



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología

BIOLOGIAKO GRADUA

GRADU AMAIERAKO LANA

EKIALDEKO KANTAURIAR ITSASOKO KOSTALDEKO BAKTERIOEN ISOLAMENDUA ETA KONTSERBAZIOA

Irati Llorente Guerrero

Leioa, 2013ko uztaila

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

EKIALDEKO KANTAURIAR ITSASOKO KOSTALDEKO BAKTERIOEN ISOLAMENDUA ETA KONTSERBAZIOA

LABURPENA

Itsasoko mikroorganismoak baldintza mugatu batzuen pean bizi dira: argia, tenperatura eta elikagaien kontzentrazio zehatzak besteak beste. Laborategian bakterio hauen hazkuntza eta isolaketa lortzea oso zaila denez, aurretratamendu eta kultura-medio egokiak erabiltzea ezinbestekoak dira. Lan honetan Ekialdeko Kantauriar Itsasoko kostaldeko bakterioen kultura eta isolamendua burutu dira aurretratamendu desberdinen ondoren (flagelatuen presentzia edo eza eta polimero edo monomeroen nahasketaren gehiketa ala ez) kultura-medio ezberdinetan (Zobell agarra eta Sea Water agarra). Isolatutako bakterioak kontserbatzeko laborategiko bilduman -80°C -ko izozketaren bidez gorde dira. Honetaz gain, itsas bakterioen inguruko ezaugarrien ezagumendua handitzeko nahian, laborategiko bakterioen bildumatik 15 bakterioen karakterizazio makroskopikoa (kolonien deskribapena), mikroskopikoa (Gram tindaketa), eta fisiologikoa (kaseinasa, β -D-galaktosidasa eta D-glukuronidasa aktibitateak, fluoreszentiaren igorpena, laktosaren hartzidura eta antibiotikoen ekoizpena) egin dira.

ABSTRACT

Marine microorganisms live under defined conditions, for example, light, temperature and specified concentration of nutrients. The use of an appropriate treatment and a suitable culture medium is essential to promoted the growth and isolation of coastal marine bacteria. The purpose of the present study is to cultivate and isolate East Cantabrian Sea coastal microbial species using different treatments (with and without nanoflagellates and adding or not a mixture of polymers and monomers) in different culture mediums (Zobell Marine agar and Sea Water agar). The isolated bacteria have been stored in freezers at -80°C in the laboratory collection. Furthermore, with the aim of increasing knowledge of microbial characteristics, 15 bacteria taken of the laboratory collection have been characterized macroscopically (bacterial colony description) microscopically (Gram stain) and physiologically (caseinase, β -D-Galactosidase and D-Glucuronidase activities, fluorescence emission, lactose fermentation and production of antibiotics).

SARRERA

Itsasoan dauden mikroorganismoen dentsitatearen eta aniztasunaren estimazioak eztabaida nagusia izan du urte askotan zehar. Ekosistema ezberdinek, itsasoa esaterako, aniztasun handia barneratzen dute. Hala ere, gai honen inguruan ezagumendu gutxi dago oraindik ere. Itsasoan aurkitzen den dibertsitatea hainbat faktoreren araberakoa izan daiteke. Alde batetik, zenbat eta ur sakonagoetan aurkitu, organismoen presentzia txikiagotu egiten da, eta leku batzuetan bizitza guztiz desagertu egin daiteke. Beste faktore abiotiko eragile batzuk argia, tenperatura edo elikagai ezberdinen kontzentrazioa izango lirateke. Bestalde faktore biotikoak daude, itsasoko beste organismoen harraparitzak edo lisi birikoak eragin ditzakete mikroorganismoengan. Faktore hauen guztien eraginez mikroorganismo talde bakoitzak banapen zehatz bat aurkeztuko du, adibidez; zonalde fotikoan zianobakterioak (*Synechococcus*, *Prochlorococcus*) eta γ -Proteobakterioak (*Vibrionaceae*, *Pseudoalteromonas*, *Oceanospirillum*) nagusi dira; kostaldeetan berriz, β -Proteobakterioak (Schmidt eta Schaechter, 2009).

Itsas bioaniztasunaz hitz egiten dugunean, itsasoan edo leku zehatz batetan dagoen informazio genetiko osoari egiten zaio erreferentzia. Aniztasuna berriz, itsasoan une zehatz batean aktiboak eta ugariak diren izakiak dira. Bi definizio hauek esanahi biologiko handia daukate. Magurranek eta Hendersonek 2003an estuario bateko arrainen ikerketan bi espezie mota desberdindu zituzten; alde batetik, urtero aurkitzen zirenak eta ugariak zirenak, eta bai karbonoaren zikloan zein energia-fluxuan parte hartzen zutenak; eta bestetik, urtero aurkitzen ez zirenak eta hain ugariak ez zirenak. Ideia hau itsasoko mikroorganismoetan aplikatu daiteke. Orokorrean itsasoan bi espezie mota aurkitzen dira: izaki ugariak eta izaki eskasak. Izaki ugariak urtero agertzen dira, ekosisteman ondo moldatuta daude eta karbono eta energia-fluxuen arduradunak dira. Harraparitza eta lisi birikoak jasaten dituzte. Izaki eskasak edo arraroak berriz, tolerantzia tarte batzuen barruan bizi dira eta denboran zehar agertu eta desagertu egiten dira. Tamaina txikikoak izanda erraz sakabanatzen dira, eta horrexegatik migrazio tasa altuak daukate. Mikroorganismo arraroak direnez, harraparitza eta lisi birikotik babestuta daude birusak ugariak diren espezieetan baitute haien eragin nagusia. Harraparitzaren eragina izaki arraroetan ere txikia izaten da eta galerak ez dira hain handiak izaten (Pedrós-Alió, 2006).

Ozeanoetako mikroorganismoen informazio gehiena kultibo puruetatik lortu arren, ezezaguna den dibertsitatea teknika molekularren bidez, batez ere klonazio eta sekuentziazioaren bidez, ikertzen ari da. Estimazioak klonen bildumetan oinarritu izan dira baina ikuspuntu hau ez da nahikoa naturaren dibertsitate guztia jasotzeko. Itsasoko aniztasunari dagokion estimazioak 30 taxoitik 100.000.000 taxoitara izan da (Pedrós-Alió, 2006).

1. taula: Sistema ezberdinetan kultibatutako bakterioen portzentajea.

Ozeanoetako dibertsitatearen eztabaidarekin batera, mikroorganismoak isolatzeko zailtasuna handia da. Kultibatutako ur gazitako bakterioen portzentajea %0,001-0,1 tartean dago (**1. taula**). Gainontzeko ekosistemekin konparatuta itsasoa da kultibatutako mikroorganismoen portzentaje baxueneko tokia (Amman *et al.*, 1995).

| Sistema | Kultibatutako % |
|-------------------|-----------------|
| Ur gazia | 0.001-0.1 |
| Ur geza | 0.25 |
| Laku mesotrofikoa | 0.1-1 |
| Estuarioa | 0.1-3 |
| Lohi aktibatuak | 1-15 |
| Sedimentuak | 0.25 |
| Lurra | 0.3 |

Organismo txikien identifikazioaren arazo nagusienetarikoa bat tresna berezien erabilera da. Mikroskopia ezinbestekoa da mikroorganismoen behaketarako. Mikroskopiaan ikusten diren zelulen gehiengoa bideragarriak izaten badira baina Petri-kutxetan ez dute koloniarik sortzen. Kultibagarriak ez diren bakterioen barruan bi zelula mota aurki daitezke: alde batetik, ezagunak diren espezieak, baldintza desegokiengatik edo egoera ez kultibagarri batean sartzeagatik hazten ez direnak; eta bestetik, ezezagunak diren espezieak eta inoiz kultibatu ez direnak metodo egokiak aurkitu ez direlako (Amman *et al.*, 1995).

Bakterio kultibaezinek sorturiko arazoa konpontzeko rRNAREN analisiak egiten hasi ziren. Lehenengo azterketa filogenetikoak 5S rRNAREN elektroforesiaren bidez egin ziren. Baina ekologia mikrobiarraren azterketa egokirako rRNA molekula handiagoak erabili behar dira, horrexegatik 16S rRNA (1500 nukleotido) eta 23S rRNA (3000 nukleotido) erabiltzen hasi ziren. Ikerketa filogenetikoekin batera aurkikuntza berriak egin dira, eta honek bide metabolikoen ulermena baimentzen du. Orain dela gutxi itsas fotoheterotrofoen aurkikuntzak esaterako, karbono eta energia-fluxuaren inguruko azterketa berriak planteatzen ditu. Horrez gain, ezezagunak

diren mikrobio asko genetikoki erabilgarriak izan daitezke medikuntzan eta bioteknologian. Azkenik, mikrobioen dibertsitatearen ezagumendua beharrezkoa da eboluzioa berreraikitzeke (Pedrós-Alió, 2006).

Mikroorganismoak isolatzerakoan kultibo medio artifizial bat sortzeko karbono disolbatuaren konposizioa kontutan hartu behar da. Laborategian egindako ikerketetan kultibo medioek karbono disolbatuaren kontzentrazio altua izaten dute (Giovannoni eta Sting, 2007). Azken urteetan kultiboaren garrantzia alde batera utzi da eta analisi molekularrek nagusitasuna hartu dute. Hala ere, ikerlari batzuk kultibo medioen ikerketan aritu dira, Stephen Giovannoni ikerlariak adibidez, errendimendu altuko kultibo medioekin lan eginez. Bere ikerketaren gai nagusi bat SAR11 α -Proteobakterioen taldea izan da. Itsas heterotrofoa hauek planetaren organismo ugarienetarikoak dira eta funtzio garrantzitsua betetzen dute elikagai ezberdinen zikloan. SAR11 kladoko taldekide bat, *Pelagibacter ubique*, kultibo puruan haztea lortu zen duela 10 urte itsas-ur medio natural batean (Giovannoni *et al.*, 1990). Talde honek Ozeano Atlantikoko Sargasso Itsasoan dagoen rRNA prokariotikoaren %15a osatzen du. *P. ubique*-k kultibatutako bakterio asketatik genoma txikiena du eta bizitza askeko organismoa izanda oso gene kodetzaile gutxi ditu. Genoma erreduzitua duten mikroorganismo askok G:C proportzio txikia dute A:T proportzioarekiko. Egoera honek hautespen selektiboaren aurreko abantaila suposa dezake, izan ere, DNAREN sintesian nitrogenoaren eskaria txikitu egiten da. Nitrogenoa eta fosforoa proportzionalki garrantzitsuak dira DNAREN sintesian baina itsas uretan nahiko murrizak dira. Genoma txikia izan arren, *P. ubique*-k baditu α -Proteobakterio baten oinarritzko funtzio guztiak. Metabolismoa, mugikortasuna edo egitura eta funtzioekin loturiko gene gutxi dauzka. Karotenoide, erretina edo proteorodopsina kodetzen duten geneak, berriz, bai agertzen dira. *P. ubique*-k kodetu egiten du argiaren menpekoea den protoi ponpa bat: bakteriorodopsina. Proteina honen sintesia garrantzitsua izan daiteke argiaren presentzian energia lortzen delako karbono gutxi dagoenean (Giovannoni *et al.*, 2005).

Laborategian kultibatutako beste α -Proteobakterio talde bat *Roseobacter* generoa da. Medio aberatsetan ondo hazten dira eta ekosistema ezberdinetan aurki daitezke, hala nola, planktona, sedimentuak, izotza edo beste organismoen azalean. Bakterioplankton komunitateen %30a osa dezake eta itsaso zabaleko komunitateen %10a (Buchan *et al.*, 2009). Bestalde, laborategian oraindik kultibatu ez diren taldeak daude. Itsas γ -Proteobakterioen klusterraren barruan SAR86 taldea dago. Kostaldeetan oso ugariak dira eta itsasoko sakonera, urtaro eta elikagai motaren arabera talde honen genero ezberdinak aurkituko dira. Kasu batzuetan proteorodopsina kodetzen duten geneak egongo dira (Schmidt eta Schaechter, 2009).

Esan bezala, laborategian bakterioen hazkuntza lortzeko zailtasunak dituen arren, lan honetan hainbat helburu lortu nahi dira.

- Ekialdeko Kantauriar itsasoko kostaldeko bakterioen isolamendua burutzea teknika desberdinen bidez.
- Isolatutako bakterioak laborategiko bilduman gordetzea.
- Isolatutako bakterio batzuen karakterizazioa burutzea.

MATERIAL ETA METODOAK

Itsas bakterioen isolamendu saioa aurretik hasita zegoen eta laborategiko bilduman 429 bakterio gordeta zeuden. Bilduma hau jarraituta 60 bakterioen isolaketa burutu zen, baita bilduman gordeta zeuden bakterio batzuen karakterizazioa ere.

BAKTERIOEN ISOLAMENDUA

LAGINKETA

Itsas ur laginak 2013ko martxoaren 15ean, Armintzan (Bizkaiko Golkoa, Espainia), kostaldetik 1,5 millara hartu ziren, 0,5 m-tako sakoneran polipropilenoazko kubo batekin. Kuboa eta laginak jasotzen diren bidioiak aurretik garbitu ziren (%1) azido klorhidriko-soluzioarekin. Laginak jaso ondoren bidioiak iluntasunean eta izotzetan mantendu ziren dagokien analisiak egin arte. Laginak 100 µm-tako sare batetik iragazten dira makroorganismo batzuk (fitoplanktona eta zooplanktona) kentzeko.

MIKROKOSMOSEN PRESTAKETA ETA INKUBAZIOA

Mikrokosmosen prestaketa egiteko bi tratamendu erabili ziren bakterio ezberdinen hazkuntza potentziatzeko. Lehenengo tratamenduan nanoflagelatu heterotrofo (NFH) gehienen kentzea burutu zen harrarapitza-presioa txikitzeko. Horretarako itsas ura 3 µm-tako polikarbonatozko iragazki batetik iragazi zen behin, eta 0,8 µm-tako iragazkitik birritan. Bigarren tratamenduan bi substratu ezberdin gehitu ziren; substratu polimerikoak, pisu molekular handiko substratuak degradatzeko gai diren bakterioen hazkuntza bultzatzeko, eta substratu monomerikoak, halako substratuak erabiltzeko gai diren hazkuntza potentziatzeko. Substratu gabeko lagina kontrol modura erabili zen. Azkenik, tratamendu guztiei elikagai inorganikoen osagarri bat gehitu zitzaien: 1 µM NH₄ eta 0.1 µM KH₂PO₄. Substratuen konposaketa kimikoa **2. taulan** ikus daiteke.

2. taula: Substratu polimeriko eta monomerikoen konposaketa.

Beste mikrokosmosetan ez zen nanoflagelatu heterotrofoen (NFH) kenketarik burutu. Itsas ura 3 µm-tako polikarbonatozko iragazki batetik iragazi zen

| Substratu polimerikoak | Substratu monomerikoak |
|---------------------------|---------------------------|
| Behi serum albumina (BSA) | 20 aminoazidoen nahasketa |
| Laminarina | Azetatoa |
| Almidoia | Pirubatoa |
| | Sukzinatoa |
| | Glukosa |

ziliatuak kentzeko. Kasu honetan ere aurreko prozedura jarraitu zen, substratu polimerikoak eta monomerikoak gehituz, eta substratu gabeko lagina kontrol modura erabiliz. Hauei ere elikagai inorganikoen osagarri bat gehitu zitzaien: 1 µM NH₄ eta 0.1 µM KH₂PO₄.

Mikrokosmoak prestatu ondoren *in situ* tenperaturan (11, 5°C) eta iluntasunean inkubatu ziren.

Beraz 6 mikrokosmos desberdin lortu ziren:

- 1) + NFH/ Kontrola
- 2) + NFH/ +Polimeroak
- 3) + NFH/ + Monomeroak
- 4) – NFH/ Kontrola
- 5) – NFH/ + Polimeroak
- 6) – NFH/ + Monomeroak

BAKTERIOEN DENTSITATEA

Bakterioak isolatzerakoan azpi-laginak hartu ziren bakterioen dentsitate altueneko uneetan. Honetarako lehendabizi bakterio guztien dentsitatea kuantifikatu behar izan genuen inkubazioan zehar. Behin ueña finkatu, bakterio kulturagarrien kuantifikazioa egin genuen isolamenduak egin baino lehen.

- **Bakterio guztien dentsitatearen kuantifikazioa**

Bakterioen dentsitatea neurtzeko Porter eta Feig 1980an proposatutako metodoa erabili zen. Mikrokosmos bakoitzeko 1 ml hartu zen eta 70 µl DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) gehitu zitzairen. Iluntasunean 10 minutuz inkubatu ondoren 0,2 µm-ko polikarbonatozko iragazkinaz iragazi ziren. DAPI tindatzaileak DNA tindatu egiten du eta 330-380 nm-tako ultramore izpien kitzikapenaren ondorioz fluoreszentzia igortzen du. Era honetan bakterioen zenbaketa burutu zen epifluoreszentzia mikroskopioaz. Azpilaginak diluitu egin ziren beharrezkoan izanda eremuko 20 eta 30 bakterio tartean izateko. Azarez 20 eremu aukeratu ziren eta eremuko bakterioen zenbaketa egin zen.

- **Bakterio kultibagarrien dentsitatearen kuantifikazioa**

Bakterioen dentsitate maximoa lortu zenean azpilaginak hartu ziren bakterio kultibagarrien dentsitateak kuantifikatzeko. Kulturagarritasunarako bi kultura-medio desberdin erabili ziren: Zobell agarra eta Sea Water agarra.

3. taula: Zobell agarraren konposaketa kimikoa eta konposatu bakoitzaren kantitatea g/L-ko.

Zobell agarraren prestaketa: Bere konposaketa **3. taulan** ikus daiteke. Ur litro bat prestatzeko 55,1 gr Zobell agar (Panreac 414680.1210) pisatzen dira. Likidoa ondo astindu eta berotu egiten da irakin arte. Minutu batez irakiten uzten da. Autoklabatu 121°C-ra 15 minutuz eta agarra Petri-kutxa esteriletan banatu egiten da (20 ml bana).

| Konposaketa | Kantitatea (g/L) |
|----------------------------|------------------|
| Azido borikoa | 0,022 |
| Amonio nitratoa | 0,0016 |
| Kaltzio kloruroa | 1,8 |
| Estrontzio kloruroa | 0,034 |
| Legamia-estraktua | 1,0 |
| Burdin zitratoa | 0,1 |
| Magnesio kloruroa | 8,8 |
| Peptona | 5,0 |
| Potasio bromuroa | 0,08 |
| Potasio kloruroa | 0,55 |
| Sodio kloruroa | 19,4 |
| Sodio fluoruroa | 0,0024 |
| Sodio hidrogeno karbonatoa | 0,16 |
| Di-sodio hidrogeno fosfata | 0,008 |
| Sodio silikatoa | 0,004 |
| Sodio sulfatoa | 3,24 |
| Agarra | 15,0 |

Sea Water agarraren prestaketa: Sea Water agarra Armintzako lagineko urarekin prestatu zen konposatu batzuk gehituz (**4. taula**). Konposatu bakoitza prezisio handiko balantzan pisatzen da eta dagokion milliQ urarekin disolbatu eta irabiaten da. Hauek dira soluzio bakoitzaren konposaketa eta prestaketak:

4. taula: Konposatu desberdinen soluzio bakoitzaren bolumena (ml), kontzentrazioa eta prestaketarako prozedura.

| | Bolumena | Kontzentrazioa | Prestaketa |
|---------------------------------------|-----------------|-----------------------|---|
| NH₄Cl | 20 ml | 10 mM | 0,0107 gr NH ₄ Cl/ 20 ml milliQ ur Autoklabatu (121°C, 15 min) |
| KH₂PO₄ | 20 ml | 1 mM | 0,00272 gr KH ₂ PO ₄ / 20 ml milliQ ur Autoklabatu (121°C, 15 min) |
| L-Met | 20 ml | 1 mM | 0,00298 gr L-Met / 20 ml milliQ ur Iragazi 0,2 µm-tako iragazkitik (Teknokroma TR-200107) |
| Azil homoserina laktonak (AHL) | 20 ml | 1 mM | 0,004 g hexanoil + 0,006 g dodecanoil + 20 ml azetato etilo + 20 µl azido azetiko |
| B₁₂ Bitamina | 20 ml | 500 µg/L | 10 mg / 20 ml milliQ ur Iragazi 0,2 µm-tako iragazkitik (Teknokroma TR-200107) |
| Bitaminak | 20 ml | | 8 mg p-aminobenzoiko + 2 mg D-biotina + 10 mg kaltzio pantotenato + 20 mg tiamina + 20 mg azido nikotiniko Iragazi 0,2 µm-tako iragazkitik (Teknokroma TR-200107) |
| Konposatu Organikoak | 40 ml | %1 (1gr/100ml) | 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 sukzinato + 0,4 g pirubiko + 0,4 g 20 aa nahasketa/ 40 milliQ ur Iragazi 0,2 µm-tako iragazkitik (Teknokroma TR-200107) |

Sea water agarra prestatzeko itsas ura iragazi (3, 0,8 eta 0,2 µm) eta autoklabatzen (121°C 15 min) da. Itsas urari “agar bakteriologiko europearra” (Panreac 402302.1210) gehitzen zaio (15 gr/L). Likidua ondo astindu eta berotu egiten da irekin arte. Minutu batez irakiten uzten da. Autoklabatu egiten da 121°C-ra 15 minutuz. Botila autoklabetik atera ostean hozten uzten da eta honako osagaien soluzioak gehitzen zaizkie:

- 100 µl NH₄Cl (10 mM)
- 100 µl KH₂PO₄ (1 mM)
- 100 µl Met (1 mM)
- 1 ml AHL (1 mM)
- 100 µl B₁₂ Bitamina (500 µg/L)
- 100 µl Bitaminak
- 1 ml Konposatu organikoa (%1)

Likidua ondo astintzen da eta Petri-kutxa esteriletan banatu egiten da (20 ml bana).

Bakterio kulturagarrien zenbaketarako mikrokosmos bakoitzaren uraren diluzio hamartarrak egin ziren. Zobell agarrean 10⁻¹, 10⁻² eta 10⁻³-ko diluzioak erein ziren, eta Sea Water agarrean 10⁰, 10⁻¹ eta 10⁻²-ko diluzioak. Diluzio hauen 100 µl-ko bi erreplika erein egin ziren (R₁ eta R₂). Digradsky euskarria erabiliz lagina uniformeki sakabanatu ziren (Madigan *et al.*, 2006). Petri kutxak inkubazio-labeetan inkubatzen utzi ziren 11°C-tan eta 8 egun pasa ostean kolonien kontaketa burutu zen. Gerora, kolonia kulturagarrien dentsitatea eta portzentajeak kalkulatu ziren diluzio egokienak aukeratuta (30-300 kolonia tartekoa).

$$\text{Kolonía kulturagarrien portzentajea} = \frac{\text{Kolonía kulturagarrien dentsitatea (KUS/ml)}}{\text{Bakterioen dentsitate maximoa } \left(\frac{\text{bakterio}}{\text{ml}}\right)} \cdot 100$$

Kolonía kulturagarrien ezberdintasunen arteko esangarritasuna aztertzeko Student t froga estatistikoa erabili zen. Análisi estatistikoa egiteko SPSS Statistics 20.0 programa erabili zen.

BAKTERIOEN ISOLAMENDUA

Bakterioen isolamendurako bi metodologia desberdin erabili ziren. Alde batetik ildaska anizkoitzaren bidezko agortze-teknika (Madigan *et al.*, 2006) eta bestaldetik Connon eta Giovannoni 2002an proposaturiko metodoa (errendimendu altuko isolaketa-metodoa).

- **Ildaska anizkoitzaren bidezko agortze-teknika**

Isolaketa egokia burutzeko kolonia definituak eta isolatuak aukeratu ziren. Lehenik eta behin ereinketa-euskarriaugarrean esterilizatu zen. Gerora inokulua ereinketa-euskarriaz hartu eta Zobell edo Sea Water agarrean erein zen, hain zuzen ere, Petri kutxaren ertzeko azalera txikian. Ereinketa-euskarriaugarrean esterilizatu zen berriz ere, eta ereindutako zonalde berritik abiatuta 4 ildazka elkarzut erein ziren. Prozedura berdina hainbat aldiz errepikatu zen azal osoa erabili arte (Madigan *et al.*, 2006). Petri kutxak 11°C-tan inkubatzeko utzi ziren inkubagailuetan. Kondentsazio urik agarrean azalaren gainean ez erortzeko, Petri-kutxak buruz behera inkubatu ziren.

Metodo honen arabera, isolatu diren kolonietatik kultibo puruak lor daitezke. Hasierako ildasketan mikroorganismoaren hazkuntza masiboa gertatzen da, baina agarrean egindako azken ildasketan kolonia isolatuak lortzen dira (Madigan *et al.*, 2006). Kolonia isolatu hauetatik beste 3 isolaketa burutu ziren aurreko prozedura berdina jarraituz isolamendua egiaztatzeko. Zobell agarretik 6 isolamendu egin ziren mikrokosmos bakoitzeko (guztira 36 isolamendu), eta Sea Water agarretik 4 isolamendu (guztira 24 isolamendu).

- **Errendimendu altuko isolamendu-metodoa**

Komunitate naturalak diluitu egiten dira tutu bakoitzean zelula kopuru ezaguna lortzeko (1-10 zelula). Teknika honetan medio arrunteko elikagaien kontzentrazioa baino 3 aldiz txikiagoa izaten da. Gerora, fluxu zitometriaren bidez bakterioen kontaketa egiten da (Connon *et al.*, 2002).

Putzuen prestaketa: Putzuak prestatzeko Armintzako lagineko itsas uraren litro bat erabili zen. Ur hau 0,8 eta 0,2 µm-tik iragazi ondoren autoklabatu (121°C 15 minutu), eta Sea Water agarra egiteko erabili ziren konposatu berdinak (**4. taula**) gehitu zitzaion agarra izan ezik. Mikrokosmos bakoitzeko plaka bat egin zen (6 plaka guztira). Plaka bakoitzean 96 putzu daude (12 zutabe eta 8 ilara). 12. zutabea kontrola izango da, bertan 180 µl ur gehitzen dira. Gainontzeko zutabeetan laginak 10⁻⁴-ko diluzioetatik gehituko dira. Teknika honen arabera lehenengo lau ilaratan 2,5 zelula jarri nahi dira putzu bakoitzean, eta gainontzeko lau iletan 5 zelula. Horretarako mikrokosmos bakoitzaren bakterioen dentsitatea hartu zen kontutan. Dentsitateak kontuan hartuta, tratamendu bakoitzaren bolumen zehatz bat hartu zen eta milli Q ura gehitu zatzaion 180 µl izan arte. Hauek dira mikrokosmos bakoitzerako lortutako dentsitateak (**5. taula**):

5. taula: Mikrokosmos bakoitzaren bakterio dentsitate altuenetan bakterioen dentsitateak. Horrekin batera, 2,5 eta 5 zelula lortzeko hartu beharreko 10^{-4} diluzioaren lagin bolumena (μ l), baita 180 μ l lortzeko hartu beharreko itsas uraren bolumena (μ l).

| -NFH | +NFH |
|---|---|
| Kontrola | Kontrola |
| Dentsitatea: = $1,50 \cdot 10^6$ zelula/ml $1,50 \cdot 10^2$ zelula \rightarrow 1 ml (10^{-4} diluzioa) 2,5 zelula \rightarrow x ml $X = 0,0167$ ml = 16,7 μ l | Dentsitatea: = $1,65 \cdot 10^6$ zelula/ml $1,65 \cdot 10^2$ zelula \rightarrow 1ml (10^{-4} diluzioa) 2,5 zelula \rightarrow x ml $X = 0,01515$ ml = 15,15 μ l |
| 2,5 zelula = 16,5 μ l lagin + 163,5 μ l itsas ur 5 zelula = 33,5 μ l lagin + 146,5 μ l itsas ur | 2,5 zelula = 15 μ l lagin + 165 μ l itsas ur 5 zelula = 30 μ l lagin + 150 μ l itsas ur |
| Monomeroak | Monomeroak |
| Dentsitatea: = $2,16 \cdot 10^6$ zeelula/ml $2,16 \cdot 10^2$ zeelula \rightarrow 1 ml (10^{-4} diluzioa) 2,5 zel \rightarrow x ml $X = 0,0115$ ml = 11,5 μ l | Dentsitatea: = $1,80 \cdot 10^6$ zelula/ml $1,80 \cdot 10^2$ zelula \rightarrow 1ml (10^{-4} diluzioa) 2,5 zelula \rightarrow x ml $X = 0,01388$ ml = 13,8 μ l |
| 2,5 zelula = 11,5 μ l lagin + 168,5 μ l itsas ur 5 zelula = 23 μ l lagin + 157 μ l itsas ur | 2,5 zelula = 14 μ l lagin + 166 μ l itsas ur 5 zelula = 28 μ l lagin + 162 μ l itsas ur |
| Polimeroak | Polimeroak |
| Dentsitatea: = $1,78 \cdot 10^6$ zelula/ml $1,78 \cdot 10^2$ zelula \rightarrow 1ml (10^{-4} diluzioa) 2,5 zelula \rightarrow x ml $X = 0,01404$ ml = 14,04 μ l | Dentsitatea: = $1,78 \cdot 10^6$ zelula/ml $1,78 \cdot 10^2$ zelula \rightarrow 1ml (10^{-4} diluzioa) 2,5 zelula \rightarrow x ml $X = 0,01404$ ml = 14,04 μ l |
| 2,5 zelula = 14 μ l lagin + 166 μ l itsas ur 5 zelula = 28 μ l lagin + 152 μ l itsas ur | 2,5 zelula = 14 μ l lagin + 166 μ l itsas ur 5 zelula = 28 μ l lagin + 152 μ l itsas ur |

BAKTERIOEN KONTSERBAZIOA

Bakterioen kontserbazioa egiteko bakterioen isolamendua duen Petri-kutxa bakoitzari 10 ml itsas salda (Panreac 414698) gehitu zitzaion. Itsas salda plakan zehar barreiatu eta pipeta batekin hartutako salda 4 kriobialetan bete zen, bakoitza 1,8 ml-rekin. Kriobialak -80°C -ko izozkailuetan gorde ziren.

Kontserbazio-itsas saldaren prestaketa: Itsas saldaren konposaketa kimikoa **6. taulan** ikus daiteke. Ur litro batean 40 gr agar disolbatzen dira. Likidua ondo astintzen da eta pixkat berotu egiten da. Autoklabatu 121°C -ra 15 minutuz eta hozten uzten da. Itsas saldari %10 glizerol eta %7 dimetil sulfoxidoa gehitzen zaio. Bi konposatu hauek kriobabesle funtzioa daukate eta bakterioen kontserbazioan eraginkortasuna handitzen dute (Morales-García *et al.*, 2010).

BAKTERIOEN KARAKTERIZAZIOA

Bakterioen karakterizazioan; alde batetik, isolatutako 60 bakterioen karakterizazio makroskopikoa egin zen, eta bestetik, laborategiko itsas bakterioen bilduman jadanik zeuden 15 bakterioen karakterizazio makroskopiko, mikroskopiko eta fisiologikoa.

6. taula: Itsas saldaren konposaketa kimikoa eta konposatu bakoitzaren kantitatea g/L-ko.

| Konposaketa | Kantitatea (g/L) |
|-----------------------------|------------------|
| Azido borikoa | 0,022 |
| Amonio nitratoa | 0,0016 |
| Kaltzio kloruroa | 1,8 |
| Estrontzio kloruroa | 0,034 |
| Legamia-estraktua | 1,0 |
| Burdin zitratoa | 0,1 |
| Magnesio kloruroa | 8,8 |
| Peptona | 5,0 |
| Potasio bromuroa | 0,08 |
| Potasio kloruroa | 0,55 |
| Sodio kloruroa | 19,4 |
| Sodio fluoruroa | 0,0024 |
| Sodio hidrogeno karbonatoa | 0,16 |
| Di-sodio hidrogeno fosfatoa | 0,008 |
| Sodio silikatoa | 0,004 |
| Sodio sulfatoa | 3,24 |

KARAKTERIZAZIO MAKROSKOPIKOA

Bakterioen karakterizazio makroskopikoan isolatutako 60 bakterioak deskribatu ziren, baita laborategiko itsas bakterioen bildumatik aukeratutako 18 bakterioak ere. Bakterio hauen hainbat ezaugarri deskribatu ziren, hala nola, kolonien tamaina, kolorea, ertza eta gainazala.

KARAKTERIZAZIO MIKROSKOPIKOA: Gram tindaketa

Bakterioen karakterizazio mikroskopikoa egiteko bi ezaugarri egiazatu ziren: bakterioen morfologia eta Gram tindaketaren aurrean erantzunaren bidez horma zelular mota. Mikroskopia optikoaren bidezko behaketa egiteko 4, 10, 40 eta 100-eko objetiboak eta 10eko okularrak erabili ziren. 100-eko objetiboaren kasuan olio tanta bat gehitu zitzaion.

Gram tindaketa egiteko honako prozedura jarraitu zen: Porta batean mikroorganismoa hedatu egiten da ur tanta batez eta sugarrean fixatu. Hasteko, kristal bioleta tindatzaileaz tindatu egiten da 2 minutuz. Soberan dagoen tindatzailea kendu eta urarekin garbitzen da. Bigarren, lugola gehitzen da minutu batez tindatzailea bakterioetan fixatzeko. Bakterio guztiak urdin-purpura kolorea hartuko dute. Soberan dagoen tindatzailea kendu eta urarekin garbitzen da. Hirugarren, dekoloratzaile (alkohola:azetona 1:1) tanta batzuk gehitzen dira 15 segunduz. Bakterio Gram negatiboak dekoloratu egiten dira. Dekoloratzailea botatzen jarraitzen da porta garbi egon arte eta gero urez garbitzen da. Azkenik, safranina (kontraste-koloratzailea) gehitzen da 30 segunduz. Soberan dagoen tindatzailea kendu eta urarekin garbiltzen da. Lagina lehortu eta behaketa egiten da mikroskopia optikoaren bidez (Brown *et al.*, 2007).

Gram tindaketaren bidez bakterioak pareta zelularren loditasunaren arabera tindatzen dira. Bakterio Gram positiboek peptidoglikanozko geruza lodia daukate, azido teikoiko ugarirekin. Bakterio Gram negatiboek berriz, peptidoglikanozko geruza mehea dute, lipopolisakaridoz osatutako kanpo mintzarekin. Ezaugarri honen ondorioz, bakterioen tindaketa burutzen denean kolore ezberdinez tindatu egiten dira Gram positibo eta Gram negatiboak. Tindaketa egiterakoan zelularen barrura kristal-bioleta eta iodoa (lugola) sartzen dira, Gram negatiboaren kasuan bi tindatzaileak alkoholaren bidez ateratzen dira, baina Gram positiboaren kasuan berriz ez. Gram positiboek pareta zelular lodia daukate, peptidoglikanozko geruza ezberdinez osatuta, hau alkoholaren presentzian deshidratatu egiten da, pareta zelularreko poroak itxiaraziz, eta era honetan, zelula barruan dauden tindatzaileak ez dira irtengo. Gram negatiboetan, berriz, tindatzailea zelulatik irteten da, ondorioz bakterio hauek ikusezin bihurtzen dira, eta horrexegatik kontraste tindatzaile bat gehitu beharra dago (Madigan *et al.*, 2006).

KARAKTERIZAZIO FISIOLGIKOA

- **Kaseina aktibitatea**

Esne gaingabetu agarra kaseinasaren ekoizleak diren mikroorganismoen detekziorako erabiltzen da. Esne agarra esne gaingabetuarekin prestatzen da, kaseina proteina duena kolore zuria hartuz. Proteasek, kaseinasa bereziki, kaseina erabiliko dute substratu gisa, eta degradatzerakoan halo gardena sortuko dute agarrean.

7. taula: Agar elikagarriaren konposaketa kimikoa eta konposatu bakoitzaren kantitatea g/L-ko.

Esne agarraren prestaketa: Hasteko litro bat agar elikagarri prestatzen da (Panreac 413792.1210). Agar elikagarriaren konposaketa **7. taulan** ikus daiteke. Litro bat prestatzeko 23 gr litro bat ur destilatutara isuritzen dira. Likidoa ondo astintzen da eta berotu egiten da irakin arte. Minutu batez irakiten uzten da. Agar-elikagarria (800 ml) autoklabatu egiten da 121°C-ra 15 minutuz. Hozten uzten da eta 40-50°C-tan dagoenean esne gaingabetuarekin (200 ml) nahasten da. Agarra Petri-kutxa esteriletan banatu egiten da (20 ml bana) (Sancho *et al.*, 2002).

| Konposatuak | Kantitatea (g/L) |
|----------------------|------------------|
| Haragi-estraktua | 3 |
| Gelatinaren peptonak | 5 |
| Agarra | 15 |

- **Laktosaren hartzidura**

MacConkey agarra medio hautakor eta bereizgarria da, laktosa hartzitzen duten enterobakterioak detektatzeko erabiltzen da (Madigan *et al.*, 2006). Behazun gatzak eta kristal bioletak Gram positiboen eta hesteetan hazten ez diren bakterio Gram negatibo gehienek hazkuntza inhibitzen dute. Bakterioek laktosa erabiliko dute energia eta karbono-iturri moduan. Arnasketa aerobikoa burutzen duten bakterioetan peptonak degradatzen dituzte eta hondakin modura NH₃ ekoiztuko da. Honek pHa igotzen du eta kultibo medioa gorri-horixka ikusiko da. Laktosaren hartzidura gertatzen denean berriz, ekoizkin azidoak sortuko dira, hauek pHaren jaitsiera eragingo dute. Medioan pH adierazle bat dago, gorri-neutroa, laktosaren hartzitzailen kolonien inguruan kolore purpura eta opakoa sortuko duena.

8. taula: MacConkey agarraren konposaketa kimikoa eta konposatu bakoitzaren kantitatea g/L-ko.

Mac Conkey agarraren prestaketa: MacConkey agar litro bat prestatzeko (Panreac 413780.1210), isuri osagaiak litro bat ur destilatutara. MacConkey agarraren konposaketa **8. taulan** ikus daiteke. Likidoa ondo astindu eta berotu egiten da irakin arte. Minutu batez irakiten uzten da. Autoklabatu 121°C-ra 15 minutuz. Agarra Petri kutxa esteriletan banatu egiten da (20 ml bana) (Sancho *et al.*, 2002).

| Konposatuak | Kantitatea (g/L) |
|-------------------------|------------------|
| Peptona bakteriologikoa | 20 |
| Laktosa | 10 |
| Behazun gatzak | 2,5 |
| Sodio kloruroa | 5 |
| Gorri neutroa | 0,05 |
| Kristal bioleta | 0,001 |
| Agarra | 15 |

Eosin Methylene Blue (EMB) agarra medio hautakor eta bereizgarria da, laktosa hartzitzen duten enterobakterioak detektatzeko. Hasiara batean *E. coli* eta *Enterobacter aerogenes* bereizteko sortu zen. *Candida albicans* identifikazioan ere oso eraginkorra da. Gaur egun uretako koliformeen identifikaziorako erabiltzen da (Sancho *et al.*, 2002). Metilenoak efektu inhibitzailea dauka Gram positiboengan. Laktosa hartzitzen duten bakterioek ekoizkin azidoak sortu eta pHaren jaitsiera eragingo dute. Eosina pH adierazlearen ondorioz koloniek erdigune iluna eta periferia urdin-larrosa izango dute. Laktosa erabiltzen ez duten bakterioak gardenak izango dira.

9. taula: EMB agarraren konposaketa kimikoa eta konposatu bakoitzaren kantitatea g/L-ko.

EMB agarraren prestaketa: EMB agar litro bat prestatzeko (Panreac 413763.1210), isuri osagaiak litro bat ur destilatutara. EMB agarraren konposaketa kimikoa **9. taulan** ikus daiteke. Likidoa ondo astintzen da eta berotu egiten da irekitzen duen arte. Minutu batez irakiten utzi. Autoklabatu

| Konposatuak | Kantitatea (g/L) |
|------------------------------|------------------|
| Peptona | 10 |
| Laktosa | 10 |
| Dipotasio hidrogeno fosfatoa | 2 |
| Agarra | 15 |
| Eosina | 0,4 |
| Metileno urdina | 0,065 |

121°C-ra 15 minutuz. Agarra Petri kutxa esteriletan banatu egiten da (20 ml bana) (Sancho *et al.*, 2002).

- **Fluoreszentzia aktibitatea**

King B agarraren gatzten konposaketa fluoreszeina pigmentua bultzatu. Fluoreszeina ekoizten duten koloniak ultramore izpien bidez kitzikatzen direnean (365-312 nm-tako uhin luzera) fluoreszentzia igortzen dute.

10. taula: King B agarraren konposaketa kimikoa eta konposatu bakoitzaren kantitatea g/L-ko.

| Konposatuak | Kantitatea (g/L) |
|---------------------------------|------------------|
| Peptona | 20 |
| Glizerola | 10 |
| K ₂ HPO ₄ | 1,5 |
| Agarra | 15 |

King B agarraren prestaketa: King B agar litro bat egiteko (Pronadisa Cat.1154.00), isuri osagaiak litro bat ur destilatutara. King B agarraren konposaketa kimikoa **10. taulan** ikus daiteke. Likidoa ondo astintzen da eta berotu egiten da irekitzen duen arte. Minutu batez irakiten utzi. Autoklabatu 121°C-ra 15 minutuz. Agarra Petri kutxa esteriletan banatu egiten da (20 ml bana) (Merck, 1990).

- **β-D-Galaktosidasa eta D-Glukuronidasa aktibitateak**

Substratu kromogeniko baten bidez bakterio talde baten aktibitate entzimatikoa detekta daiteke, adibidez koliformeak desberdinez. Bakterio koliformeak *Enterobacteriae* familiakoak dira eta β-D-Galaktosidasa entzima erabiltzen dute. *Escherichia coli* esaterako, *Enterobacteriae* taldekoa da eta β-D-Galaktosidasa eta D-Glukuronidasa entzimak erabiltzen ditu (Merck, 1990).

Chromocult agarraren kasuan, bi substratu kromogeniko daude. Salmoi-GAL substratua β-D-Galaktosidasa entzimak degradatzen du eta koloniak gorri tindatzen ditu. D-Glukuronidasa entzimaren aktibitatearen identifikazioa substratu X-glukuronikoaren bidez egiten da, koloniak urdinez tindatzen ditu. Medio honetan hazten diren koloniak eta aipatutako aktibitate entzimarik ez dutenak zuri kolorekoak izango dira. Lauril sulfatoa kolonia Gram positiboen hazkuntza inhibitzen du eta zenbait Gram negatiboen hazkuntza ere, koliformeen hazkuntza adibidez, blokeatu gabe. Triptofanoak indolaren erreakzioa hobetzen du *E. coli*-ren sorrerarako eta identifikazioa errazten du (Merck, 1990).

11. taula: Chromocult agarraren konposaketa kimikoa eta konposatu bakoitzaren kantitatea g/L-ko.

| Konposatuak | Kantitatea (g/L) |
|-------------------------------|------------------|
| Peptona | 3 |
| Pirubato sodikoa | 1 |
| Kloruro sodikoa | 5 |
| Triptofanoa | 1 |
| Dipotasio dihidrogeno fosfata | 1,7 |
| Laurilsulfato sodikoa | 0,1 |
| Dipotasio hidrogeno fosfata | 3 |
| Nahasketa kromogenikoa | 0,2 |
| Agar-agar | 12 |

Chromocult agarraren prestaketa: Chromocult agar litro bat egiteko (Merck 1.10426.0500), isuri osagaiak litro bat ur destilatutara. Chromocult agarraren konposaketa kimikoa **11. taulan** ikus daiteke. Likidoa ondo astintzen da eta berotu egiten da irekitzen duen arte. Minutu batez irakiten utzi. Autoklabatu 121°C-ra 15 minutuz. Agarra Petri-kutxa esteriletan banatu egiten da (20 ml bana) (Merck, 1990).

- **Antibiotikoen ekoizpena**

Antibiotikoak mikroorganismoek ekoizten dituzten eta mikroorganismoen kontra, batez ere bakterioen kontra, jarduten duten gai kimikoak dira. Mikroorganismo ekoizleak kultibo medio solido batean hazten direnean, ekoiztutako antibiotikoa zeluletatik kanporatzen da eta kultibo medioa barreiatzen da. Ekoizleen

inguruan antibiotikoaren kontzentrazio erlatiboa maximoa da, eta zenbat eta urrunago, antibiotikoaren kontzentrazioa gero eta baxuagoa da (Madigan *et al.*, 2006). Hiru mikroorganismo adierazleren sentikortasun maila aztertuta bakterioen antibiotiko ekoizpen maila ezagu dezakegu. Erabilitako mikroorganismo adierazleak hauek dira: *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* eta *Bacillus subtilis*. Erabilitako kultibo medioak solidoak dira, “antibiotiko” agarra, Zobell agarra eta Sea water agarra hain zuzen ere. Antibiotiko agarrean antibiotikoaren ekoizpena hobetu egiten da, eta azkarrago eta ekoizpen altuagoan sintetizatzen da antibiotikoa.

12. taula: Antibiotiko agarraren konposaketa kimikoa eta konposatu bakoitzaren kantitatea g/L-ko.

| Konposatuak | Kantitatea (g/L) |
|-------------------|------------------|
| Glukosa | 2 |
| Peptona | 10 |
| Legamia-estraktua | 1 |
| Agarra | 15 |

Antibiotiko agarraren prestaketa: Antibiotiko agar litro bat egiteko, isuri osagaiak litro bat ur destilatutara. Antibiotiko agarraren konposaketa kimikoa **12. taulan** ikus daiteke. Likidoa ondo astintzen da eta berotu egiten da irekitzen duen arte. Minutu batez irakiten utzi. Autoklabatu 121°C-ra 15 minutuz. Agarra Petri kutxa esteriletan banatu egiten da (20 ml bana).

Petri-kutxen eskina batean ereinketa eremua marraztu zen, frogatu nahi diren mikroorganismoak ereiteko. 5 egunez inkubatzen utzi ziren, antibiotikoaren ekoizpen egokia lortzeko. Gerora, ekoizlearen eremutik gertu (0,5 cm-ra) ekoizlearekiko elkarzutik dauden hiru lerro marraztu ziren. Marra bakoitzean mikroorganismo adierazle bat inokulatu zen. Petri-kutxak buruz behera inkubatzen utzi ziren dagozkien tenperaturan eta zenbait egunetan zehar mikroorganismo adierazleen hazkuntza neurtu zen erregelarekin (Madigan *et al.*, 2006).

Antibiotikoen eragina aztertzeko erabilitako mikroorganismo adierazleak honakoak dira: *Micrococcus luteus* (*M.luteus*), *Bacillus subtilis* (*B.subtilis*) eta *Escherichia coli* (*E.coli*).

- *Micrococcus luteus*: *Actinobacteria* filum-eko eta *Micrococcus* generoko bakterio Gram positibo kimioorganotrofo heterotrofoak dira. Derrigorrezko aerobioak dira eta ingurune askotan aurki daitezke; ura, lurra, giza azalean... Mesofiloak dira, hau da, 15-35°C bitartean hazkuntza optimoa daukate. Horrez gain gatz kontzentrazio altuak ere jasaten dituzte. GC kantitate handia daukate bere genoman, gutxi gorabehera %60-75. Askotan plasmidoak dituzte, bakterioei ezaugarri bereizgarriak eskeiniz. Zelula esferikoak dira eta pareta zelularra oso handia dute. Kolonietan daudenean kolore horixka dute. Ez ditu esporarik sortzen (Madigan *et al.*, 2006).
- *Bacillus subtilis*: *Firmicutes* filum-eko eta *Bacillus* generoko bakterio Gram positibo kimioorganotrofo heterotrofoak dira. Aukerazko bakterio aerobioak dira eta mesofiloak. Batez ere lurzoruan eta deskonposatzen ari den material aurkitzen dira. Genoman, GC portzentaia %43-koa da. Baziloak dira eta koloniak kolore marroixka dute. Endospora zilindrikoa sortzen dute, hau oso erresistentea da eta beraz, muturreko baldintzak jasateko gai dira. Bakterio honen genoma nahiko ikasita dago eta ikusi da 200 gene baino gehiago dituela aminoazidoen metabolismoan inplikaturik (Madigan *et al.*, 2006).
- *Escherichia coli*: *Proteobacteria* filum-eko enterobakterio Gram negatiboak dira. Aukerazko bakterio anaerobioa da, hau da, ez du derrigorrez O₂-rik behar, baina hobeto hazten dira honen presentzian. Metabolismo aerobiko, anaerobiko edo hartzidura burutu dezake (laktosa, sakarosa eta glukosa hartzitzen ditu). Kimioorganotrofo heterotrofoak dira. Ingurune guztietan bizi daitezke, mesofiloak dira eta haien pH optimoa 6-7 bitartean dago. Gizakiaren liseri traktuaren ohiko bakterio bat da, horregatik mikroorganismorik ikasienarikoa da. Liseri traktuan duen funtzio nutrizionala bitaminen sintesia izan daiteke, batez ere, K bitaminaren sintesia. Horrez gain, heste lodian ematen den ingurune anaerobikoaren

mantenuaz arduratzen da. Flageloak ditu, beraz, mugikorra da eta esporoduna da. Bere genomako GC kantitatea %48-52 bitartekoa da (Madigan *et al.*, 2006).

EMAITZAK ETA EZTABAIDA

BAKTERIO KULTIBAGARRIEN DENTSITATEA

Bakterio kulibagarrien zenbaketarako bakterioen dentsitate altuenetako uneetan 6 mikrokosmosen (+NFH Kontrola; +NFH monomeroak; +NFH polimeroak; -NFH Kontrola; -NFH monomeroak; -NFH polimeroak) ur laginen diluzio hamartarrak egin ziren eta Zobell eta Sea Waterrean ereindu ondoren 11°C-tan inkubatu ziren. 8 egun pasa ostean kolonia kopuruak hauek izan ziren (**13** eta **14. taulak**):

13. taula: Zobell agarrean 6 mikrokosmosen kolonia kopuruak diluzio (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) eta erreplika bakoitzeko (R_1 eta R_2). KE (kontaezina).

| Zobell | | | | | | |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|----------------------|-----------|---------------------|
| +NFH | | | -NFH | | | |
| KONTROLA | | | | | | |
| | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | | 10^{-1} | 10^{-2} 10^{-3} |
| R₁ | 31 | 1 | 0 | R₁ | 17 | 2 0 |
| R₂ | 44 | 3 | 1 | R₂ | 26 | 2 0 |
| MONOMEROAK | | | | | | |
| | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | | 10^{-1} | 10^{-2} 10^{-3} |
| R₁ | KE | ≈300 | 80 | R₁ | KE | ≈400 99 |
| R₂ | KE | ≈300 | 80 | R₂ | KE | ≈300 KE |
| POLIMEROAK | | | | | | |
| | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | | 10^{-1} | 10^{-2} 10^{-3} |
| R₁ | KE | 85 | 87 | R₁ | KE | 36 1 |
| R₂ | KE | 89 | KE | R₂ | 251 | KE 8 |

14. taula: Sea Water agarrean 6 mikrokosmosen kolonia kopuruak diluzio (0, 10^{-1} , 10^{-2}) eta erreplika bakoitzeko (R_1 eta R_2). KE (kontaezina).

| Sea Water | | | | | | |
|----------------------|----|-----------|-----------|----------------------|------|---------------------|
| +NFH | | | -NFH | | | |
| KONTROLA | | | | | | |
| | 0 | 10^{-1} | 10^{-2} | | 0 | 10^{-1} 10^{-2} |
| R₁ | KE | 41 | 18 | R₁ | ≈400 | 42 4 |
| R₂ | KE | 33 | 5 | R₂ | ≈400 | 57 3 |
| MONOMEROAK | | | | | | |
| | 0 | 10^{-1} | 10^{-2} | | 0 | 10^{-1} 10^{-2} |
| R₁ | KE | KE | KE | R₁ | KE | KE ≈200 |
| R₂ | KE | KE | KE | R₂ | KE | KE ≈100 |
| POLIMEROAK | | | | | | |
| | 0 | 10^{-1} | 10^{-2} | | 0 | 10^{-1} 10^{-2} |
| R₁ | KE | >400 | ≈200 | R₁ | KE | ≈200 44 |
| R₂ | KE | KE | ≈200 | R₂ | KE | ≈200 46 |

Mikrokosmos bakoitzaren diluzio adierazgarrien batez bestekoa erabilia bakterio kulturagarrien dentsitateak eta portzentajeak kalkulatu ziren (**15. taula**).

15. taula: 6 mikrokosmosen bakterio guztien dentsitate maximoa (bakterio/ml), eta Zobell eta Sea Water agarrean bakterio kultibagarrien dentsitatea (KUS/ml) eta portzentajea (%).

| | Zobell agarra | | | | | |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | +NFH | | | -NFH | | |
| | Kontrola | Monomeroak | Polimeroak | Kontrola | Monomeroak | Polimeroak |
| Bakterio guztien dentsitatea (bakterio/ml) | $1,65 \cdot 10^6$ | $1,80 \cdot 10^6$ | $1,78 \cdot 10^6$ | $1,50 \cdot 10^6$ | $2,16 \cdot 10^6$ | $1,78 \cdot 10^6$ |
| Bakterio kultibagarrien dentsitatea (KUS/ml) | $3,75 \cdot 10^3$ | $8,00 \cdot 10^5$ | $8,70 \cdot 10^4$ | $2,15 \cdot 10^3$ | $9,90 \cdot 10^5$ | $3,60 \cdot 10^4$ |
| Kultibagarrien % | 0,22 | 44,44 | 4,88 | 0,14 | 45,83 | 2,02 |
| | Sea Water agarra | | | | | |
| Bakterio kultibagarrien dentsitatea (KUS/ml) | $3,70 \cdot 10^3$ | $4,00 \cdot 10^5$ | $2,00 \cdot 10^5$ | $4,50 \cdot 10^3$ | $1,50 \cdot 10^5$ | $4,95 \cdot 10^4$ |
| Kultibagarrien % | 0,22 | 22,22 | 11,23 | 0,30 | 6,94 | 2,78 |

Datuen konparaketa (**16. taula**) hiru modu ezberdinetan egin ziren; lehenik, substratu ezberdinen gehiketak (monomeroak eta polimeroak) kontrolarekiko duten konparaketa (gorriz); bigarrenik, nanoflagelatu

kenketak izandako eragina (berdez); eta hirugarrenik, bi kultura-medioen arteko konparaketa (urdinez). Student t frogaren bidez datuen esangarritasunean balio hauek lortu dira:

16. taula: 6 Mikrokosmosetan Zobell eta Sea Water agarretan kultibarrien portzentajeen (t Student frogaren bidez) konparaketaren p balioak.

| | | Zobell +NFH | | | Zobell -NFH | | | Sea Water +NFH | | | Sea Water -NFH | | |
|---------------|------------|-------------|--------|--------|-------------|--------|---|----------------|--------|--------|----------------|--------|--------|
| | | K | M | P | K | M | P | K | M | P | K | M | P |
| Zobell | Kontrola | - | 0,0005 | 0,0099 | 0,0710 | - | - | 0,9698 | - | - | - | - | - |
| +NFH | Monomeroak | - | 0,0018 | - | 0,0903 | - | - | 0,0001 | - | - | - | - | - |
| | Polimeroak | - | - | - | - | 0,0189 | - | - | 0,0084 | - | - | - | - |
| Zobell | Kontrola | - | - | - | 0,0027 | 0,0006 | - | - | - | 0,0679 | - | - | - |
| -NFH | Monomeroak | - | - | - | 0,0029 | - | - | - | - | - | 0,0413 | - | - |
| | Polimeroak | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,0374 | - |
| Sea | Kontrola | - | - | - | - | - | - | 0,0015 | 0,0030 | 0,3896 | - | - | - |
| Water | Monomeroak | - | - | - | - | - | - | - | 0,0001 | - | 0,0966 | - | - |
| +NFH | Polimeroak | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,0020 | - |
| Sea | Kontrola | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,2185 | 0,0017 | - |
| Water | Monomeroak | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,3136 |
| -NFH | Polimeroak | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Zobell eta Sea Water agarrean, nanoflagelatuekin (+NFH) edo nanoflagelaturik gabeko (-NFH), monomero zein polimeroen gehiketan kulturagarritasunaren portzentajea kontrolean baino handiagoa izan da (Student t, $p < 0,05$). Kasu guztietan ere monomeroen gehiketan kulturagarritasunaren portzentajea polimeroen gehiketan baino handiagoa da (Student t, $p < 0,05$).

Nanoflagelatuekin eta nanoflagelatu gabeko tratamenduak konparatzerakoan emaitzek ez dute esperotako islatzen nanoflagelatuak eragindako harraparitza-presioa jaisteak ez duelako eragin nabarmenik kulturagarritasunaren portzentajearen. Beraz, orokorrean, flagelatu gabeko tratamenduetan eta flagelatuekin kulturagarritasun-portzentajeak berdinak dira (Student t, $p > 0,05$), polimeroen gehiketaren tratamenduan Sea Water agarrean izan ezik zeinean portzentaje handiagoa (Student t, $p < 0,05$) ikusten den nanoflagelatuak daudenean.

Zobell eta Sea Water agarren konparaketan, bai kontrolean bai polimeroak gehitzerakoan ez dago desberdintasunik bi kultura medioen artean (Student t, $p > 0,05$). Monomeroak gehitzen direnean ordea Zobell agarrean Sea Water agarrean baino kulturagarritasun-portzentaje handiak agertzen dira (Student t, $p < 0,05$).

Aipatzekoak dira Zobell agarrean bai flagelatuaren presentzian bai flagelaturik ezean, monomeroak gehitzean kulturagarrien portzentaje altuenak lortu direla (% 44,44 eta %45,83).

Zailtasunak alde batera utzita, laborategian prestatutako Sea Water agarra ez zen aurretik inoiz erabili. Medio honetan lortutako bakterio kulturagarrien portzentajea ikusita interesgarria izan daiteke bakterioen isolaketa gehiago burutzeko. Gainera, itsas uraren aurretratamenduek bakterio kultibagarrien portzentajea handitu dute. Prozesu hau interesgarria izan daiteke bakterio zehatz batzuen hazkuntza eta isolaketa burutzeko, izan ere, α -Proteobakterioak aktibitate altuak erakusten dituzte pisu molekular txikiko substratuen aurrean (glukosa, aminoazidoak), *Bacteroidetes* taldeak berriz, pisu molekular handiko substratuak nahiago dituzte (Cottrell eta Kirchman, 2000).

ISOLATURIKO BAKTERIOEN KARAKTERIZAZIOA

Bakterioen karakterizazioa egiteko, 6 mikrokosmosetik isolatutako 60 bakterioak makroskopikoki deskribatu ziren, baita laborategiko itsas bakterioen bildumatik aukeratutako 18 bakterioak makroskopikoki, mikroskopikoki eta fisiologikoki ere.

ISOLATUTAKO 60 ITSAS BAKTERIOAK

KARAKTERIZAZIO MAKROSKOPIKOA

Isolatutako 60 itsas bakterioen karakterizazio makroskopikoa egiteko, bi kultura-medioetan (Zobell eta Sea Water agarrean) hazitako kolonien hainbat ezaugarri deskribatu ziren, hala nola, tamaina, kolorea, ertza eta gainazala (*17. taula*).

17. taula: Isolatutako 60 itsas bakterioen karakterizazio makroskopikoa.

| Zobell | Sea Water |
|---|--|
| +NFH Polimeroak | + NFH Polimeroak |
| 430: Koloniak krema kolorekoak, erdialde ilunagoarekin. Borobil formakoak eta tamaina ertainekoak. | 466: Koloniak transparenteak. Tamaina ertainekoak. |
| 431: Koloniak larroxa kolorekoak. Taimaina txikikoak eta agarra jaten dute. | 467: Kolonia zuriak halo gardenarekin. Taimaina ertainekoak. |
| 432: Koloniak krema kolorekoak, erdialde ilunagoarekin. Taimaina txikikoak eta agarra jaten dute. | 468: Koloniak zuriak. Taimaina ertainekoak. |
| 433: Koloniak more kolorekoak, erdialde argiagoarekin. Taimaina ertainekoak. | 469: Kolonia zuriak. Taimaina txikikoak eta agarra jaten dute. |
| 434: Koloniak zuri kolorekoak, tamaina txikikoa eta goratzea borobila. | |
| 435: Koloniak beltz kolorekoak eta txikiak. | |
| +NFH Monomeroak | +NFH Monomeroak |
| 436: Koloniak zuriak, pixkat gardenak. Taimaina txikikoak eta agarra jaten dute. | 470: Koloniak zuriak. Taimaina ertainekoak. |
| 437: Koloniak gardenak erdialdea ilunagoarekin. Ertza irregularra, agarra jaten dute. | 471: Koloniak zuriak halo gardenarekin. Taimaina ertainekoak. |
| 438: Koloniak krema kolorekoak, pixkar larrosak. Taimaina ertainekoak. | 472: Koloniak zuriak halo gardenarekin. Taimaina ertainekoak. |
| 439: Koloniak zuriak dira, erdialdea argiagoarekin. Taimaina ertainekoak. | 473: Koloniak zuriak. Taimaina txikikoak. |
| 440: Koloniak krema kolorekoak dira halo gardenarekin. Taimaina txikikoak. | |
| 441: Koloniak krema kolorekoak eta tamaina ertainekoak. | |
| +NFH Kontrola | +NFH Kontrola |
| 442: Koloniak marroi kolorekoak, agarra jaten dute. | 474: Koloniak zuriak. Taimaina ertainekoak. |
| 443: Koloniak laranja kolorekoak, tamaina txikikoak eta goratzea borobila. | 475: Koloniak zuriak halo gardenarekin. Taimaina ertainekoak. |
| 444: Koloniak zuriak erdialde ilunagoarekin. Taimaina txikikoak. | 476: Koloniak zuriak. Taimaina txikikoak. |
| 445: Koloniak zuriak, goratzea borobila eta distiratsuak. Taimaina txikikoak. | 477: Koloniak krema kolorekoak. Taimaina ertainekoak. |
| 446: Kolonia gardenak erdialde ilunarekin. Taimaina txikikoak. | |
| 447: Koloniak krema kolorekoak eta handiak. Agarra jaten dute. | |
| -NFH Polimeroak | -NFH Polimeroak |
| 448: Koloniak erdialde argia, zirkulu marroia eta halo gardenak dute. Taimaina ertainekoak. | 478: Koloniak zuriak. Taimaina txikikoak eta agarra jaten dute. |
| 449: Koloniak laranja kolorekoak, tamaina txikikoak. | 479: Koloniak krema kolorekoak erdialde zuriarekin. Taimaina ertainekoak. |
| 450: Koloniak halo zurixkarekin eta erdialde laranja. Taimaina txikikoak eta agarra jaten dute. | 480: Koloniak krema kolorekoak. Taimaina txikikoak eta agarra jaten dute. |
| 451: Kolonia marroixkak erdialde argiagoarekin. Taimaina ertainekoak. | 481: Koloniak krema kolorekoak halo gardenarekin. Taimaina ertainekoak. |
| 452: Koloniak krema kolorekoak, erdialde gardenarekin. Taimaina txikikoak eta agarra jaten dute. | |
| 453: Koloniak laranja kolorekoak, tamaina ertainekoak. | |
| -NFH Monomeroak | -NFH Monomeroak |
| 454: Koloniak krema kolorekoak eta tamaina ertainekoak. | 482: Koloniak zuriak. Taimaina handikoak eta agarra jaten dute. |
| 455: Koloniak laranja kolorekoak eta tamaina ertainekoak. | 483: Koloniak zuriak eta goratzea borobila. Taimaina txikikoak. |
| 456: Koloniak zuriak eta goratzea borobila. | 484: Koloniak zuriak. Agarra jaten dute. |
| 457: Koloniak krema kolorekoak. Taimaina ertainekoak eta agarra jaten dute. | 485: Koloniak krema kolorekoak. Taimaina handikoak. |
| 458: Koloniak krema kolorekoak erdialde ilunagoarekin. Taimaina ertainekoak. | |
| 459: Koloniak zuriak eta goratzea borobila. Taimaina ertainekoak. | |
| -NFH Kontrola | -NFH Kontrola |
| 460: Koloniak laranja krema kolorekoak. Taimaina handikoak. | 486: Koloniak gardenak. Taimaina handikoak. |
| 461: Koloniak zuriak erdialde ilunagoarekin. Taimaina txikikoak. | 487: Koloniak laranja kolorekoak. Taimaina ertainekoak eta agarra jaten dute. |
| 462: Koloniak hori gardenak. Taimaina handikoak. | 488: Koloniak zuriak. Taimaina handikoak. |
| 463: Koloniak zuriak eta goratzea borobila. Taimaina txikikoak. | 489: Koloniak krema kolorekoak. Taimaina ertainekoak. |
| 464: Koloniak krema kolorekoak. Taimaina handikoak. | |
| 465: Koloniak zuri kolorekoak erdialde gardenarekin. Taimaina txikikoak. | |

ITSAS BAKTERIOEN BILDUMAKO 15 BAKTERIOAK

Laborategiko itsas bakterioen bildumatik aukeraturiko bakterio batzuen zenbait ezaugarri hartu ziren kontutan, hala nola, laginak hartutako eguna eta lekua, itsasoaren tenperatura, inkubazio tenperatura eta gordepen data (**18 eta 19. taulak**). Kasu guztietan bakterioak Armintzatik (Bizkaiko Golkoa) isolatu ziren. 18 bakteriotik 15 berreskuratu ziren eta 3 (26, 214 eta 229) ez ziren hazi nahiz eta 4 aldiz berreskurapena saiatu. Honek adierazten digu gordepenerako prozedura (itsas saldan + %10 glizerol + %7 dimetil sulfoxidoa) edota berreskuratzeko prozedura (ereinketa zuzena bildumatik Zobell edo Sea Water agarrean) orokorrean (%85) egokiak direla baina salbuespen batzuen kasuan (%15), ez direla guztiz egokiak bi prozesu hauek. Laborategiko bildumatik bakterioen berreskurapenean aurkitutako zailtasunak ikusita, mikroorganismoen kontserbazio metodo egokiago baten bilaketa planteatu dezake.. Hazitako 15 bakterio hauek erabiliko dira laginketa-estazioan dagoen adierazle gisa.

18. taula: Zobell agarrean isolaturiko itsas bakterioen ezaugarriak.

| Bildumaren zenbakia | Lekua | Laginketa data | T ^a (°C) | Inkubazio T ^a (°C) | Gordepen data |
|---------------------|----------|----------------|---------------------|-------------------------------|---------------|
| 16 | Armintza | 2011/04/02 | 13,5 | 15 | 2012/05/04 |
| 25 | Armintza | 2011/04/02 | 13,5 | 20 | 2012/04/04 |
| 26 | Armintza | 2011/04/02 | 13,5 | 20 | 2012/05/29 |
| 35 | Armintza | 2011/04/08 | 14 | 15 | 2012/04/04 |
| 91 | Armintza | 2011/04/14 | 14,5 | 20 | 2012/04/04 |
| 103 | Armintza | 2011/04/14 | 14,5 | 20 | 2012/04/04 |
| 151 | Armintza | 2012/04/17 | *Rolling machine | 20 | 2012/05/29 |
| 152 | Armintza | 2012/04/17 | *Rolling machine | 20 | 2012/05/29 |
| 193 | Armintza | 2012/04/16 | 19,5 | 19,5 | 2012/09/10 |
| 214 | Armintza | 2012/07/16 | 19,5 | 16,5 | 2012/09/11 |

*Rolling machine: laginak inkubatzeko gailu berezi batean (rolling machine) zeinek simulatzen duen itsasoko mugimendua. Honi esker itsas-agregatuak sortzen dira eta hortik isolatu ziren bakterioak (agregatuei itsatzitako itsas-bakterioak).

19. taula: Sea Water agarrean isolaturiko itsas bakterioen ezaugarriak.

| Bildumaren zenbakia | Lekua | Laginketa data | T ^a (°C) | Inkubazio T ^a (°C) | Gordepen data |
|---------------------|----------|----------------|---------------------|-------------------------------|---------------|
| 200 | Armintza | 2012/07/16 | 19,5 | 20,5 | 2012/09/10 |
| 229 | Armintza | 2012/07/16 | 19,5 | 16,5 | 2012/09/11 |
| 266 | Armintza | 2012/07/16 | 19,5 | 14,0 | 2012/09/12 |
| 292 | Armintza | 2012/07/16 | 19,5 | 11,5 | 2012/09/13 |
| 333 | Armintza | 2012/07/30 | 20,5 | 19,5 | 2012/09/20 |
| 366 | Armintza | 2012/07/30 | 20,5 | 16,5 | 2012/10/01 |
| 393 | Armintza | 2012/07/30 | 20,5 | 14,0 | 2012/10/11 |
| 419 | Armintza | 2012/07/30 | 20,5 | 11,5 | 2012/10/18 |

KARAKTERIZAZIO MAKROSKOPIKOA

Laborategian hazitako bakterio hauen hainbat ezaugarri makroskopiko deskribatu ziren, hala nola, kolonien tamaina, kolorea, ertza eta gainazala (**20 eta 21. taulak**). Zobell eta Sea Water agarrean berreskuratutako bakterioak **1** eta **2. irudietan** ikus daitezke.

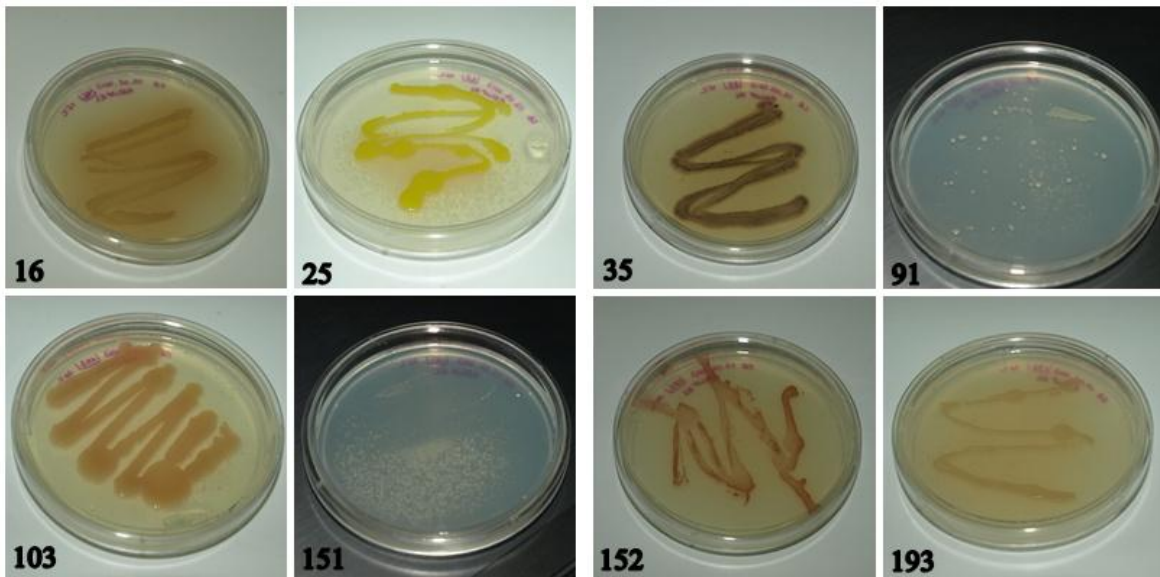
20. taula: Zobell agarrean hazitako itsas bakterioen ezaugarri makroskopikoak.

| | Kolonia osoa | Kolorea | Ertza | Gainazala |
|-----|-----------------|---------|-------------|---------------|
| 16 | Tamaina ertaina | Laranja | Erregularra | Distiratsua |
| 25 | Tamaina txikia | Horia | Erregularra | Distiratsua |
| 35 | Tamaina ertaina | Beltza | Erregularra | Bolkanikoa |
| 91 | Tamaina ertaina | Zuria | Erregularra | Halo karamelo |
| 103 | Tamaina handia | Salmoia | Irregularra | Mukitsua |

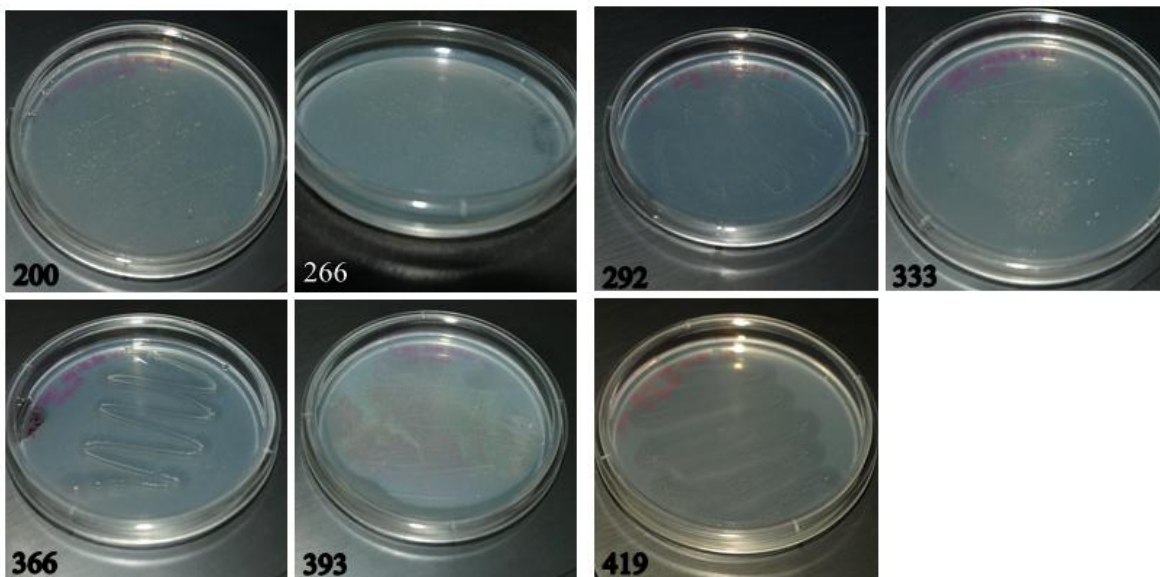
| | | | | |
|-----|-----------------|---------|-------------|------------------|
| 151 | Tamaina txikia | Gorria | Erregularra | Bolkanikoa |
| 152 | Tamaina ertaina | Larrosa | Erregularra | Distira gutxikoa |
| 193 | Tamaina handia | Laranja | Erregularra | Distiratsua |

21. taula: Sea Water agarrean hazitako itsas bakterioen ezaugarri makroskopikoak.

| | Kolonia osoa | Kolorea | Ertza | Gainazala |
|-----|-----------------|---------|-------------|------------------|
| 200 | Tamaina ertaina | Zuria | Irregularra | Halo gardena |
| 266 | Tamaina txikia | Zuria | Erregularra | Halo gardena |
| 292 | Tamaina txikia | Zuria | Erregularra | Halo iluna |
| 333 | Tamaina ertaina | Zuria | Erregularra | Halo gardena |
| 366 | Tamaina handia | Zuria | Erregularra | Distiratsua |
| 393 | Tamaina txikia | Gardena | Erregularra | Distira gutxikoa |
| 419 | Tamaina ertaina | Zuria | Erregularra | Distira gutxikoa |



1. irudia: Bakterioen hazkuntza Zobell agarrean.



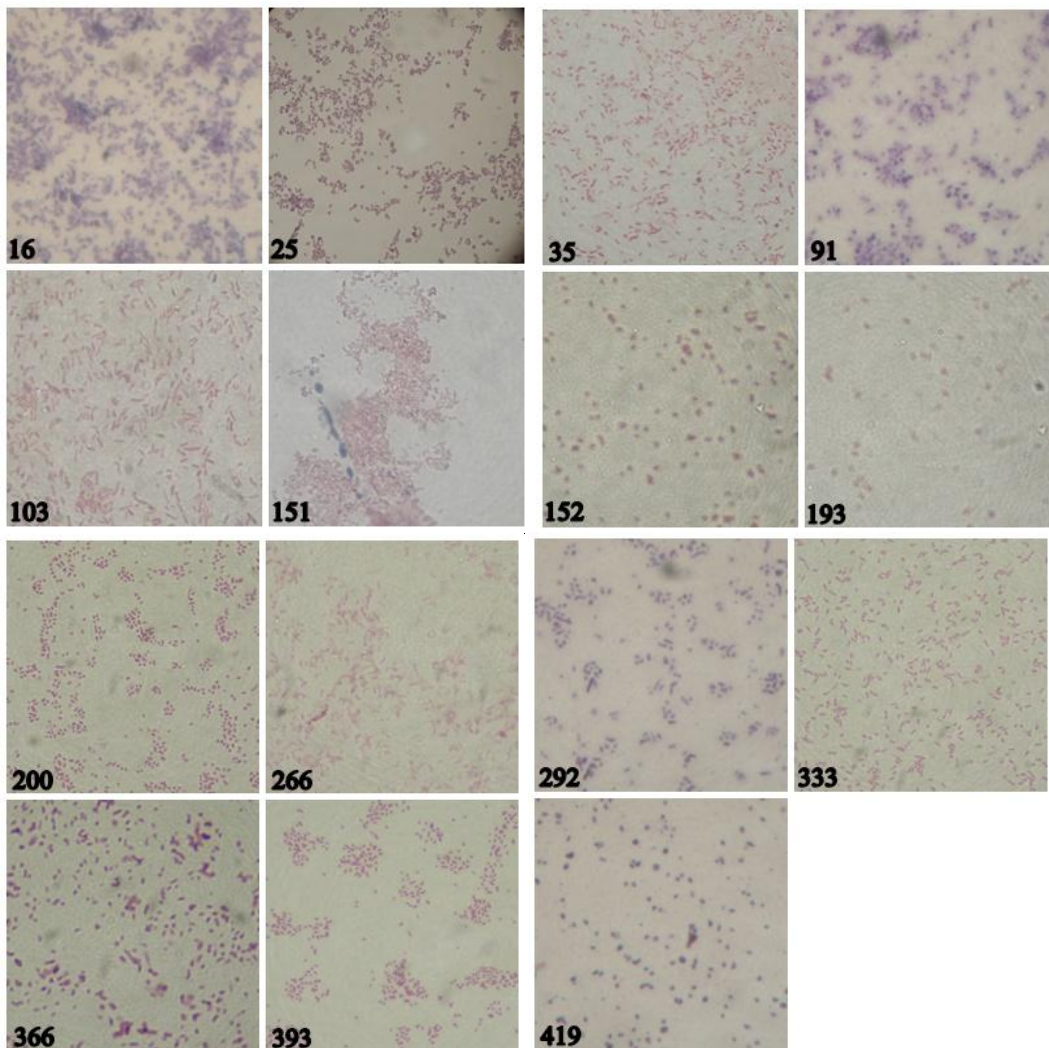
2. irudia: Bakterioen hazkuntza Sea Water agarrean.

KARAKTERIZAZIO MIKROSKOPIKOA

Laborategiko itsas bakterioen bildumatik aukeratutako eta hazitako 15 bakterioen karakterizazio mikroskopikoa egin zen. Bi ezaugarri egiaztatu ziren, morfologia eta Gram tindaketaren aurrean erantzunaren bidez horma zelular mota, Gram positiboak eta Gram negatiboak bereiztuz (**22. taula**). Bakterio bakoitzaren argazki mikroskopikoa **3. irudian** ikus daiteke.

22. taula: Itsas bakterioen ezaugarri mikroskopikoak.

| | Gram tindaketa | Morfologia |
|-----|----------------|-------------|
| 16 | Gram positiboa | Kokobaziloa |
| 25 | Gram positiboa | Kokoa |
| 35 | Gram negatiboa | Baziloa |
| 91 | Gram positiboa | Kokobaziloa |
| 103 | Gram negatiboa | Baziloa |
| 151 | Gram negatiboa | Baziloa |
| 152 | Gram positiboa | Kokobaziloa |
| 193 | Gram negatiboa | Kokobaziloa |
| 200 | Gram negatiboa | Baziloa |
| 266 | Gram negatiboa | Baziloa |
| 292 | Gram positiboa | Kokobaziloa |
| 333 | Gram negatiboa | Baziloa |
| 366 | Gram positiboa | Baziloa |
| 393 | Gram negatiboa | Kokobaziloa |
| 419 | Gram positiboa | Kokoa |



3. irudia: Bakterioen argazki mikroskopikoa (handipena x1000).

KARAKTERIZAZIO FISIOLGIKOA

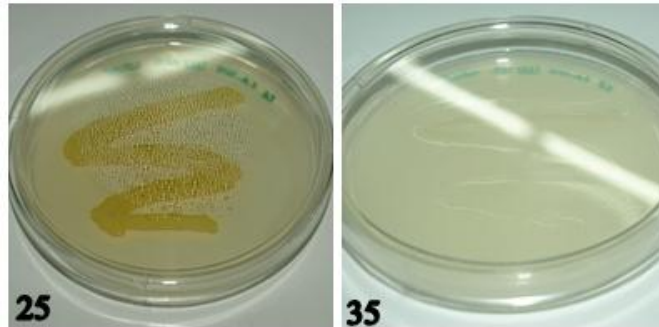
Bakterio bakoitzari froga ezberdinak egin zitzaizkien ezaugarri fisiologiko berriak identifikatzeko. Esne agarraren bidez kaseinasa aktibitatea detektatu zen, MacConkey eta EMB agarren bidez laktosaren hartidura, King B agarren bidez fluoreszentzia-pigmentuen sorrera, Chromocult agarren bidez β -D-Galaktosidasa eta D-Glukuronidasa aktibitateak, eta antibiotiko agarren bidez antibiotikoen ekoizpena (**23. taula**).

232. taula: Itsas bakterioen ezaugarri fisiologikoak (kaseinasa aktibitatea, laktosaren hartidura, fluoreszentiaren sorrera eta β -D-Galaktosidasa eta D-Glukuronidasa aktibitateak).

| | Esne agarra | Mc Conkey agarra | EMB agarra | King B agarra | Chromocult agarra |
|-----|--|---|--|------------------------------------|---|
| 16 | Hazkuntza ez | Hazkuntza ez | Hazkuntza ez | Hazkuntza bai Fluoreszentzia ez | Hazkuntza ez |
| 25 | Hazkuntza bai Kaseinasa aktibitatea bai | Hazkuntza ez | Hazkuntza bai Laktosaren hartidura ez | Hazkuntza bai Fluoreszentzia ez | Hazkuntza bai Kolonian hori txikiak |
| 35 | Hazkuntza bai Kaseinasa aktibitatearik ez | Hazkuntza bai Laktosaren hartidura bai | Hazkuntza ez | Hazkuntza bai Fluoreszentzia ez | Hazkuntza bai Kolonian zuri txikiak |
| 91 | Hazkuntza ez | Hazkuntza ez | Hazkuntza ez | Hazkuntza bai Fluoreszentzia ez | Hazkuntza bai Kolonian garden txikiak |
| 103 | Hazkuntza bai Kaseinasa aktibitatearik ez | Hazkuntza ez | Hazkuntza ez | Hazkuntza bai Fluoreszentzia ez | Hazkuntza ez |
| 151 | Hazkuntza bai Kaseinasa aktibitatearik ez | Hazkuntza ez | Hazkuntza ez | Hazkuntza bai Fluoreszentzia ez | Hazkuntza bai Kolonian larrosa txikiak |
| 152 | Hazkuntza bai Kaseinasa aktibitatearik ez | Hazkuntza ez | Hazkuntza ez | Hazkuntza bai Fluoreszentzia ez | Hazkuntza bai Kolonian krema txikiak |
| 193 | Hazkuntza bai Kaseinasa aktibitatearik ez | Hazkuntza ez | Hazkuntza ez | Hazkuntza bai Fluoreszentzia ez | Hazkuntza bai Kolonian larrosa txikiak |
| 200 | Hazkuntza ez | Hazkuntza bai Laktosaren hartidura ez | Hazkuntza ez | Hazkuntza ez | Hazkuntza ez |
| 266 | Hazkuntza ez | Hazkuntza ez | Hazkuntza ez | Hazkuntza bai Fluoreszentzia ez | Hazkuntza ez |
| 292 | Hazkuntza bai Kaseinasa aktibitatearik ez | Hazkuntza ez | Hazkuntza ez | Hazkuntza bai Fluoreszentzia ez | Hazkuntza ez |
| 333 | Hazkuntza bai Kaseinasa aktibitatearik ez | Hazkuntza bai Laktosaren hartidura ez | Hazkuntza ez | Hazkuntza ez | Hazkuntza bai Kolonian garden txikiak |
| 366 | Hazkuntza bai Kaseinasa aktibitatearik ez | Hazkuntza bai Laktosaren hartidura ez | Hazkuntza ez | Hazkuntza bai Fluoreszentzia ez | Hazkuntza bai Kolonian garden txikiak |
| 393 | Hazkuntza bai Kaseinasa aktibitatearik ez | Hazkuntza bai Laktosaren hartidura ez | Hazkuntza ez | Hazkuntza ez | Hazkuntza ez |
| 419 | Hazkuntza bai Kaseinasa aktibitatearik ez | Hazkuntza ez | Hazkuntza ez | Hazkuntza ez | Hazkuntza ez |

- **Kaseinasa aktibitatea**

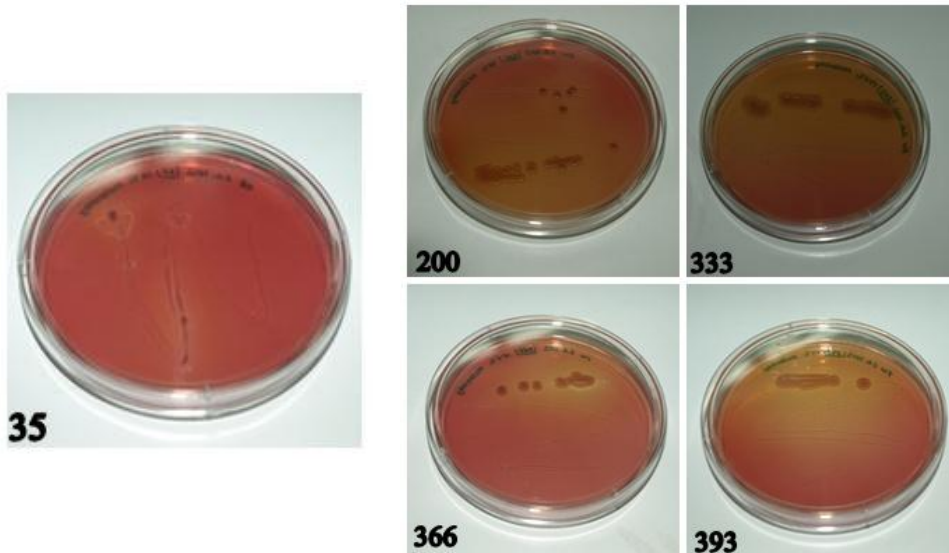
Kaseinasa aktibitatea esne agarraren bidez identifikatu zen. 15 bakteriotik 4 (16, 91, 200, 266) ez dira gai izan hazteko agian kultura-medio honen elikagaien kontzentrazio altuengatik. Nahiz eta gainontzekoetan (11 bakterio) hazkuntza gertatu ez dago kaseinasa aktibitatearik duenik 25. bakterioa izan ezik (**4. irudia**).



4. irudia: Bakterioen hazkuntza esne agarrean. 25. bakterioa, kaseinasa positiboa, 35. bakterioa, kaseinasa negatiboa.

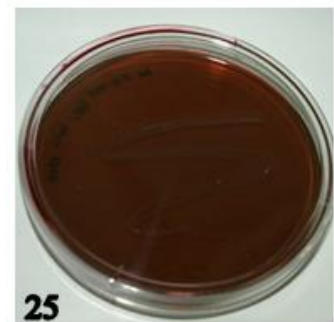
- **Laktosaren hartzidura**

MacConkey agarrean 15 bakterioetatik 5 (35, 200, 333, 366, 393) hazi ziren (**5. irudia**). Beraz 10 ez dira gai izan hazteko agian kultura-medio honen elikagaien kontzentrazio altuengatik, edo kristal bioleta eta behazungatzengatik (bakterio Gram positibo gehien eta Gram negatibo batzuen inhibitzaileak). Hazten direnen artean 4 ez ziren gai laktosa hartzitzeko (200, 333, 366, 393) eta laktosaren hartzitzaile bakarra topatu zen (35).



5. irudia: Bakterioen hazkuntza MacConkey agarrean. 35. bakterioa laktosa hartzitzailea da. 200, 333, 366 eta 393. bakterioak, berriz, ez.

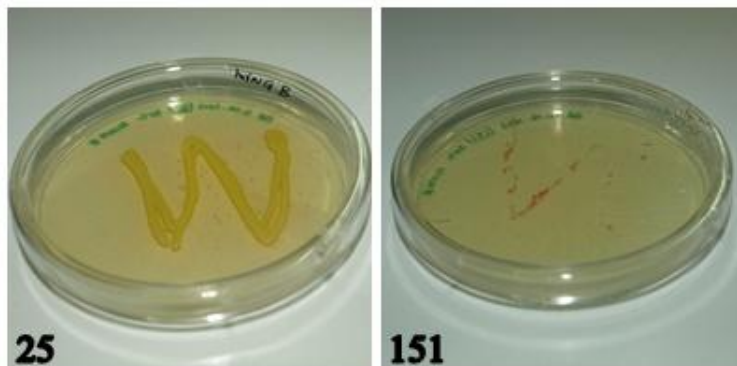
EMB agarrean 15 bakteriotik 1 (25) baino ez zen hazi. Beraz 14 ez dira gai izan hazteko agian kultura-medio honen elikagaien kontzentrazio altuengatik edo kultura-medio honen metileno urdinagatik (bakterio Gram positibo gehien eta Gram negatibo batzuen inhibitzailea). Hazi dena (25) laktosaren hartzitzaile negatiboa zen (**6. irudia**).



6. irudia: 25. bakterioaren hazkuntza EMB agarrean. Ez da laktosaren hartzitzailea.

- **Fluoreszentzia aktibitatea**

Fluoreszentzia duen pigmentuari dagokionez 15 bakteriotik 4 (200, 333, 393, 419) ez ziren gai izan King B kultura-medioan hazteko, agian kultura-medio honen elikagaien kontzentrazio altuengatik. Nahiz eta gainontzekoetan (11 bakterio) hazkuntza gertatu (**7. irudia**), ez dago fluoreszentzia-pigmentua duen bakteriorik.



7. irudia: 25 eta 151. bakterioen hazkuntza King B agarrean.

- **β -D-Galaktosidasa eta D-Glukuronidasa aktibitateak**

Chromocult agarrean 15 bakteriotik 7 (16, 103, 200, 266, 299, 393, 419) ez ziren gai izan hazteko kultura-medio honen elikagaien kontzentrazio altuengatik edo kultura-medio honen lauril sulfatoak Gram positiboen eta Gram negatibo batzuen hazkuntzaren inhibizioa eragiten duelako. Gainontzekoetan (25, 35, 91, 151, 152, 193, 333, 366) hazitako koloniek ez zuten kolore urdin edota gorriak aurkeztu, beraz esan daiteke ez dela β -D-Galaktosidasa ezta D-Glukuronidasa aktibitatearik behatu.

- **Antibiotikoen ekoizpena**

Antibiotikoen ekoizpena detektatzeko bakterioak antibiotiko agarrean ereindu ziren. Kasu batzuetan ez zen bakterioen hazkuntza lortu (152 eta 333), beraz ez zen antibiotikoen sentikortasun testa burutu. Nahiz eta gainontzekoetan (13 bakterio) hazkuntza gertatu ez dago antibiotikoa ekoizten duen bakteriorik.

Antibiotikoen detektziorako froga Zobell eta Sea Water agarrean ere burutu ziren prozedura berarekin. Zobell agarrean inkubatutako 8 bakterioak eta Sea Water agarrean ereindutako 7 bakterioak hazi ziren, baina ez dago antibiotikoa ekoizten duen bakteriorik. Kasu guztietan mikroorganismo adierazleek (*Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* eta *Bacillus subtilis*) ereinketa distantzia eta hazkuntza distantzi berdina izan dute.

Bakterioek ez dituzte antibiotikoak ekoiztu agian inkubazio denbora luzeagoa edo inkubazio-baldintzak desberdinak behar dituztelako, edota benetan erabilitako hiru bakterio-ereduren aurkako antibiotikoen ekoizleak ez direlako.

ONDORIOAK

- 1) Guk lehendabizi proposaturiko Sea Water agarraren erabilera interesgarria izan daiteke bakterio itsastarren isolamendurako.
- 2) Bai Zobell agarrean bai Sea Water agarrean *in situ* tenperaturan inkubatzekoan ekialdeko Kantauriar itsasoko kostaldeko bakterio guztien %0,22a baino ez da kulturatzen. Kulturagarritasun-portzentaje hau asko handi daiteke (%45ra) batez ere Zobell agarrean lagina 20 aminoazido

desberdin, pirubatoa, sukzinatoa, glukosa, NH₄ eta KH₂PO₄ duen nahasketa batekin aurretratu egiten bada.

- 3) Ekialdeko Kantauriar itsasoko bakterioen artean isolatu egin dira oso bakterio desberdinak morfologikoki (kokoak, baziloak eta kokobaziloak), horma zelularrari dagokiona (Gram positiboak eta negatiboak) edota ezaugarri fisiologiko desberdinetakoak.

BIBLIOGRAFIA

- Amman, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 1995, 59(1):143.
- Brown, A.E. (2007) *Benson's Microbiological Applications: Laboratory Manual in General Microbiology* (10th edition)
- Buchan, A., Hadden, M., Suzuki, M.T. (2009) Development and application of quantitative-PCR tools for subgroups of the *Roseobacter* Clade. *Appl Environ Microbiol.* 75(23): 7542–7547.
- Connon, S., Giovannoni, S. (2002) High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl Environ Microbiol.* Vol. 68, No. 8.
- Cottrell, M. T. and Kirchman, D. (2000) Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the Cytophaga-Flavobacter cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 1692–1697.
- Curtis, T.P. *et al.* (2002) Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 10494–10499
- Dykhuizen, D.E. (1998) Santa Rosalia revisited: why are there so many species of bacteria? *Antonie Van Leeuwenhoek* 73, 25–33
- Fenchel, T. (2005) Where are all the species? *Environ. Microbiol.* 7, 473–475
- Giovannoni *et al.* (1990) Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature*, 345:60-63.
- Giovannoni *et al.* (2005) Genome streamlining in a cosmopolitan oceanic bacterium. *Science* 309:1242-1245.
- Giovannoni, S. J., Stingl, U. (2007) The importance of culturing bacterioplankton in the ‘omics’ age. *Nature Rev. Microbiol.*, 5:820-826.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (2006) *Biología de los Microorganismos*. Brock (10^a edición).
- Magurran, A.E. and Henderson, P.A. (2003) Explaining the excess of rare species in natural species abundance distributions. *Nature* 422, 714–716
- Merck, E. (1990) *Manual de Medios de Cultivo Merck*.
- Morales-García, Y-E., Duque, E., Rodríguez-Andrade, O. (2010) Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. *BioTecnología*, Vol. 14 No. 2
- Pedrós-Alió, C. (2006) Marine microbial diversity: can it be determined?. *Opinion. TRENDS in Microbiology* Vol.14 No.6
- Porter, K.G., Feig, Y.S. (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25: 943-948.
- Sancho, J., Baldrís, R., Sánchez, M. (2002) *Handbook of Microbiology Cultive Media* (International Edition).

- Schmidt, T. M., Schaechter, M. (2009) *Topics in ecological and environmental microbiology*. Academic Press.