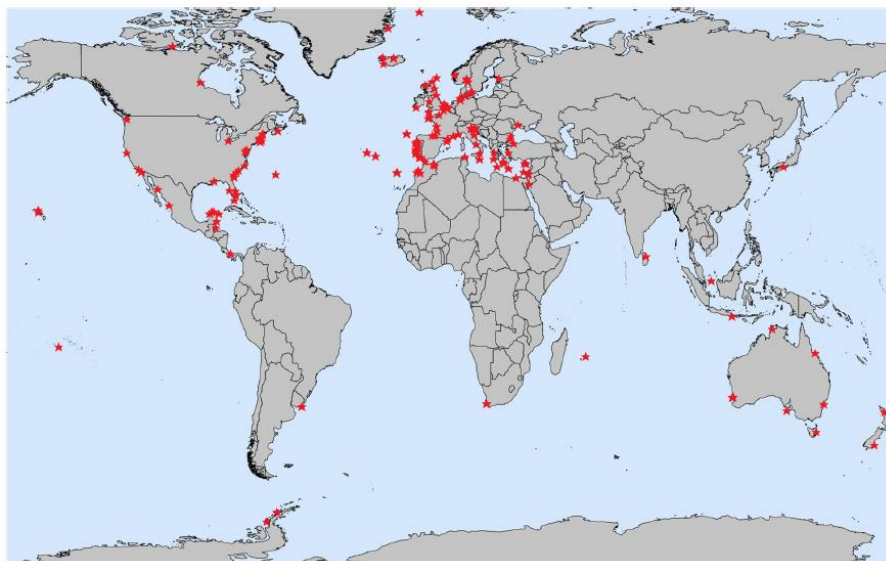
- 2015eko OSDko itsas-bakterioak isolatzea eta kontserbatzea.
- 2015eko OSDko 15 eta *Colección Marina* bildumako beste 6 itsas-bakterioren karakterizazio makroskopikoa eta mikroskopikoa burutzea.
- 2015eko OSDko 15 eta *Colección Marina* bildumako beste 6 itsas-bakterioren amilasa, zelulasa, kaseinasa, DNAsa eta fosfata entzimen produkzio-gaitasuna determinatzea.

3. MATERIAL ETA METODOAK

3.1. LAGINKETA

Laginketa 2015eko ekainaren 21ean (udako solstizioan) egin zen Armintzan, kostaldetik 1,6 km-ra gutxi gorabehera (N 43° 26' 57,7", O 2° 54' 9,77"), *Ocean Sampling Day* proiektuaren barne (**1 Irudia**). Polipropilenoazko kubo batekin itsas-gainazaleko ura (0,5 m-ko sakonera) hartu eta 100 µm-ko porodun sare batetik iragazi zen makroorganismoak (fitoplanktona eta zooplanktona) deuseztatzeko. Azido klorhidrikoarekin (%1) eta MilliQ urarekin garbitutako bidoiengan ur laginak

jaso ondoren, iluntasunean eta izotzetan mantendu ziren EHUko Leioako laborategira heldu arte (1,5 h).



1. irudia. 2014ko OSDan erregistratutako estazioen mapa. (Kopf *et al.*, 2015).

3.2. ISOLAMENDUA, KONTSERBAZIOA ETA BERRESKURAPENA

Ur laginak eta horien diluzioak (10^{-3} -raino) kultura-medio solidodun Petri plaketan erein ziren, ZoBell itsas-agarrean (AppliChem Panreac), R2A agarrean (Difco) eta IUA (Itsas Ur Artifiziala edo Sea Water Natural, SWN) agarrean (**1 Eranskina**). Azken kultura-medioa *Microbios Marinus* taldeak garatu zuen laginketa-estazioko ura (0,2 μm -tik iragazia eta 110°C -tan 15 minutuz autoklabean esterilizatua) eta faboragarriak izan daitezkeen hainbat molekula (Azil Homoserina Laktonak (AHL), metionina, substratu organiko eta bitamina dibertsoen nahasketa) konbinatuz, horren diseinurako Zengler *et al.* (2002) eta Stevenson *et al.* (2004) taldeen informazio bibliografikoak kontuan harturik.

Petri plakak 5-31 egunez inkubatu ziren *in situ* edota 30°C -tako tenperaturatan. Ezaugarri makroskopiko bereziak azaltzen zituzten kolonien kultibo puruak egin ziren ildaska anizkoitzaren bidezko agortze-teknikaren bidez (Madigan *et al.*, 2003). Isolatzeko metodo hau hiru aldiz errepikatu zen itsas-bakterioen kolonia puruak lortzeko.

Zelulak isolamendurako erabilitako kultura-medioan hazi ostean (19,5°C eta 30°C-tan 8 egunez), %7 DMSO (dimetilsulfoxidoa) eta %10 glizerol kriobabesleak zituen ZoBell salda esterila gehitu zen. 2 ml-ko kriobialak bete eta -80°C-tan kontserbatu ziren.

Anduiak berreskuratzeko esekidurak desizoztu ondoren isipu esterilekin azpi-laginak hartu eta kultura-medio solidoetan erein ziren. Isolamendurako tenperaturatan inkubatu ziren 7-15 egunez.

Lan honetan 2015eko OSDan isolaturiko 15 bakterioak aztertzeaz gain, *Microbios Marinos* ikerketa-taldeak aurretik isolatutako beste 6 itsas-bakterio aztertu ziren. Azken hauek itsas kultura-bildumako bakterioak dira (CM, *Colección Marina*). Bakterio hauen isolamendurako prozedura berdina jarraitu zen, baina kasu batzuetan ur laginek aurretratamendua jasan zuten (tenperatura desberdinetan inkubatu, itsas-agregatuak sortzea posiblea egiten duen *rolling machine* makinan inkubatu, monomero edo polimeroen nahaste jakina gehitu, flagelatuen deuseztatzea) bakterio espezie desberdinen hazkuntza bultzatzeko (**1 Taula**).

1 Taula. CM (Colección Marina) bildumako bakterioak.

Anduia	Jatorria eta data	Genero edo espeziea (talde filogenetikoa)
CM 35	Armintza (2011/04/08)	<i>Pseudoalteromonas citrea</i> (γ -proteobakterioa)
CM 162	Armintza (2012/04/17)	<i>Ruegeria atlantica</i> (α -proteobakterioa)
CM 449	Armintza (2013/03/15)	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (γ -proteobakterioa)
CM 467	Armintza (2013/03/15)	<i>Cellulophaga</i> sp. (Bakteroidetea)
CM 468	Armintza (2013/03/15)	Identifikatu gabea
CM 502	Armintza OSD14 (2014/06/21)	<i>Brachybacterium articum</i> (Aktinobakterioa)

Hauetz gain, Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)-tik lortutako 3 bakterio erabili ziren kontrol bezala (**2 Taula**).

2 Taula. Erreferentziatzko bakterioak. CECT (Colección Española de Cultivos Tipo) bildumako bakterioak.

Anduia	Genero edo espeziea	Gram	Aktibitatea
CECT 240	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positiboa	Fosfatasa positiboa
CECT 108	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negatiboa	Zelulasa positiboa
CECT 40	<i>Bacillus</i> sp.	Positiboa	Zelulasa positiboa

3.3. ISOLATUTAKO BAKTERIOEN KARAKTERIZAZIO MAKROSKOPIKOA

2015eko OSDan isolatutako 15 anduiak eta erreferentziazko 6 bakterioak (EHUko itsas- bakterioen bildumako CM 35, CM 162, CM 449, CM 467, CM 468 eta CM 502) morfologikoki definitu ziren maila makroskopikoan. Karakterizazio makroskopikoan kolonien morfologia, kolorea, tamaina, testura eta ertzak deskribatu ziren ZoBell, R2A eta IUA agar medioetarako 11,5, 20 eta 30°C-tan.

3.4. ISOLATUTAKO BAKTERIOEN KARAKTERIZAZIO MIKROSKOPIKOA

Karakterizazio mikroskopikoari dagokionez, Gram tindaketa bereizgarria (Brown, 2007) egin zen bakterioak beraien horma zelularreko peptidoglikano geruzaren loditasunaren arabera desberdintzeko. Modu honetan bakterioak Gram positibo edo negatibo bezala karakterizatu eta morfologikoki (kokoak, baziloak...) deskribatu ziren. Gram tindaketa kultura gazteekin egin zen faltsu positiboak ekiditen saiatzeko.

3.5. ISOLATUTAKO BAKTERIOEN AKTIBITATE ENTZIMATIKO ESTRAZELULARREN DETEKZIOA

Amilasa, zelulasa, kaseinasa, DNAsa eta fosfatasa aktibitateak hurrengo kultura-medio bereizgarrietan detektatu ziren: almidoi agarra, CMC (karboximetilzelulosa) agarra, esne gaingabetu agarra, DNAsa agarra eta PDP (fenolftaleina difosfato) agarra (**2 Eranskina**), hurrenez hurren.

Amilasa aktibitate entzimatikoa detektatzeko iodoaren froga burutu zen almidoi agarrean bertan, mediora iodo soluzioa (Gram iodina edo lugola) gehituz. Iodoa almidoiaren parte den amilosa helizean barneratzean kolore iluna sortzen da, beraz hidrolizatu gabeko guneak morez edo kolore ilunez tindatu ziren. Hortaz, amilasa positiboak ziren kolonien inguruan halo amilolitiko-garden bat ikusi zen lugola gehitu ostean (Murray *et al.*, 2007).

Bakterio zelulasa positiboak detektatzeko Karboximetilzelulosa agarra, CMC agarra eta Gram iodina erabili ziren (Kasana *et al.*, 2008). Iodinak eta hidrolizatu gabeko

zelulosak erreakzionatzean kolore gorri iluna sortzen da; hortaz, zelulasa aktibitatea zuten kolonien inguruan halo garden bat ikusi zen.

Kaseinasa aktibitatea duten bakterioak detektatzeko Esne gaingabetu agarra erabili zen. Medio hau Agar Elikagarria eta esne gaingabetua %50ean nahastuz lortu zen. Medio honek kolore zurixka du kaseinak eta kaltzio ioiek konplexu zuri-opakoa eratzen dutelako. Kaseinasa aktibitatearen presentzian, entzimek kaseina hidrolizatzen dute medioaren opakotasuna galduz. Hori dela eta, kaseinasa positiboak ziren koloniek halo proteolitiko garden bat izan zuten inguruan (Cristóbal *et al.*, 2011).

DNAsa agar medioan metil berdea gehitu zen DNAsa aktibitate entzimatikoa errazago detektatu ahal izateko. Metilo berdeak DNArekin pH 7,3an kolore berdea duen konplexu egonkor bat sortzen du. DNAsa aktibitateagatik DNAREN degradazioa ematen denean, ez da konplexurik egongo, beraz, positiboak ziren kolonien inguruan kolore gabeko gunek azaleratu ziren (Smith *et al.*, 1969).

Bakterio fosfatasa positiboak detektatzeko PDP (fenolftaleindifosfato) agarra erabili zen (MacFaddin, 2003). Fosfatasak PDPa degradatzen du fenolftaleina askea sortuz. Bakterioak medio solido honetan hazi ostean, koloniei 3-4 tanta NaOH gehitu zitzaizkien, alkaliak fenolftaleina askearekin erreakzionatzean arrosez koloreztatzen baititu koloniak. Hortaz, fosfatasa aktibitatea zuten kolonien ingurua kolore arrosa biziaz tindatuta gelditu zen.

Itsas-bakterioak 5 medio hauetan erein eta 7-21 egunez inkubatu ziren euren hazkuntza eta aktibitate entzimatiakoak detektatzeko. Amilasa, kaseinasa eta DNAsa entseguen kasuetan itsas-bakterio bakoitza bere isolamendu tenperaturan kulturatu zen. Zelulasa eta fosfatasa aktibitateen kasuan ordea, itsasoko mikroorganismoen gain erreferentziatzeko bakterioak (kontrolak) kulturatu ziren, guztiak 26°C-tan. Entsegu bakoitzeko hiru erreplika egin ziren.

Aipatutako aktibitate entzimatiakoak halo hidrolitikoak behatuz detektatu ziren. Haloaren presentziak mikroorganismoa intereseko substratua (almidoia, zelulosa, kaseina, DNA edo PDP) degradatzeko gai zela esan nahi du. Plaka batzuetan hazkuntza behatu arren, hazitako mikroorganismo guztiak ez ziren entzima estrazelularren produktore, medioek intereseko substratuaz gain beste substratu

batzuk zituztelako bakterioen hazkuntzarako. Hortaz, kultura-medio bereizgarri hauetan lehenik bakterioen hazkuntza behatu zen, gero aktibitate entzimatikoa zuten ala ez egiaztatzeko. Hazkuntzarik behatu ez zen kasuetan, ezin izan zen ziurtatu bakterio horrek aktibitaterik zuen ala ez.

4. EMAITZAK

4.1. ITSASOKO BAKTERIOEN ISOLAMENDUA, KONTSERBAZIOA ETA BERRESKURAPENA

2015eko OSDan 78 andui isolatzea lortu zen. Ildaska anizkoitzaren bidezko agortze-teknikaren bidez kultibo puruak lortu ostean, kriokontserbatu eta hotzetan (-80°C-tan) mantendu ziren. Isolatutako bakterioetatik bakarrik 15ekin aurrera jarraitu zen, CM bildumako 6 itsas-bakterioekin batera.

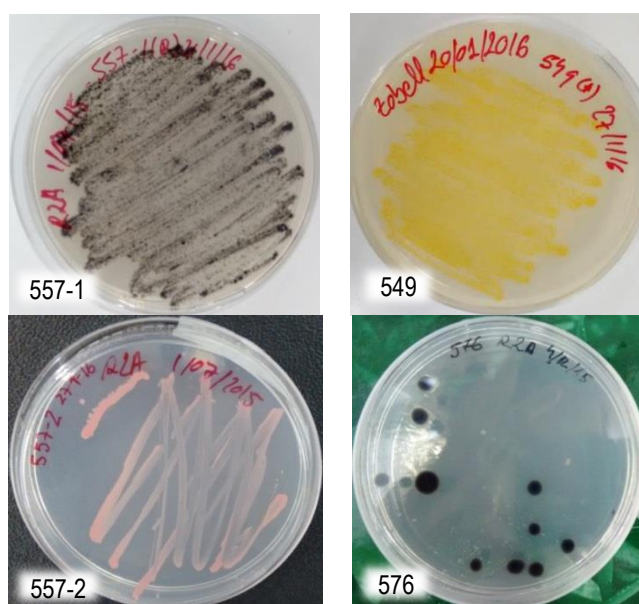
2015eko OSDan isolatutako 15 itsas-bakterioak gehi CMko 6 anduiak (**3 Taula**) lehen azaldutako moduan gordeta, arazorik gabe berreskuratu ziren azaldutako prozeduraren bitartez.

3 Taula. Kultura-bildumako bakterioen isolamendukoari buruzko informazioa. Gorritz daudenak *Microbios Marinos* taldeak aurretik isolatutako bakterioak dira eta gainerakoak OSD15ean (2015/06/21) isolatutakoak.

Itsas-anduia	Isolamendua		Inkubazioa		Denbora (egunak)
	Data	Uraren T ^a (°C)	Kultura-medioa	T ^a (°C)	
35	2011/04/08	14	ZoBell	15	12
162	2012/04/17	13	ZoBell	20	13
449	2013/03/15	12	IUA	11,5	10
467	2013/03/15	12	IUA	11,5	10
468	2013/03/15	12	IUA	11,5	10
502	OSD14 (2014/06/21)	18,5	ZoBell	20	15
523	OSD15	19,5	ZoBell	30	5
524	OSD15	19,5	ZoBell	30	5
525	OSD15	19,5	R2A	30	5
527	OSD15	19,5	R2A	30	5
549	OSD15	19,5	ZoBell	20	12
552	OSD15	19,5	ZoBell	20	12
553	OSD15	19,5	ZoBell	20	12
557-1	OSD15	19,5	R2A	20	12
557-2	OSD15	19,5	R2A	20	12
560	OSD15	19,5	R2A	20	12
572	OSD15	19,5	R2A	20	12
576	OSD15	19,5	IUA	20	31
583	OSD15	19,5	IUA	20	31
584	OSD15	19,5	IUA	20	31
585	OSD15	19,5	IUA	20	31

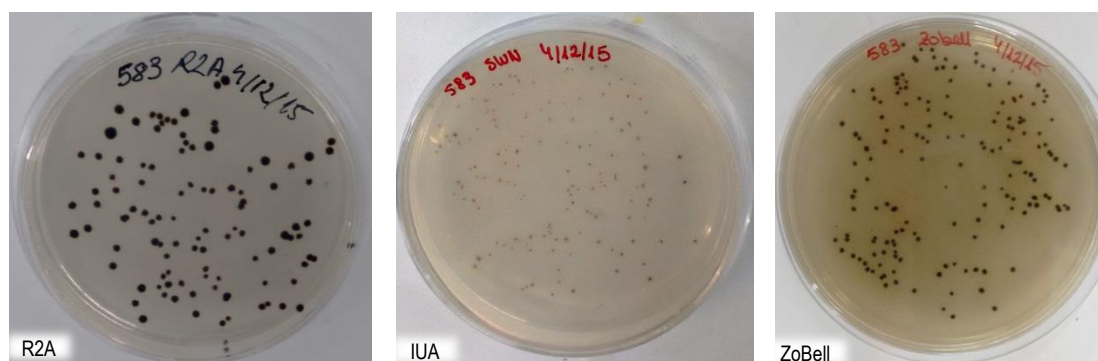
4.2. ISOLATUTAKO BAKTERIOEN KARAKTERIZAZIO MAKROSKOPIKOA

Isolaturiko bakterioak makroskopikoki karakterizatzeko hiru kultura-medioetan (ZoBell, R2A, IUA) itsas-bakterioen hazkuntza aztertu zen kolonien deskribapena eginez. Aniztasun handia sumatu zen kolore, tamaina, forma eta testurari dagokienez itsas-andui ezberdinen artean (**2 Irudia**).



2 Irudia. CM 557-1, CM 549, CM 557-2 eta CM 576 itsas-anduien kulturak. Ezaugarri makroskopiko desberdinak erakusten dituzte lau anduek koloniaren kolore, tamaina eta formari dagokionez.

Gainera, andui batzuk hiru kultura-medio desberdinetan kulturatzekoan, askotan ezaugarri makroskopiko desberdinak garatu zituzten (**3 Irudia**).



3 Irudia. CM 583 anduiaren hazkuntza kultura-medio desberdinetan. R2A agarrean (ezkerreko irudian) kolonia beltz ertainak, IUA agarrean (erdiko irudian) kolonia zuri txikiak (batzuk pigmentazio marroiarekin) eta ZoBell agarrean (eskuineko irudian) kolonia beltz txikiak eratzten ditu. ZoBell kultura-medioan hazten denean, kolonia inguruan pigmentazio marroia agertzen da.

ZoBell agarrean 21 anduitik 19 (%90) itsas-anduiren hazkuntza behatu zen, horien artean aniztasun handia egonik ezaugarri makroskopikoei dagokienez (**4 Taula**). Kolorea haien artean desberdintzeko ezaugarri makroskopiko interesgarria da kultura-medio hau erabiltzerakoan. Horrela, kolonia horiak %32, zuriak, laranja eta beltzak %16 bana eta marroiak eta arrosak %10 bana izan ziren.

4 Taula. Itsas-anduien karakterizazio makroskopikoa ZoBell kultura-medioan. Gorriz *Microbios Marinos* taldeak aurretik isolatutako bakterioak agertzen dira. Gainerakoak OSD15ean isolatutakoak dira.

Itsas- anduia	Inkubazio T (°C)	ZoBell agarrean kolonien ezaugarriak		
		Kolorea	Tamaina	Berezitasunak
35	20	Beltza	Handia	Kolonien erdiko aldean puntu zuria. Agarasa aktibitatea. Media horixka bihurtzen du.
162	20	Horia	Oso txikia	Kolonia gardena da, pigmentazio horiarekin.
449	11,5	Marroia	Txikia	Koloniak borobilak eta handienek pigmentazio beltza erdian.
467	11,5	Horia	Txikia	
468	11,5	Horia	Handia	Kolonia distiratsu-urtsuak
502	20	Horia	Txikia	Kolonia mateak
523	30	Zuria	Txikia	
524	30	Zuria	Txikia	Kolonien ertzak krematsuak
525	30	Horia	Txikia	
527	30	Zuria	Txikia	
549	20	Laranja	Txikia	
552	20	Laranja	Handia	Kolonia borobilak, ertzak laranja iluna eta erdikoa argiagoa.
553	20	Marroia	Ertaina	Ertzetan pigmentazioa ilunagoa.
557-1	20	Beltza	Txikia	lletsua
557-2	20	Arrosa	Txikia	
560	20	-	-	
572	20	Arrosa	Txikia	Kolonia borobilak
576	20	-	-	
583	20	Beltza	Txikia	Kolonien inguruan pigmentazio marroia
584	20	Horia	Txikia	Kolonia borobil horiak, distiragabeak.
585	20	Laranja	Txikia	Kolonia borobilak

(-) Ez da hazkuntzarik behatu.

IUA agarrean 21 anduitik 14 (%67) itsas-anduiren hazkuntza behatu zen. Horien artean aniztasun handia behatu da ezaugarri makroskopikoei dagokienez (**5 Taula**). Kolorea haien artean desberdintzeko ezaugarri makroskopiko interesgarria da ere kultura-medio hau erabiltzerakoan. Horrela, kolonien %43 zuriak, %36 gardenak eta %7na beltzak, laranja eta arrosak izan ziren.

5 Taula. Itsas-anduien karakterizazio makroskopikoa IUA kultura-medioan. Gorriz *Microbios Marinos* taldeak aurretik isolatutako bakterioak agertzen dira. Gainerakoak OSD15ean isolatutakoak dira.

Itsas-anduia	Inkubazio T (°C)	IUA agarrean kolonien ezaugarriak		
		Kolorea	Tamaina	Berezitasunak
35	20	Zuria	Ertaina	Kolonien batzuk pigmentazio beltza.
162	20	Gardena	Oso txikia	
449	11,5	Zuria	Txikia	Borobilak eta batzuk pigmentazio marroiarekin.
467	11,5	Gardena	Ertaina	
468	11,5	Gardena	Txikia	
502	20	Zuria	Oso txikia	
523	30	Zuria	Oso txikia	
524	30	Zuria	Oso txikia	Gutxi hazi da
525	30	-	-	
527	30	-	-	
549	20	-	-	
552	20	-	-	
553	20	Gardena	Txikia	
557-1	20	Beltza	Txikia	lletsua
557-2	20	-	-	
560	20	-	-	
572	20	Arrosa	Txikia	
576	20	-	-	
583	20	Zuria	Txikia	Kolonia borobilak, batzuk pigmentazio beltzarekin.
584	20	Gardena	Oso txikia	
585	20	Laranja	Oso txikia	

(-) Ez da hazkuntzarik behatu.

R2A agarrean itsas-bakterio gutxiagoren hazkuntza behatu zen (%48): 10 itsas-anduiren hazkuntza ikusi zen eta ezaugarri desberdinak dituzten koloniak eratu zituzten (**6 Taula**). Bakterioak desberdintzeko kolonien kolorea ere ezaugarri makroskopiko egokia da: kolonien %40 beltzak, %30 arrosak, %20 zuriak eta %10 horiak izan ziren.

6 Taula. Itsas-anduien karakterizazio makroskopikoa R2A kultura-medioan. Gorriz *Microbios Marinos* taldeak aurretik isolatutako bakterioak agertzen dira. Gainerakoak OSD15ean isolatutakoak dira.

Itsas-anduia	Inkubazio T (°C)	R2A agarrean kolonien ezaugarriak		
		Kolorea	Tamaina	Berezitasunak
35	20	Beltza	Oso handia	Kolonien erdiko aldean puntu zuria. Agarasa aktibitatea. Medioa horixka bihurtzen du.
162	20	-	-	
449	11,5	-	-	
467	11,5	-	-	
468	11,5	-	-	
502	20	-	-	
523	30	-	-	
524	30	-	-	
525	30	Horia	Txikia	
527	30	Zuria	Txikia	
549	20	-	-	
552	20	-	-	
553	20	Zuria	Txikia	Kolonia gardenak
557-1	20	Beltza	Txikia	lletsua
557-2	20	Arrosa	Txikia	
560	20	Arrosa	Ertaina	
572	20	Arrosa	Txikia	Kolonia borobilak
576	20	Beltza	Handia	lletsua
583	20	Beltza	Ertaina	Kolonia borobilak
584	20	-	-	
585	20	-	-	

(-) Ez da hazkuntzarik behatu.

4.3. ISOLATUTAKO BAKTERIOEN KARAKTERIZAZIO MIKROSKOPIKOA

Gram tindaketari esker aztertutako 21 itsas-bakterioen artean 12 (%57) Gram positiboak zirela ikusi zen. Gainerako 9 anduiak (%43) Gram negatiboak ziren (**7 Taula**). Itsas-bakterioak peptidoglikano geruzaren loditasunaren arabera bereizteaz gain, morfologikoki desberdinu ziren: %47 kokoak, %33 baziloak eta %10na kokobaziloak eta firukariak ziren.

Gram tindaketari esker aztertutako 21 itsas-bakterioen artean %29 koko Gram positiboak, %19 bazilo Gram negatiboak, %14na koko Gram negatiboak eta bazilo Gram positiboak, %10 firukariak eta %5na kokobazilo Gram negatiboak eta kokobazilo Gram positiboak zirela ikusi zen. **3 Eranskinean** isolatutako zenbait bakterioen irudiak azaltzen dira.

7 Taula. Itsas-anduien karakterizazio mikroskopikoa (Gram tindaketa). Gorriaz *Microbios Marinus* taldeak aurretik isolatutako bakterioak agertzen dira. Gainerakoak OSD15ean isolatutakoak dira.

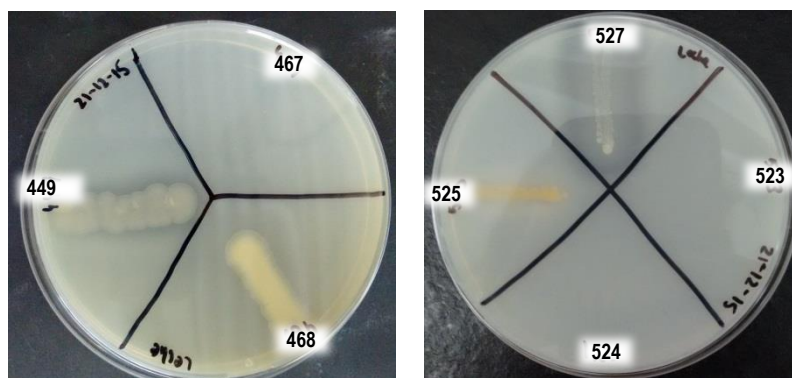
Itsas-anduia	Gram	Forma	Itsas-anduia	Gram	Forma
35	Negatiboa	Baziloa	549	Negatiboa	Kokoa
162	Negatiboa	Kokobaziloa	552	Positiboa	Kokoa
449	Negatiboa	Baziloa	553	Positiboa	Kokoa
467	Negatiboa	Baziloa	557-1	Positiboa	Firukaria
468	Negatiboa	Kokoa	557-2	Positiboa	Baziloa
502	Positiboa	Kokobaziloa	560	Positiboa	Baziloa
523	Negatiboa	Kokoa	572	Positiboa	Baziloa
524	Positiboa	Kokoa	576	Positiboa	Firukaria
525	Positiboa	Kokoa	583	Positiboa	Kokoa
527	Positiboa	Kokoa	584	Negatiboa	Baziloa
			585	Negatiboa	Kokoa

4.4. ISOLATUTAKO BAKTERIOEN AKTIBITATE ENTZIMATIKO ESTRAZELULARREN DETEKZIOA

Almidoi agarrean itsas-bakterioen %43 hazi zen eta horien artean amilasa aktibitatea zuten bi itsas-bakterio detektatu ziren (%22). CM 553 anduiak 1 cm-ko diametroko halo hidrolitikoa aurkeztu zuen eta CM 572ak 2 cm-ko diametrokoa.

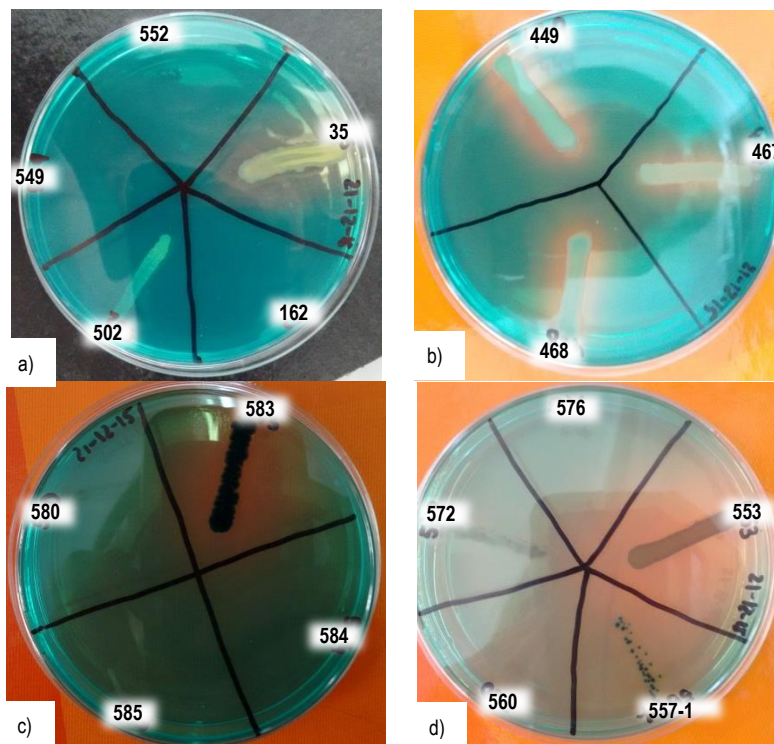
CMC agarrean ereindako 21 anduiren artean %71 hazi zen, soilik CM 35 izanez zelulasa positiboa (%7).

Esne agarrari dagokionez, itsas-bakterioen %48 hazi zen horietako %20k (2 bakterioek) kaseinasa aktibitatea zutelarik. CM 449 eta CM 527 itsas-bakterioek aurkeztu zuten kaseinasa aktibitatea bigarren andui honen aktibitatea lehenengoarena baino askoz handiagoa izanda (**4 Irudia**).



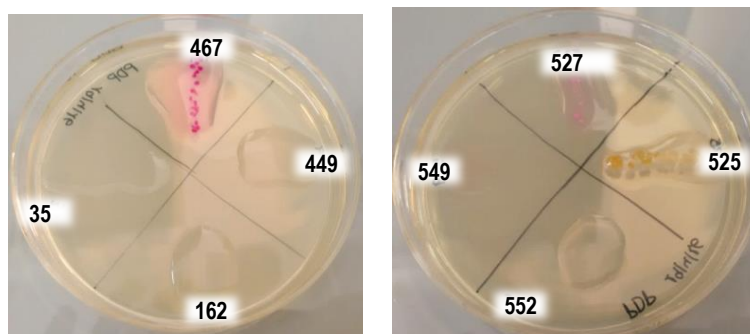
4 Irudia. Kaseinasa aktibitatea. Ezkerreko irudian ikerketa taldeak aurretiaz isolatutako bakterioen hazkuntza (CM 449 eta CM 468) eta aktibitatea (CM 449). Eskuineko irudian OSD15ean isolatutako CM 527 eta CM 525 anduiren hazkuntzak, bakarrik CM 557ak aktibitatea izanik.

DNAsa agarrean bakterioen %43 hazi zen eta horietako %67k (6 itsas-bakteriok) DNAsa aktibitatea zuten. CM 35, CM 449, CM 467, CM 468, CM 553 eta CM 583 itsas-bakterioen DNAsa aktibitatea detektatu zen (**5 Irudia**).



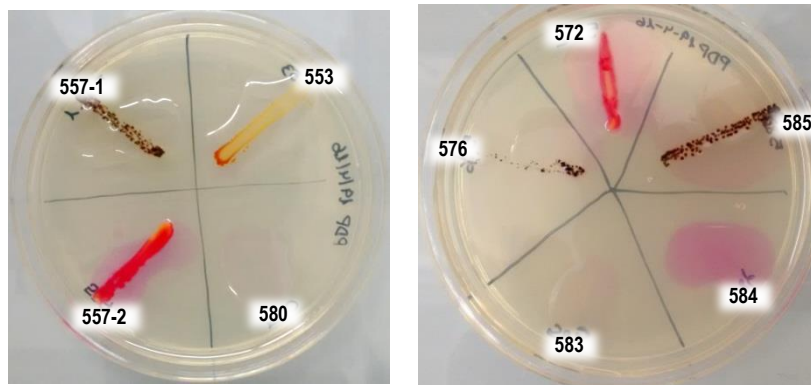
5 Irudia. DNAsa aktibitatea. (a) DNAsa aktibiterako bakterio positiboa (CM 35) eta negatiboa (CM 502). (b) DNAsa positiboak ziren hiru itsas-andui. (c) OSD15ean isolaturiko CM 583 anduiaren hazkuntza eta horren DNAsa aktibitatea. (d) OSD15ean isolatu ziren CM 553, CM 557-1, CM 572 anduien hazkuntza, bakarrik CM 553ak DNAsa aktibitatea izanik.

PDP agarrean bakterioen %52aren hazkuntza detektatu zen, zeintzuetatik %45ak (5 itsas-bakteriok) fosfatasa aktibitatea zuten. OSD15ean isolatutako bakterioen artean, CM 527ak fosfatasa aktibitate ahula azaldu zuen aurretik isolatutako CM 467 bakterioarekin konparatuta (**6 Irudia**).



6 Irudia. Fosfatasa aktibitatea. CM 527 itsas-bakterioak fosfatasa aktibitate ahula aurkezten du CM 467 itsas-bakterioarekin konparatuta.

7 Irudian ageri diren CM 557-2, CM 572 eta CM 584 itsas-bakterioek ere (2015eko OSDkoak) fosfatasa aktibitate handia azaldu zuten.



7 Irudia. CM 557-2, CM 572, CM 584 itsas-bakterioen fosfatasa aktibitatearen detekzioa.

8 Taulan itsas-bakterioek bost kultura-medio bereizgarrietan izandako hazkuntza eta aktibitateak azaltzen dira.

8 Taula. Itsas-anduinen aktibitate entzimatikoa. Gorri *Microbios Marinus* taldeak aurretik isolatutako bakterioak agertzen dira. Gainerakoak OSD15ean isolatutakoak dira.

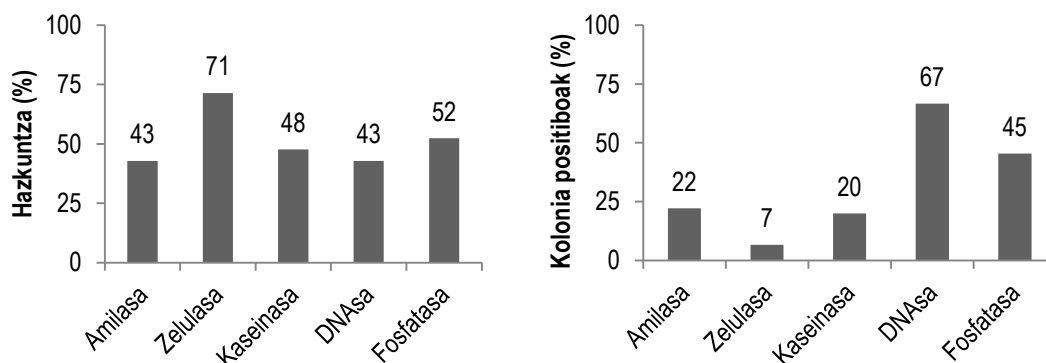
CM	Almidoi agarra		CMC agarra		Esne agarra		DNAsa agarra		PDP agarra	
	Hazkuntza	Amilasa	Hazkuntza	Zelulasa	Hazkuntza	Kaseinasa	Hazkuntza	DNAsa	Hazkuntza	Fosfatasa
35	+	-	+	+	+	-	+	+++	-	-
162	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
449	-	-	+	-	+	+	+	+++	-	-
467	-	-	+	-	-	-	+	++	+	+
468	-	-	+	-	+	-	+	+++	-	-
502	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
523	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
524	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
525	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
527	+	-	+	-	+	+++	-	-	+	+
549	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
552	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
553	+	++	+	-	+	-	+	++	+	-
557-1	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
557-2	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+++
560	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
572	+	+++	+	-	+	-	+	-	+	+++
576	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
583	+	-	+	-	+	-	+	+++	+	-
584	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+++
585	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) Ez da hazkuntzarik / aktibiterik behatu.

(+) Hazi da / aktibitatea du.

(++/+++) Aktibitate handia du.

8 Irudian aktibitatea detektatzeko kultura-medio bereizgarrietan emandako 21 anduien hazkuntza azaltzen da. Isolaturiko bakterioen erdia (%51, batz bestekoa) haztea lortu zen. Hazita daudenak bakarrik kontuan hartuta, isolatuen erdiak DNAsa (%67) eta fosfatasa (%45) aktibitateak, isolatuen laurdenak amilasa (%22) eta kaseinasa (%20) aktibitateak eta zelulasa aktibitatea (%7) itsas-bakterio bakarrak aurkeztu zuten.



8 Irudia. 21 itsas-bakterioen hazkuntzen (ezkerra) eta hazitako enzimaren aktibitate entzimatikoen portzentajeak (eskuma).

5. EZTABAIDA

Ikerketa honetan Kantauri itsasoko uretako aniztasun bakteriologikoa eta horien potentzial entzimatikoa bioteknologikoa aztertu dira. Horretarako kultibagarriak diren 21 itsas-andui isolatu dira Armintzako kostaldetik. Hauetatik 15 itsas-bakterio 2015eko ekainaren 21ean (udako solstizioan), bat 2014ko udako solstizioan eta gainontzeko 5ak 2013ko martxoan eta apirila artean isolatu dira. Ekosistema hau urtean zehar bi egoera desberdinetatik pasatzen da bakterioen komunitateetan aldaketa filogenetiko eta fisiologikoak aurkeztuz. Maiatzetik abuztura bitartean produkzioa handitu egiten da Bacteroidetes filumaren nagusitasunarekin eta irailetik martxora bitartean produkzioa jaitsi egiten da alfaproteobacteria klasearen nagusitasunarekin (Azua eta Artolozaga, jakinarazpen pertsonala). Udako solstizioan Bacteroidetesen ugartitasunak eta filum honen gaitasun hidrolitiko handiak (Pommier *et al.*, 2007) ekosistema honetan udako solstizioan egin den 78 itsas-bakterioren isolamenduaren eta 21 anduiaren karakterizazioaren interesa nabarmentzen dute.

ZoBell agarrean isolaturiko itsas-bakterio gehienak (%90) kulturatzea lortu bada ere, ez da CM 560 eta CM 576 bakterioen hazkuntzarik detektatu. IUA agarrean kulturagarritasuna %67koa da, baina honetan ere ez dira bi andui hauek hazi. R2A agarrean ordea, nahiz eta kulturagarritasunaren ehunekoa baxuagoa izan (%48), bi itsas-andui horien hazkuntza eman da. Itsas-bakterioak isolatu eta kulturatzeko itsasoko baldintzak hobekien imitatu behar dira. Kultura-medio hauen kulturagarritasuna medioen konposaketa eta kontzentrazioaren menpekoa da, horregatik kultura-medioek dituzten substratuak hazkuntzarako faboragarriak izan behar dira. ZoBell eta IUA agarrek R2A baino kulturagarritasun handiagoa aurkezten dute, agian lehenengoak gatz ezorganikoen dibertsitate handiena eta bigarrenak substratu organikoen dibertsitate handiena dutelako (**1 Eranskina**). R2A kultura-medioak duen osagai organikoen kontzentrazio altuek bakterio batzuen hazkuntza inhibitu dezakete, itsas-bakterio oligotrofikoentzako kontzentrazio altu horiek inhibitzailak izan baitaitezke (Joint *et al.*, 2010).

ZoBell kultura-medioak isolatuen artean kolore dibertsitate handiena duenez, bakterioak erraz desberdintzea lortzen da. Beraz, i) kulturagarritasunaren portzentaje altuena duelako, ii) kultura-medio honetan azterturiko aktibitate hidrolitikoren bat aurkezten duten isolatu guztiak kulturagarriak direlako eta iii) isolatzerakoan erraztasunagatik, erabilitako hiru kultura-medioen artean ZoBell kultura-medioa egokiena dela ondoriozta dezakegu.

Itsas ekosistemaren konplexutasunagatik eta bertako baldintza oligotrofikoengatik itsas-bakterioak isolatzea zaila da. Eraginkortasun altuko hainbat high-throughput teknika (Gel Micro Droplet kapsulazioa edo mikrokapsulazioa, fluxu-zitometria, laser pintzak, diluzioak ahitu arte...) geroz eta erabiliagoak diren arren (Alain eta Querellou, 2009), agarrean burutzen den isolatzeko ohizko metodoa gaur egun erabiliena da. Plaketan egindako kulturatzeari esker ekosistema bateko bakterioen %0,001-1 isolatzen dela estimatzen da. Kultura-medioen osagaiak itsas-bakterioen hazkuntzarako egokiak ez izatea, kultura-medioen osagaien kontzentrazio altuek itsas-bakterioen hazkuntza oligotrofikoa inhibitzea, bakterioek beharrezkoak dituzten komunikazio interzelularrentzako (*quorum sensing*) seinaleak galtzea, hazkuntza abiadura baxuko itsas-bakterioentzako inkubazio denbora laburregiak erabiltzea edo lisi birikoa izan daitezke kulturagarritasunaren zailtasun honen eragileak (Joint *et al.*,

2010). Baldintza hauek guztiak kontuan hartu behar dira itsas-bakterioentzako kultura-medioak diseinatzeko orduan (Joint *et al.*, 2010). Lan honetako emaitzek ZoBell kultura-medioaz gain beste hainbat kultura-medio desberdin, R2A eta IUA, erabiltzea interesgarria dela erakusten dute.

Bakterioen kontserbazio metodoa oso garrantzitsu da bakterioak behin gordeta egonda berreskuratu ahal izateko. Lan honetan itsas-bakterioak kriokontserbazioz mantendu dira, zeina denbora luzean mantentzeko metodorik erabiliena den (Tanghe *et al.*, 2003). Teknika honek arazoak sortu ditzake hozte-abiadura azkarregia denean, zelula barnean kristalak sortu eta ondorioz zelulak hausten direlako zelulen berreskurapena ezinezkoa eginez. Kristalen sorrera murrizteko kriobabesleak gehitzen dira. Askotan zaila edo ezinezkoa izaten da kriobabesle espezifiko batek izango duen ondorioa auresatea, hortaz, mikroorganismo batentzako kriobabesle egokiena eta horren kontzentrazio optimoa enpirikoki kalkulatu beharko litzateke. Hubálek 2003an mikroorganismoen kriokontserbazioan erabiltzen diren kriobabesle desberdinak konparatu zituen, horien artean lan honetan erabili diren DMSO (dimetil sulfoxidoa) eta glizerola ere deskribatuz. Bi hauek mikrobiologian gehien erabiltzen diren kriobabesleak dira (Hubálek, 2003), DMSOa kriobabesle unibertsaltzat hartzen delarik ere. Hubálek (2003) bere lanean DMSOa beste kriobabesle batzuekin konbinatzean berreskurapen-emaitza onak lortu daitezkeela adierazi zuen. Gure kasuan bi kriobabesle hauekin kontserbaturiko isolatu guztien berreskurapenak adierazten du Ekialdeko Kantauri itsasoko itsas-bakterioak kontserbatzeko metodo ona dela.

Lan honetan lortu diren karakterizazio mikroskopikoko emaitzak (koko Gram positiboan gailentasuna, %29) ez datoz bat Lo Giudice *et al.* (2012) taldeak lortutako emaitzekin. Hauen isolatu gehienak (%82,5) bazilo Gram negatiboak izan ziren, batez ere Gammaproteobakterioak (%67,8). Haez gain, Aktinobakterioak (%16,7) eta Firmicutes (%0,8) bakterio Gram positiboak (%17,5) ere isolatu zituzten. Bat ez egite honen arrazoiak hainbat izan daitezke. (i) Kultura-medioak isolamendurako tresna egokiak izan arren, askotan kulturatze alborapena gertatzen da (Hardoim *et al.*, 2014), hau da, erabilitako kultura-medioen konposatuaren kontzentrazioei hobekien egokitzen zaien bakterioen hazkuntza faboratuko da beste askorena inhibituz edo gutxituz. Zoritxarrez, laborategiko kultura-medioei hobekien

egokitzen zaien mikroorganismoak askotan ekosistemako gutxieneko organismoak dira (biosfera arrarokoak) eta hortaz ez dira ekosistemako mikrobiotaren isla. (ii) Bestalde, Gram tindaketan kultibo gazteak erabili dira faltsu positiboak ekiditeko baina itsas-bakterio hauen hazkuntza motela dela eta, ezin daiteke ziurtasunez jakin bakterio hauek gazteak diren ala ez eta hortaz lorturiko emaitzen artean batzuk faltsu positiboak izan daitezke. (iii) Azkenik, itsas-bakterioen tamaina txikiagatik eta laginen prestaketan sortutako taldekapenengatik batzuetan zaila egiten da bakterioen morfologia eta paretaren izaera ziurtatzea. Emaitza hauek isolatu hauen karakterizazio filogenetiko molekularren interesa adierazten dute isolaturiko bakterioa zein eta nolakoa den ziurtatzeko.

Kultura-medio bereizgarri batzuei esker isolaturiko itsas-bakterioek aktibitate entzimatikorik duten ala ez determinatu da. Kultura-medio bakoitzean ez da itsas-bakterio isolatu guztien hazkuntza detektatu; isolaturiko bakterioen %43-71 (%51 batzuek bestean) haztea lortu da gutxienez amilasa eta DNAsa agarren eta gehienez CMC agarraren kasuan. Beraz, aktibitate entzimatiakoaren gaitasuna isolatuen erdian baino ezin izan da egiaztatu. Honen arrazoa kultura-medio hauen osagaien konposaketa eta kontzentrazio altuak izan daitezke, itsas-bakterio hauentzako baldintza inhibitzaileak izan baitaitezke. Hazkuntzarik lortu ezean bakterio horrek aktibitatearik duen ala ez ezin izango denez jakin, kultura-medio hauetan kulturagarritasuna handitzea oso interesgarria izango litzateke. Honetarako kultura-medioen konposizioa eta kontzentrazioa aldatu daiteke. ZoBell agarra isolaturiko itsas-bakterioen kulturagarritasunerako kultura-medio onena denez (isolatuen kulturagarritasunaren %90), aktibitate entzimatiakoaren detekzioarako ZoBell agarrari intereseko substratuaren (almidoia, zelulosa, kaseina, DNA, fosfato-esterrak) kontzentrazio baxua gehi aktibitatearen adierazlea gehitu ahalko litzateke kultura-medio bereizgarri hauetan itsas-bakterioen kulturagarritasuna handitzeko eta horrela gaitasun entzimatiakoaren detekzioa hobetzeko.

Itsas-bakterio batzuk 5 kultura-medio bereizgarrietan hazteko gaitasuna izan duten arren, aztertutako substratuak hidrolizatzeko gaitasun entzimatiakoa horietako gutxi batzuk bakarrik adierazi dute. DNAsa eta PDP agarretan hazitako itsas-bakterioen %67k eta %45k azaldu dute DNAsa eta fosfatasa aktibitateak, hurrenez hurren. Bi hauek isolatutako bakterioetan gehien detektatu diren aktibitateak izan dira. DNAsa

aktibitatearen portzentajeak De Santi *et al.* (2016) taldearen emaitzekin bat egiten du, hauek Artikoko itsas-bakterioen %53n detektatu baitzuten DNAsa aktibitatea. Fosfatasa aktibitatea ere oso ohikoa da itsas-bakterioen artean Luo *et al.* (2009) taldeak azaldu zuen bezala. Beraz, halako aktibitate entzimatiakoaren sortzaileen bilaketa Kantauri itsasoan oso egokia eta interesgarria izan daiteke. Hazitako bakterioen %22k amilasa aktibitatea eta %20k kaseinasa aktibitatea aurkeztu dute. Aktibitate proteolitikoari dagokionez, Cristóbal *et al.* (2011) taldeak ere itsasotik isolatutako %33 bakterio proteolitikoak direla adierazi zuen. Horrez gain, Cristóbal *et al.* (2011) taldeak azaldu zuen bezala, proteasa produktore diren andui portzentaje altuagoa (%67) izan daiteke, baina kontuan hartuta lan horren isolatu gehienak organismo bentonikoetatik isolatutakoak izan direla. Zelulasa aktibitatea CMC agarrean hazitako andui bakar batek aurkeztu du (%7). Cristóbal *et al.* (2015) taldeak ordea, sub-Antartikoko bakterio itsastarren (organismo bentonikoetatik eta uretatik isolatutakoak) artean zelulasa aktibitatearen sortzaileen portzentaje handiagoa topatu zuen (%47). Hala ere, baliteke itsasoa zelulasak bilatzeko ingurune egokiena ez izatea itsasoko zelulosa edo zelulosa bezalako substratuen kontzentrazioak baxuak direlako. Adibidez, egokiagoa izango litzateke zelulosaz elikatzen diren organismoen (termiten) hesteko mikroorganismoetara jotzea (Gupta *et al.*, 2012). Edozein kasutan, itsasoko zelulasek, CM 35ak aurkeztutakoek, abantailak izan ditzakete tenperatura eta substratuen kontzentrazio baxuetan oso efizienteak direlako.

DNAsa aktibitatea 6 itsas-bakteriok azaldu dute, konkretuki CM 35, CM 449, CM 467, CM 468, CM 553 eta CM 583. Fosfatasa aktibitatea 5 itsas-anduian detektatu da: CM 467, CM 527, CM 557-2, CM 572 eta CM 584. Amilasa aktibitatea CM 553 eta CM 572 itsas-anduian detektatu da eta kaseinasa CM 449 eta CM 527 anduian. Itsas-bakterio bakarrak azaldu du zelulasa aktibitatea, CM 35ak, zeinak hainbat frogatan agarasa aktibitatea ere aurkeztu duen. Azpimarratzekoak dira 6 itsas-bakterio (CM 35, CM 449, CM 467, CM 527, CM 553 eta CM 572) zeintzuetan bi aktibitate entzimatiako batera detektatu diren. Ez dago hiru aktibitate entzimatiako aurkeztu duen bakteriorik.

Isolaturiko itsas-bakterioen artean, CM 572 amilasa, CM 35 zelulasa, CM 527 kaseinasa, CM 583 DNAsa eta CM 557-2 fosfatasa entzimen produktore interesgarriak izan daitezke aktibitate handia azaldu dutelako eta kultura-medio

desberdinetan (ZoBell, R2A eta IUA, baita kultura-medio bereizgarrietan ere) kulturatu direlako.

Dena dela, aztertutako aktibitate entzimatikoei dagokienez, itsas-bakterio mesofilo planktonikoei buruz informazio gutxi dago, batez ere artikoko, dortsaleko edo organismo bentonikoei asoziatutako itsas-bakterioen aktibitate entzimatiakoak aztertu direlako. Entzima estremofiloak oso egokiak dira prozesu bioteknologikoetarako, ukaezina baita muturretako baldintzetan bizi ohi diren bakterioen entzimak oso egokiak direla hainbat prozesutarako (adibidez entzima psikrofiloak garbigarrietarako). Zentzu honetan, lan honetan bilatu diren entzimak interesgarriak izan daitezke itsas-bakterioak elikagaien kontzentrazio baxuetako eta gatz kontzentrazio altuetako gune hotzetan substratuak degradatzeko gaitasuna dutelako. Horregatik hauen garrantzia nabarmentzea garrantzitsua da, are gehiago hauei buruzko informazio gutxi egonik.

11,5 eta 30°C-ko temperatura-tartean entzima estrazelularrak ekoizteko gai diren hainbat itsas-bakterio detektatu dira bost kultura-medio bereizgarrietan. Entzima hauen erabilera bioteknologikoa determinatu ahal izateko, hauei dagozkien substratua degradatzeko baldintzak, entzimen aktibitate-maila eta entzimen sintesirako baldintza egokienak determinatzea oso interesgarria izango litzateke.

6. ONDORIOAK

- 2015eko OSDan Ekialdeko Kantauri itsasoko kostaldeko gainazaletik ezaugarri makroskopiko (kolonien forma, kolorea, tamaina...) eta mikroskopiko (koko eta bazilo, Gram positibo eta negatiboak) desberdineko 21 itsas-bakterio 3 agarretan (ZoBell, R2A eta IUA) isolatu eta kulturatu dira, kulturagarritasun handiena ZoBell agarrak aurkeztu duelarik.
- Ekialdeko Kantauri itsasoko bakterioplanktona iturri interesgarria da bioteknologian erabili daitezkeen entzimak bilatzeko, bertatik isolatu diren itsas-bakterioen erdiak gutxienez DNAsa eta fosfatasa aktibitatea duelako eta bostenak amilasa eta kaseinasa. Zelulasa aktibitatea, ordea, isolatu bakarrak (CM 35ak) izan du.

- Ekialdeko Kantauri itsasotik isolatutako itsas-bakterioen artean, CM 572 amilasa, CM 35 zelulasa, CM 527 kaseinasa, CM 583 DNAsa eta CM 557-2 fosfatasa entzimen produktore interesgarriak izan daitezke aktibitate handia azaldu dutelako eta kultura-medio desberdinetan (ZoBell, R2A eta IUA, baita kultura-medio bereizgarrietan ere) kulturatu direlako.

7. BIBLIOGRAFIA

- Alain, K., Querellou, J.** (2009). Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. *Extremophiles*. 13:583-594.
- Brown, A.** (2007). *Bensons's Microbiological Applications: Laboratory Manual in General Microbiology* (10th edition).
- Cristóbal, H.A., López, M.A., Kothe, E., Abate, C.M.** (2011). Diversity of protease-producing marine bacteria from sub-antarctic environments. *Journal of Basic Microbiology*. 51:590-600.
- Cristóbal, H.A., Benito, J., Lovrich, G.A., Abate, C.M.** (2015). Phylogenetic and enzymatic characterization of psychophilic and psychrotolerant marine bacteria belong to γ -Proteobacteria group isolated from the sub-Antarctic Beagle Channel, Argentina. *Folia Microbiol.* 60:183-198.
- De Santi, C., Altermark, B., de Pascale, D., Willassen, N.P.** (2016). Bioprospecting around Arctic islands: Marine bacteria as rich source of biocatalysts. *Journal of Basic Microbiology*. 56:238-253.
- Gavrilescu, M., Chisti, Y.** (2005). Biotechnology –a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnology Advances*. 23:471-499.
- Gupta, P., Samant, K., Sahu, A.** (2012). Isolation of Cellulose-Degrading Bacteria and Determination of Their Cellulosolytic Potential. *International Journal of Microbiology*. doi:10.1155/2012/578925
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, VK., Chauhan, B.** (2003). Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*. 38:1599-1616.

- Hardoim**, C.C.P., Cardinale, M., Cúcio, A.C.B., Esteves, A.I.S., Berg, G., Xavier, J.R., Cox, C.J., Costa, R. (2014). Effects of sample handling and cultivation bias on the specificity of bacterial communities in keratose marine sponges. *Frontiers in microbiology*. 5:611.
- Hobbie**, J.E., Daley, R.J., and Jasper, S. (1977) Use of Nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl Environ Microbiol* 33:1225–1228.
- Hoppe**, H.G. (2003). Phosphatase activity in the sea. *Hydrobiologia*. 493:187-200.
- Hubálek**, Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*. 46:205-229.
- Joint**, I., Mühling, M., Querellou, J.(2010). Culturing marine bacteria- an essential prerequisite for biodiscovery. *Microbial Biotechnology*. 3:564-575.
- Kasana**, R.C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., Gulati, A. (2008). A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. *Curr Microbiol*. 57:503-507.
- Kirk**, O., Borchert, TV., Fuglsang, CC. (2002). Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol*. 13:345-351.
- Kopf** et al. (2015). The ocean sampling day consortium. *GigaScience*. 4:27
- Kuhad**, RC., Gupta, R., Singh, A. (2011). Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Research*. doi:10.4061/2011/280696
- Lo Giudice**, A., Caruso, C., Mangano, S., Bruni, V., De Domenico, M., Michaud, L. (2012). Marine Bacterioplankton Diversity and Community Composition in an Antarctic Coastal Environment. *Microbiology of Aquatic Systems*. 63:210-223.
- Luo**, H., Benner, R., Long, R.A., Hu, J. (2009). Subcellular localization of marine bacterial alkaline phosphatases. *PNAS*. 50:21219-21223.
- MacFaddin**, J.F. (2003). Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica, 3ª edición. Editorial Médica Panamericana S.A., Buenos Aires.
- Madigan**, M., Martinko, J., Parker, J. (2003). *Biología de los Microorganismos*. Brock, 10ª edición. Pearson Educación, Madrid.

- Morris, R.M., Rappé, M.S., Connon, S.A., Vergin, K.L., Siebold, W.A., Carlson, C.A., and Giovannoni, S.J. (2002)** SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature*. 420:806–810.
- Mullis, K.B. (1983).** The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 262:56-65.
- Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Pfaller, M.A. (2007).** Manual of Clinical Microbiology, 9^a edición. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Pommier, T., Canback, B., Riemann, L., Bostrom, K.H., Simu, K., Lundberg, P., Tunlid, A., Hagström, A. (2007)** Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton. *Mol Ecol*. 16:867-880.
- Rittle, L., Perbal, B. (2008).** Enzymes used in molecular biology: a useful guide. *J. Cell Commun. Signal*. 2:25-45.
- Schweder, T., Lindequist, U., Lalk, M. (2005).** Screening for new metabolites from marine microorganisms. *Marine Biotechnology I*. Scheper, T. (ed). Berlin, Germany: Springer, pp.1-48.
- Smith, P.B., Hancock, G.A., Rhoden, D.L. (1969).** Improved Medium for Detecting Deoxyribonuclease-Producing Bacteria. *Applied Microbiology*. 18:991-994.
- Staley, J.T., Konoka, A. (1985).** Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol*. 39:321-46.
- Stevenson, B.S., Eichorst, S.A., Wertz, J.T., Schmidt, T.M., Breznak, J.A. (2004).** New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbe. *Appl Environ Microbiol*. 70:4748-4755.
- Tanghe, A., Van Dijck, P., Thevelein, J.M. (2003).** Determinants of freeze tolerance in microorganisms, physiological importance, and biotechnological applications. *Adv Appl Microbiol*. 53:129-176.
- Zengler, K., Toledo, C., Rappe, M., Elkins, J., Mathur, E.J., Short, J.M., Keller, M. (2002).** Cultivating the uncultured. *Proc Natl Acad Sci*. 99:15681-15686.

1. ERANSKINA

OSD15eko 15 eta aurretik isolatutako 6 itsas-bakterioak isolatu eta kulturatzeko erabili ziren ZoBell (**9 Taula**), R2A (**10 Taula**) eta IUA (**11 Taula**) kultura-medioen konposizioa eta prestaketa.

9 Taula. ZoBell Agarraren konposizioa.

Itsas Agarra/ZoBell (AppliChem Panreac: 414680.1210)			
Azido borikoa	0,022 g	Potasio kloruroa	0,55 g
Amonio nitratoa	0,0016 g	Sodio kloruroa	19,4 g
Kaltzio kloruroa	1,8 g	Sodio fluoruroa	0,0024 g
Estrontzio kloruroa	0,034 g	Sodio bikarbonatoa	0,16 g
Legami aterakina	1 g	Hidrogeno di-sodio fosfatoa	0,008 g
Burdin zitratoa	0,1 g	Sodio silikatoa	0,004 g
Magnesio kloruroa	8,8 g	Sodio sulfatoa	3,24 g
Gatz biliarra (nº3)	5 g	Agarra	15 g
Potasio bromuroa	0,08 g	Ur destilatua	1 L

Prestaketa: 55,1 g disolbatu 1 L ur destilatutan. Disoluzioa irakin eta 121 °C-tan esterilizatu 15 minutuz.

10 Taula. R2A Agarraren konposizioa.

Agar R2A (Difco: 218263)			
Legami aterakina	0,5 g	Almidoi disolbagarria	0,5 g
Peptona proteosa nº3	0,5 g	Pirubato sodikoa	0,3 g
Kasaminoazidoak	0,5 g	Dipotasio fosfatoa	0,3 g
Dextrosa	0,5 g	Magnesio disulfatoa	0,05 g
Agarra	15 g	Ur destilatua	1 L

Prestaketa: 18,2 g disolbatu 1 L ur destilatutan. Irakin eta 121 °C-tan esterilizatu 15 minutuz.

11 Taula. Itsas Ur Artifiziala (IUA) kultura-medioaren konposizioa.

Agar IUA			
NH ₄ Cl (10 mM)	100 µL	B12 bitamina (500 mg/L)	100 µL
KH ₂ PO ₄ (1 mM)	100 µL	Bitaminak	100 µL
AHL (1 mM)	1 mL	(8 mg p-aminobenzoiko, 2 mg D-biotina, 10 mg pantotenato kaltziko, 20 mg tiamina y 20 mg azido nikotiniko 20 mL miliQ-ko)	
L-Met (1 mM)	100 µL	Konposatu organikoak 1%	1 mL
Agar bakteriologikoa	15g	(0,4 g N-azetilglukosamina, 0,4 g D-glukosa, 0,4 g D-erribosa, 800 µL etanol, 800 µL glizerol, 0,4 g azido sukziniko, 0,4 g pirubiko, 0,4 g 20 aminoazidoren nahasketa 40 mL miliQ-ko)	
Itsasoko ura (0,2 µm filtratuta eta autoklabatuta)	1L		

Prestaketa:

- 20 ml-ko NH₄Cl disoluzioa (10 mM): 10,7 mg/20 ml ur destilatutan. Autoklabean esterilizatu (121°C 15 min)
- 20 ml-ko KH₂PO₄ disoluzioa (1 mM): 2,72 mg/20 ml ur destilatutan. Autoklabean esterilizatu (121°C 15 min)
- 20 ml-ko L-Met disoluzioa (1 mM): 2,98 mg/20 ml ur destilatutan. 0,2 µm-ko filtrotik iragazi.
- 20 ml-ko AHL disoluzioa (1 mM): 3,985 mg hexanoil homoserina laktona + 5,67 mg dodekanoil homoserina laktona 20 ml azetato etilotan + 20 µl azido azetiko.
- 20 ml-ko B12 bitamina disoluzioa (500 mg/l): 10 mg/20 ml ur destilatutan. 0,2 µm-ko filtrotik iragazi.
- 20 ml-ko bitamina disoluzioa: 8 mg p-aminobentzoiko + 2 mg D-biotina + 10 mg kaltzio pantotenatoa + 20 mg tiamina + 20 mg azido nikotiniko/20 ml ur destilatutan. 0,2 µm-ko filtrotik iragazi.
- 20 ml-ko konposatu organikoen disoluzioa (1%): 0,2 g N-acetylglucosamine + 0,2 g D-glukosa + 0,2 g D-erribosa + 0,2 g azido sukziniko + 0,2 g azido pirubiko + 0,2 g aminoazido nahasketa (20 aa) + 400 µl glizerol + 400 µl etanol/20 ml ur destilatutan. 0,2 µm-ko filtrotik iragazi.

2. ERANSKINA

Amilasa, zelulasa, kaseinasa, DNAsa eta fosfatasa aktibitateak hurrengo kultura-medio bereizgarrietan detektatu ziren: almidoi agarra (**12 Taula**), CMC (karboximetilzelulosa) agarra (**13 Taula**), Esne gaingabetu agarra (**14 Taula**), DNAsa agarra (**15 Taula**) eta PDP (fenolftaleina difosfato) agarra (**16 Taula**), hurrenez hurren.

12 Taula. Almidoi agarraren konposizioa.

Almidoi agarra (Difco: 272100)	
Behi haragi aterakina	3 g/L
Almidoi solugarria	10 g/L
Agarra	12 g/L

Hauts nahasketaren 25 g 1L ur distilatutan disolbatu eta irakin irabiatuz. 121°C-tan esterilizatu 15 minutuz. Petri plaketan banatu.

13 Taula. CMC agarraren konposizioa.

CMC (karboximetilzelulosa) agarra			
NaNO ₃	2 g/L	NaCl	19,45 g/L
K ₂ HPO ₄	1 g/L	CMC (Karboximetilzelulosa)	2 g/L
MgSO ₄	0,5 g/L	Haragi peptona	0,2 g/L
KCl	0,5 g/L	Agar bakteriologikoa	17 g/L

Osagaiak 1 L ur distilatutan disolbatu eta irakin (irabiatuz). 121°C-tan esterilizatu 15 minutuz. Petri plaketan banatu.

14 Taula. Esne gaingabetu agarraren konposizioa.

Agar Elikagarria (AppliChem Panreac: 413792.1210)		Esne gaingabetua	%50 (v/v)
%50 (v/v)			
Haragi aterakina	3 g/L		
Peptona gelatina	5 g/L		
Agarra	15 g/L		

11,5 g Agar Elikagarri 500 mL ur distilatutan disolbatu, irakin (irabiatuz) eta 121°C-tan esterilizatu 15 minutuz. Apur bat hoztu ostean, 500 mL esne gaingabetu gehitu eta Petri plaketan banatu.

15 Taula. DNAsa agar eraldatuaren konposizioa.

DNAsa agarra (Oxoid: CM0321)		Gehigarria	
Triptosa	20 g/L	Metilo berdea	0,05 g/L
NaCl	5 g/L		
Azido desoxierribonukleikoa	2 g/L		
Agarra	12 g/L		

39 g 1 L ur destilatutan disolbatu eta 0,05 g metilo berde gehitu. Nahastea irakin (irabiatuz) eta 121°C-tan esterilizatu 15 minutuz. Petri plaketan banatu.

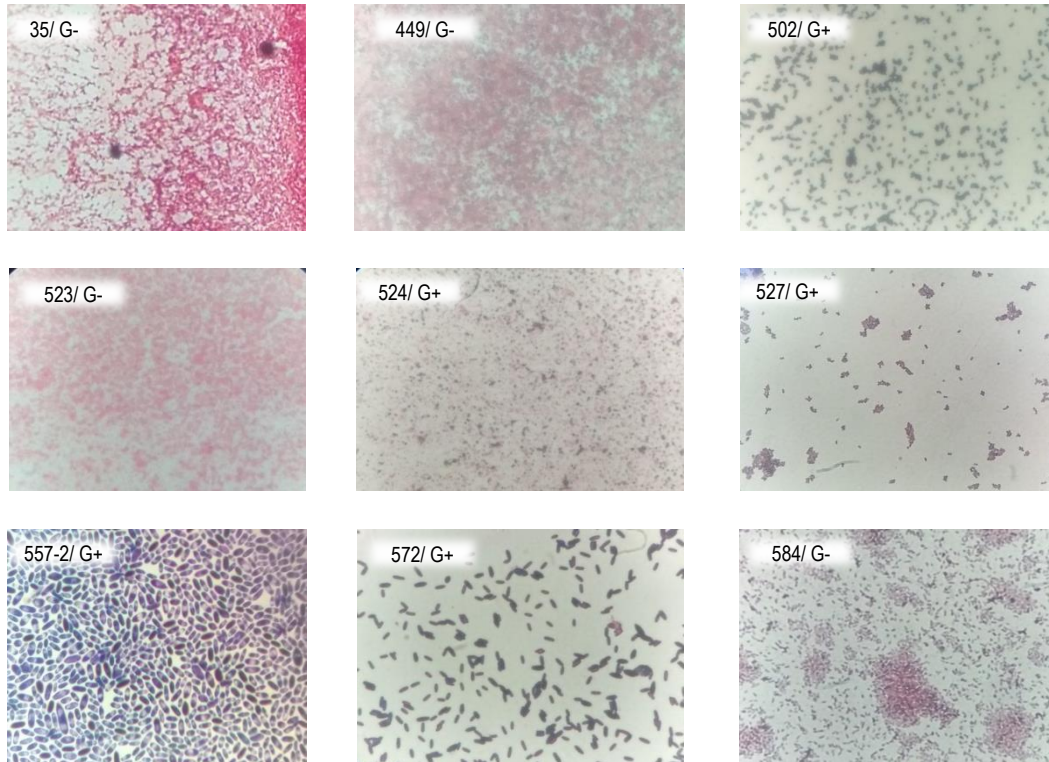
16 Taula. PDP agarraren konposizioa.

PDP (Fenolftaleina difosfato) agarra			
Haragi aterakina	3 g	PDP soluzioa	
Haragi peptona	5 g	PDP (fenolftaleina difosfatoa)	4 g
NaCl	8 g	Ur destilatu esterila	50 ml
Agar bakteriologikoa	15 g		
Ur destilatua	1 L		

Haragi aterakina, peptona, sodio kloruroa eta agarra 100 ml ur destilatutan disolbatu. Nahasketa irakin eta 121°C-tan 15 minutuz esterilizatu. Beste alde batetik PDP soluzioa prestatu eta 0,2 µm-ko iragazkiarekin esterilizatu. Azkenik, agar nahastea 37°C-tara hoztu ostean 1 ml PDP soluzio gehitu, nahastu eta Petri plaketan banatu.

3. ERANSKINA

Gram tindaketa burutu zen bakterioen morfologia (bazilo, koko...) eta paretaren peptidoglikanozko geruzaren lodiera (Gram positiboa edo negatiboa) determinatzeko **(9 Irudia)**.



9 Irudia. Bakterioen argazki mikroskopikoa (x1.000). Gram positiboak (G+) eta negatiboak (G-) bereizten dira eta kasu batzuetan zelulen formak ere ikusten dira. CM 35 eta CM 449 bazilo Gram negatiboak, CM 502 kokobazilo Gram positiboa, CM 523 koko Gram negatiboa, CM 524 eta CM 527 koko Gram positiboak, CM 557-2 eta CM 572 bazilo Gram positiboak eta CM 584 bazilo Gram negatiboa dira.