

Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado
Biologiako Gradua / Grado en Biología

Vibrio spp. detektatzeko CARD-FISH protokolo baten egokitzea

Egilea/Autor/a:
Irene Larrañaga Ayestaran

Zuzendaria/Director/a:
Maria Inés Arana Basabe

Zuzendarikidea/ Codirector/a:
Maite Orruño Beltran

AURKIBIDEA

LABURPENA/ABSTRACT	2-3
SARRERA	3-6
HELBURUA	6
MATERIALA ETA METODOAK.....	7-12
1. Erabilitako anduia	7-8
2. Zunda espezifikoen bilaketa eta karakterizazioa.....	8
3. Laginen prestaketa.....	8
4. CARD-FISH prozedura	9-12
4.1. Zelulak finkatzea eta iragaztea	9-10
4.2. Zelulak mintzera eranstea.....	10
4.3. Peroxidasa endogenoen desaktibazioa.....	10
4.4. Liozima bidezko iragazkortzea	10
4.5. Hibridazioa	10-11
4.6. Garbiketa.....	11
4.7. CARD erreakzioa (<i>Catalyzed Reporter Deposition</i>)	11
4.8. Mikroskopia behaketa.....	11-12
EMAITZAK	12-16
1. Zundaren hautaketa.....	12
2. Protokoloan egindako doikuntzak	12
3. Protokoloaren egiaztatzea <i>Vibrio</i> spp. detektatzeko	13-16
EZTABAIDA.....	16-18
ONDORIOAK.....	19
BIBLIOGRAFIA	20-23
ERANSKINAK	24-28

LABURPENA

Giza jarduerak eragindako klima-aldaketa dela eta, ozeanoetako temperatura igo egin da azken mendean, eta ondorioz, aldatu egin da mikroorganismo-populazioen aniztasuna eta banaketa. Esaterako, *Vibrio* generoko bakterioak ugartzen ari dira, mundu-mailako vibriosiaren intzidentzia-emendia kausatuz. Bakterio Gram negatibo hauentzat diseinaturiko hazkuntza-medioak ez dira oso eraginkorrak izaten detekzioari dagokionean; horregatik, mikroorganismoen kultiboan oinarritzen ez diren zenbaketa- eta detekzio-teknikak garatu dira, besteak beste, *in situ* fluoreszentzia hibridazioa (FISH) eta honen hobekuntza den *Catalyzed Reporter Deposition* (CARD)-FISH. Teknika hauetan, mikroorganismoak fluoreszentsiaz markatzen dira, itu-mikroorganismoen 16S rRNA-rekiko osagarria den zunda espezifiko baten bidez. Kasu honetan, GV 841 zunda erabili da, espezifikotasuna eta estaldura beste zunda batzuekin konparatu ostean. Zunda espezifikoa bilatzeaz gain, Pernthaler eta lankideen (2004) CARD-FISH protokoloa egokitu egin da *Vibrio* spp. detektatzeko; horretarako, lizozimaren kontzentrazioa igo da bakterioen horma iragazkorrago bihurtzeko, eta laginen berehalako mikroskopio-behaketa egin da. Emaitzek adierazi dute CARD-FISH, GV 841 zundarekin konbinatuta, baliozko metodoa dela *V. harveyi*-en detektziorako. Hala ere, metodoa aplikatu aurretik kontutan hartu behar da, alde batetik, metodoak zenbait muga dituela, eta bestetik, espezie ezberdinekin eta lagin naturalekin esperimendu-kontrolak egin behar direla.

ABSTRACT

Due to the climate change caused by human activity, ocean temperature has increased during the last century. Thus, the diversity and distribution of the microbe populations have changed. For example, bacteria of genus *Vibrio* are growing on number, thereby increasing the incidence of vibriosis worldwide. In terms of identification, the culture media designed for these gram-negative bacteria do not result very useful. Because of this, some culture-independent identification and detection techniques have been developed, such as the fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and *Catalyzed Reporter Deposition* (CARD)-FISH. In these techniques, microorganisms are fluorescently stained by specific probes, complementary to the 16S rRNA of the target cells. In this case, the GV 841 probe has been used, after comparing its specificity and coverage with other probes. Also, increasing the lysozyme concentration used to enhance the permeability of the bacteria cell wall and carrying out immediate microscopic observation, Pernthaler *et al.* (2004) CARD-FISH protocol has been adjusted for the detection of *Vibrio* spp. The results have shown that the combination of the CARD-FISH technique with the GV 841 probe is a valid method for the detection of *V. harveyi*. This method, however, has

some limitations to take into account before applying it and also, it is necessary to make experimental controls using different *Vibrio* species and environmental samples.

SARRERA

Gaur egun, mundu-mailako garrantzia duen arazoa da giza jardueren ondoriozko klima-aldaketa. Planetako tenperatura 0,6°C igo da, batez beste, azken 100 urteotan, eta aurrerantzean ere joera berbera aurreikusten da (Houghton *et al.*, 2001). Tenperatura igoera honek ozeanoetan izan duelarik eraginik nabarmenena, igo egin da hauen batez besteko tenperatura ere XX. mendearen bigarren erdialdetik hona (Levitus, 2000; Vezzulli *et al.*, 2012).

Oberbeckmann eta bere lankideek 2011. urtean adierazi zuten, tenperatura *Vibrio spp.* ingurune urtarretan agertzearekin zuzenki loturiko ingurumen-eragileetariko bat da. Mikrobio-populazioak tenperatura aldaketekiko oso sentikorak izanda, badirudi ozeanoetako tenperatura aldaketek eragina dutela hauen aniztasunean eta banaketan (Thompson *et al.*, 2004a). *Vibrio* generoak argi islatzen du esandakoa, igotzen ari baita bibrioen andui kopurua eta, horren eraginez, aurrez aurkitzen ez zen lekuetan agertzeri iritsi da (Thompson *et al.*, 2004a,b). Era berean, gora egin dute patogeno hauekin kutsaturiko uren kontsumoaren ondorioz sortutako gaixotasunek ere (Paz *et al.*, 2007; Vezzulli *et al.*, 2012,2013). Vezzulli eta bere lankideek erlazio positiboa ezarri zuten (2013. urtean) klima-aldaketak sorturiko tenperatura-igoeraren eta mundu-mailako bibrosiaren intzidentzia handiagotzearen artean; baita, bibrioek birulentziari loturiko ezaugarrien adierazpena igotzearen artean ere.

Bibrioak *Gammaproteobacteria* klaseko bakterio Gram negatiboak (-) dira, koma itxuradun bazilo mugikorak. Metabolismoari dagokionez, mesofilo kimioorganotrofoak dira eta aukerazko hartidura burutzen dute. Horrez gain, itsas agarrean (MA) hazi ohi dira, baita tiosulfato-zitrato behazun sakarosa-gatzezko (TCBS) medio hautagarrian ere; eta gehienak, oxidasa positiboak dira. Nagusiki halofiloak izanda, oso ugariak izaten dira ingurune urtarretan, hala nola, estuarioetan, kostako ur eta sedimentuetan, eta mundu osoko akuikultura inguruneetan (Barbieri *et al.*, 1999; Heidelberg *et al.*, 2002; Yumoto *et al.*, 1999).

Vibrionaceae familia oso anitza dela azaldu zuten Noguerola eta bere lankideek 2007. urtean. Egun, *Vibrio* generoko 100 espezie baino gehiago ezagutzen dira (Euzeby, 2017), 14 kladotan taldekatzen direnak (Romalde *et al.*, 2014) eta horietariko 12 patogenoak direnak (Oliver *et al.*, 2013).

Vibrio generoak duen patogenotasunagatik eta ingurune urtarrarekiko loturagatik, aukerako generoa da klima-aldaketak medio urtarreko mikroorganismo populazioengan izan dezakeen eragina aztertzeko (Martinez *et al.*, 2010). *Vibrio* spp. aurrez aurkitzen ez zen uretan aurkitzen dela jakinik, ezinbestekoa da patogeno hauen ugaritasunaren eta banaketaren inguruko ikerketetan sakontzea Europako itsas uretan.

Bestalde, ur naturalen sistemetan mikroorganismo-populazioen zenbaketa eta identifikazio lanak egiterako orduan, arazorik handiena izaten da plakako zenbaketen eta mikroskopia bidez eginiko zenbaketen artean egoten den ezberdintasun handia. 10^2 eta 10^3 orden bitarteko ezberdintasunak kontatu daitezke bi zenbaketa metodoen artean (Thompson *et al.*, 2004b). Gertaera hori plakako zenbaketaren anomalia handia bezala ezagutzen da (*The great plate count anomaly*). Horren arrazoi nagusia da oraindik ez dela lortu mikroorganismo gehienak (>99%) laborategian erein eta haztea (Pace, 1996; Barcina eta Arana, 2009).

Hasiera batean, uste zen zelula hilak edo ez-bideragarriak zirela mikroskopioan behatu eta hazkuntza-medioetan hazten ez ziren mikroorganismoak. Gerora baina, ezagutzera eraman zen zelula horiek metabolismo-jarduera zutela. Gauzak horrela, Xu eta bere lankideek 1982. urtean bakterio bideragarri ez-kultibagarri (VBNC: *Viable But Non Culturable*) bezala izendatu zituzten honako ezaugarriak dituzten bakterio-zelulak: metabolikoki aktiboak direnak eta berez haziko liratekeen hazkuntza medioetan hazteko gaitasuna galdu dutenak. Habitat edo baldintza ezberdinetan VBNC bereganatu dezaketen 85 bakterio-espezie baino gehiago ezagutzen dira; horien artean, *Vibrio* spp.-k VBNC egoera bereganatzen du neguan, eta modu honetan, detektagaitzak bihurtzen dira hazkuntza-medioetan ereitean (Oliver *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2014).

Aipatutakoa ikusirik, beharrezkoa da mikroorganismoen kultiboan oinarritzen ez diren zenbaketa-eta detekzio-teknikak garatzea eta hobetzea. Horren harira, erribotipaketan eta PCR-an oinarritzen diren teknikak garatu dira, besteak beste, anplifikazio-zatien luzera polimorfismoa (AFLP), *insitu* fluoreszentsia hibridazioa (FISH), anplifikaturiko erribosoma-DNA-ren erreskrikzio analisia

(ARDRA), zoriz anplifikaturiko DNA polimorfikoa (RAPD), genez kanpoko palindromo errepikakorrak (rep), errestrizkio zatien luzera polimorfismoa (RFLP) eta *multilocus* entzimen elektroforesia (MLEE) (Thompson *et al.*, 2004b).

Mikroorganismoen karakterizazioa baimentzen duten aurrerapen molekularren artean, *in situ* fluoreszentzia hibridazioak (FISH) eraginkortasun handia erakutsi du (Amann *et al.*, 2001), lehen aldiz DeLong eta bere lankideek 1989. urtean erabili zutenetik. Hibridazioan oinarritzen den teknika izaki, oligonukleotidozko zundak erabiltzen dira, 18-20 nukleotido bitartekoak direnak eta itu-mikroorganismoen 16S rRNA (RNA erribosomikoa) sekuentzia-zatiekiko osagarriak. 16S rRNA molekula prokariotoen 30S erribosomen azpi-unitate txikiaren osagaietariko bat da; oso sekuentzia kontserbatua eta espezifikoa da, eta kopia kopuru handia aurkitzen da zeluletan (Case *et al.*, 2006). Zunda hauek fluorokromoz markaturik egoten dira eta horri esker, espezifikoki detektatu, identifikatu eta kuantifikatu daitezke filogenia maila ezberdinetako mikroorganismoak, domeinuetatik hasi eta genero edota espezie jakinetara arte (Hoshino *et al.*, 2008).

Ingurune urtarreko bakterio gehienak, txikiak izaten dira, hazkuntza-abiadura motela izaten dute edo elikagai eskasian aurkitzen dira eta ondorioz, erribosoma kopuru murriztua erakusten dute (Cabral, 2010; DeLong *et al.*, 1999). Honen eraginez, zundarekin hibridatutako bakterioen fluoreszentzia-seinalea ahulegia izan daiteke, detekzio-muga baino baxuagoa izatera iritsi arte. Azken hau FISH-en arazo arrunta izanik, teknikaren sentikortasuna emendatzeko aurrerapenak garatuz joan dira, besteak beste: intentsitate handiagoko fluorokromoak (Alfreider *et al.*, 1996), kloranfenikol tratamendua gehitzea hazkuntza-faseko bakterioen rRNA kopurua emendatzeko (Ouverney *et al.*, 1997), eta *tyramine signal amplification* (TSA)-rekin konbinatzea fluoreszentzia-seinalea anplifikatzeko (Pernthaler *et al.*, 2004). Azken hau, ezaguna da *Catalyzed Reporter Deposition* (CARD)-FISH bezala ere, eta mikroorganismoen ekologian aplikazio zabala eskaintzen du (Wilhartitz *et al.*, 2007).

CARD-FISH teknikan erabiltzen diren zundak 5' muturrean horseradish peroxidase (HRP) molekula izaten dute lotuta. Horrela, bigarren inkubazio bat egingo da (CARD erreakzioa) fluoreszentziaz markaturiko tiraminekin, fluoreszentzia seinalearen anplifikazioa gertatu dadin. CARD erreakzioaren oinarria honakoa da: hidrogeno peroxidoaren aurrean, HRP-k tiraminekin erreakzionatu eta bitarteko erradikal bihurtzen ditu. Gero, tiramina-erradikal horiek zeluletako konposatu aromatikoekin, (tirosinarekin edo triptofanoarekin, kasu) erreakzionatzen dute eta jalki

egiten dira. Erreakzio hau HRP molekularen inguruan gertatzen da eta molekula bakoitzak tiramina ugari jalkitzea eragiten du, eta horrenbestez, fluoreszentzia seinalea 20 aldiz emendatzen da Hori dela eta, CARD-FISH funtsezkoa bilakatu da ia edozein ingurune baldintzetako mikroorganismoen antolamendu-espaziala aztertzeke orduan (Maixner *et al.*, 2006; Kubota, 2013).

Aipatutakoa aintzat hartuz, CARD-FISH metodo ezin hobea da *Vibrio* spp. bezalako espezie urtarren presentzia eta ugaritasunaren inguruko azterketak egiteko. Metodoak mikroorganismoak detektatzeko duen ahalmena zundak itu-mikroorganismoarekiko duen espezifikotasunaren menpekoea da nagusiki. Horren harira, *Vibrio* spp. CARD-FISH bidez detektatzeko hainbat zunda proposatu izan dira, baina oraindik ez dago estandarizaziorik. Horregatik, beharrezkoa da zundaren espezifikotasuna aztertzea prozesua aplikatu aurretik.

HELBURUA

Lan honetan helburutzat hartu da *Vibrio* spp. detektatzeko protokolo bat abiaraztea. Horretarako, aurrez diseinaturiko CARD-FISH protokolo bat *Vibrio* spp.-en ezaugarrietara egokitu da eta zunda espezifikoea bilatu da, metodoaren baliagarritasuna kontrol ezberdinen bidez egiaztatu ahal izateko.

MATERIALA ETA METODOAK

1. Erabilitako anduiak

Lan honetan zehar hainbat mikroorganismo erabili ziren, bildumako anduiak (CECT: Espainiako kultibo tipoen bilduma) zein andui basatiak: *Vibrio harveyi* CECT 525, *Vibrio harveyi* andui basatia, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* eta *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* eta *Micrococcus luteus*. 1. Taulan bildu dira mikroorganismo bakoitzaren ezaugarriak, hala nola, mikroorganismo mota, morfologia, erabilitako hazkuntza-medioak eta hazkuntza-tenperatura hobezina. *Vibrio harveyi* andui basatiaren kasuan, Armintzako itsasbazterreko uretatik isolatutako anduia erabili zen (Ogayar, 2015).

1. Taula. Lan honetan erabili diren mikroorganismoen ezaugarriak: anduien identifikazioa, morfologia, mikroorganismo mota, hazkuntza-medioa eta tenperatura hobezinak. CECT: Espainiako kultibo tipoen bilduma.

Anduia	Mikroorganismo mota	Morfologia	Hazkuntza-medioa	T (°C)
<i>Vibrio harveyi</i> CECT 525	Bakterio Gram (-)	Koma itxura	Itsas agarra/salda	28
<i>Vibrio harveyi</i> andui basatia	Bakterio Gram (-)	Koma itxura	Itsas agarra/salda	28
<i>Escherichia coli</i> CECT 416	Bakterio Gram (-)	Kokobaziloa	Müller-Hinton	37
<i>Serratia marcescens</i> CECT 159	Bakterio Gram (-)	Baziloa	Müller-Hinton	30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CECT 108	Bakterio Gram (-)	Baziloa	Müller-Hinton	37
<i>Citrobacter freundii</i> CECT 401	Bakterio Gram (-)	Baziloa	Müller-Hinton	37
<i>Bacillus subtilis</i> CECT 40	Bakterio Gram (+)	Baziloa	Müller-Hinton	30
<i>Staphylococcus aureus</i> CECT 240	Bakterio Gram (+)	Kokoa	Müller-Hinton	37
<i>Micrococcus luteus</i> CECT 245	Bakterio Gram (+)	Kokoa	Müller-Hinton	30

Anduiak epe laburrean kontserbatzeko hozkailuan (4°C) mantendu ziren, hazkuntza-medio solido egokietan hazi eta gero. Epe luzean mantentzeko, -80°C-tan gorde ziren Microbank™ (Pro-Lab Diagnostics) sistema erabiliz.

2. Zunda espezifikoen bilaketa eta karakterizazioa

Hibridazio-metodoen bidez mikroorganismo espezifikoak detektatzeko, lehenengo pausua zunda egokia bilatzea izaten da. Horrela, lan honetan *Vibrio* generoarentzat espezifikoa den oligonukleotidozko zunda bilatu zen. Bilaketa bibliografikoa egin ostean, pareko 2 zunda aurkitu ziren: GV 841 (Giuliano *et al.*, 1999) eta Vib-16S-1 (Zhang *et al.*, 2015) (2. Taula). Zunden espezifikotasuna eta estaldura SILVArefer104 16S RNA datu-baseko TestProbe atalean eskuratu ziren (Pruesse *et al.*, 2007) eta lortutako emaitzetan oinarrituz zunda egokiena aukeratu zen. Zunda Biomers-en (<http://biomers.net>, Ulm, Germany) eskatu zen 50 ng/μl kontzentrazioan, intereseko bolumeneko alikuotak egin eta -20°C-tangorde zen.

Bestalde, *E. coli* bidez abiarazi zen CARD-FISH protokoloa espezifikoa duen Colinsitu zunda erabilia (Regnault *et al.*, 2000).

2. Taula. *Virbio*-entzat eta *E. coli*-rentzat espezifikoki diseinatu diren zunden identifikazioa.

Zunda	Sekuentzia (5'→3')	Erreferentzia
GV 841	AGGCCACAACCTCCAAGTAG	Giuliano <i>et al.</i> , 1999
Vib-16S-1	GGTTACCAATAGGGGG	Zhang <i>et al.</i> , 2015
Colinsitu	GAGACTCAAGATTGCCAGTATCAG	Regnault <i>et al.</i> , 2000

3. Laginen prestaketa

Mikroorganismo-esekidura ezberdinak prestatu ziren CARD-FISH teknikarekin aztertzeko (3. Taula). Horretarako, fase geldikorreko mikroorganismoak erabili ziren, hazkuntza-medio likidoetan inokulatu eta gero. Mikroorganismo bakoitzeko 25 μl hartu eta iragazitako 25 ml itsasoko ur esteriletan gehitu ziren, 10⁶ zel/ml inguruko amaierako kontzentrazioa eskuratzeko.

3. Taula. CARD-FISH metodoa aztertzeko prestaturiko mikroorganismo-esekidurak eta bakoitzaren osaera, helburua eta erabilitako zunda..

Esekidura	Mikroorganismoak	Zunda	Helburua
A	<i>E. coli</i>	Colinsitu	Protokoloa abiarazi eta hobetu
B	<i>V. harveyi</i> CECT 525	GV 841 ∅	Protokoloa frogatu bibrioen detekziorako Kontrol negatiboa (peroxidasen desaktibazioa)
D	<i>V. harveyi</i> basatia	GV 841	Kontrol positiboa (ingurumenekoa)
E	<i>E. coli</i> <i>S. marcescens</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>C. freundii</i>	GV 841	Kontrol negatiboa (Bakterio Gram(-)en nahasketa)
F	<i>V. harveyi</i> CECT <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> <i>B. subtilis</i> <i>M. luteus</i>	GV 841	Protokoloa frogatu mikroorganismo mota ugariaren aurrean

4. CARD-FISH prozedura

CARD-FISH teknika Pernthaler eta bere lankideek 2004. urtean argitaratutako protokoloa jarraituz gauzatu zen. Hasteko, *E. coli*-rentzat espezifikoa den Colinsitu zunda erabili zen protokoloa abiarazteko. Eskuratutako emaitzetan oinarrituz eraldaketa bat egin zen protokoloan, eraginkorrago bihurtzeko. Behin *E. coli*-rekin emaitza faboragarriak lortuta, bibriozentzat espezifikoa den zunda erabiliz, protokoloaren erabilgarritasuna aztertzeari ekin zitzaion. Protokoloan zehar jarraitu beharreko pausuak 2. Eranskinean bildu dira.

4.1. Zelulak finkatzea eta iragaztea

Mikroorganismoak finkatzea beharrezkoa da, zelulek beren morfologia eta egituraketa espaziala mantendu dezaten CARD-FISH-en prozeduran zehar. Horretarako, mikroorganismo esekidurari 25 ml PFA%4(bol/bol)(1. Eranskina) gehitu eta 24 orduz 4°C-tan inkubatu ziren. Ondoren, lagina polikarbonatozko mintz zuri batetik iragazi zen (0,22 µm-ko poro-tamaina, 47 mm-ko diametroa, GTTP, Milipore, Eschborn, Germany), oinarrian zelulosa-nitratozko beste mintz bat kokatu zelarik (0,45 µm-ko poro-tamaina, 47 mm-ko diametroa, Whatman 7184-004), zelulen banaketa

homogeneoa bermatzeko. Jarraian, mintza giro tenperaturan lehortzen utzi zen, desionizatutako eta iragazitako MilliQ urarekin garbitu ondoren.

4.2. *Zelulak mintzera eranstea*

Prozesuan zehar zelulen galera ekiditeko, mintza 37°C-tan zegoen solidotze-puntu baxuko %0,1 agarosatan murgildu zen zelulak mintzera eransteko. Ondoren, beirazko oinarri baten gainean lehortzen utzi zen 20-30 minutuz 37°C-tan. %96-ko etanola gehituz, mintza oinarritik askatu eta blot paperaren gainean lehortu zen giro tenperaturan.

4.3. *Peroxidasa endogenoen desaktibazioa*

Mikroorganismoek beregain izan ditzaketen peroxidasakedo pseudoperoxidasa aktibitadedun proteinak desaktibatzea ezinbestekoa da positibo faltsuak baztertzeko. Izan ere, peroxidasek tiraminekin erreakzionatu dezakete, HRP-ren modu berean, eta horrela zelula horiek fluoreszentsia erakutsiko lukete, nahiz eta zundarekin hibridatu ez. Horretarako, mintza 50 ml HCl 0,01M-tan inkubatu zen 10 minutuz. Jarraian, 50 ml 1xPBS-tan murgildu zen 10 minutuz, eta lehortzen utzi zen giro tenperaturan.

4.4. *Lisozima bidezko iragazkortzea*

HRP molekula nahiko handia izateak zaildu egiten du zunda bakterioetara barneratzea, beraz, ezinbestekoa da bakterioen gainazaleko horma iragazkor bihurtzea HPR-zunda sartzea bideratzeko. Horretarako, mintza 2 ml lisozima-soluziotan (10g/l) (1. Eranskina) inkubatu zen 60 minutuz 37°C-tan. Lisozima entzima hidrolitikoa da, bakterioen peptidoglikanozko geruzako N-azetilmuramiko eta N-azetilglukosaminaren arteko β 1,4 loturak apurtzen dituena. Gero, petri kutxetan garbitu zen lehenengo MilliQ urarekin (bi aldiz) eta gero etanol absolutuarekin. Jatorrizko protokoloan 1 ml lisozima soluzio gehitzen dute, baina kasu honetan emaitza hobekak eskuratzen ziren 2 ml gehituta.

4.5. *Hibridazioa*

Zundak eta 16S rRNA-ak hibridatzea errazteko, mintza 4 mm zabal inguruko 16 zatitan moztu zen. Segidan, 1,5 ml-ko eppendorf hodi batean 900 μ l hibridazio-buffer (1. Eranskina) 3 μ l zundarekin (50 ng/ μ l) nahastu (300:1 proportzioan) eta zatitxoak bertara sartu ziren. Zunda bakoitzak bere

hibridazio tenperatura hobezina duenez, GV 841 zundarekin azterturiko laginak 49°C-tan inkubatu ziren eta Colinsitu-rekin azterturikoak, berriz, 52°C-tan. Inkubazioa 2 orduz luzatu zen. Peroxidasen endogenoen desaktibazioa frogatzeko kontrol negatibo bat erabili zen (B esekiduraren erreplika bat), kasu horretan pausu hau eta hurrengoa saltatu egin ziren.

4.6. *Garbiketa*

Hibridatu gabeko zunda-soberakinak kendu eta lotura ez-espezifikoak ekiditeko, mintzak garbiketa-bufferraren (1. Eranskina) 50 ml-tan sartu ziren 10 minutuz. Garbiketa-bufferraren tenperaturak zunda bakoitzaren hibridazio-efizientzia baldintzatzen duenez, GV 841-rentzat 42°C-tan prestatu zen eta Colinsitu-rentzat 37°C-tan. Jarraian, zunda egonkortzeko 1xPBS soluziotan garbitu ziren 10-15 minutuz giro tenperaturan.

4.7. *CARD erreakzioa (Catalyzed Reporter Deposition)*

Zundari loturiko HRP-peroxidasa aktibatzeke eta ALEXA488 fluoroforo markaturiko tiraminak jalkitzeko, 1,5 ml-ko eppendorf hodi batean 1 ml amplifikazio-buffer (1. Eranskina), 10 µl 100xH₂O₂ (%30 (bol/bol)) eta 4 µl berreraikitako tiramina fluoreszente (0,5mg/ml) (1. Eranskina) nahastu ziren. Berreraikitako tiraminak argiarekiko sentikorrek direnez, hodia ilunpean mantendu zen. Atzetik, mintzak bertara sartu eta 42°C-tan inkubatu ziren 15 minutuz. Gero, 1xPBS-tan 10 minutuz garbitzen eduki eta zatitxoak 20 ml MilliQ uretan eta 20 ml etanol absolututan murgildu ziren. Hori egirik, zatiak lehortzen utzi ziren blot paper gainean, beti ere ilunpea mantenduz. Pausu honen ostean mintz zatiak batzuk zuzenean behatu ziren mikroskopioan, izan eren, jatorrizko protokoloan -20°C-tan gorde daitezkeela jartzen duen arren, emaitza askoz hobekak eskuratu ziren.

4.8. *Mikroskopia behaketa*

Laginak mikroskopioan aztertu ahal izateko DAPI-Mix nahastea (1 µg/ml) prestatu zen (1. Eranskina); nahastearen osagaia da zelulen material genetikora lotzen den 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) tindatzaile fluoreszente orokorra. Laginak behatzeko Nikon Eclipse E-400epifluoreszentzia mikroskopioa erabili zen, honako iragazki-multzo hornituta dagoena: B-2A (450-490esztatizio-iragazkia (EX), 505 ispilu dikroikoa (DM) eta 520 igortze-iragazkia (BA)) argi urdina igortzen duena, eta UV-2A (EX 330-380 esztatizio-iragazkia, DM400 ispilu dikroikoa eta BA420 igortze-iragazkia) UV izpiak igortzen dituena. Mikroorganismo kopuru totalak UV-2A

iragazkiaren bidez behatu ziren, argi luzera horretan DAPI tindatzailea kitzikatu eta argi urdina askatzen da. Zundarekin hibridatu zuten bakterioak, berriz, B-2A argi-iragazkiarekin aztertu ziren, ALEXA-FLUOR 488 fluoroforodun zelulek fluoreszentzia berdea askatu zutelarik argi urdinarekin kitzikatu ostean.

EMAITZAK

1. Zundaren hautaketa

Bilatutako zunden ezaugarriak aztertu eta gero, *Vibrio* spp. detektatzeko egokiena zena aukeratu zen. 4. taulan laburtzen dira SILVA datu baseak emandako zunden hibridazioari buruzko informazioa. GV 841 zundak %100-ko espezifikotasuna erakutsi zuen *Vibrionaceae* familiarekiko eta %99,9-koa *Vibrio* generoarekiko. Estaldurari dagokionez, %90 eman zuen generoarekiko eta %100 familiarekiko. Horrez gain, zunda honek Aeromonadales ordenako MB19 familiarekiko %99,3-ko espezifikotasuna eta %100-ko estaldura du; baita *Catenococcus* generoarekiko ere, %99,3 eta %94,1, hurrenez hurren (4. Taula). Vib-16S-1 zundak, GV 841-k baino estaldura altuagoa izan arren, espezifikotasun baxuagoa dauka *Vibrio* generoarekiko. Gainera, V-16S-1ek erabateko estaldura erakusten du *Gayadomonas*, *Gallaecimonas* eta *CandidatusPhotodesmus* generoekiko, eta %94,2-koa *Avibacterium* generoarekiko. Hau guztia kontuan hartuta, GV 841 zunda aukeratu zen lana egiteko.

2. Protokoloan egindako doikuntzak

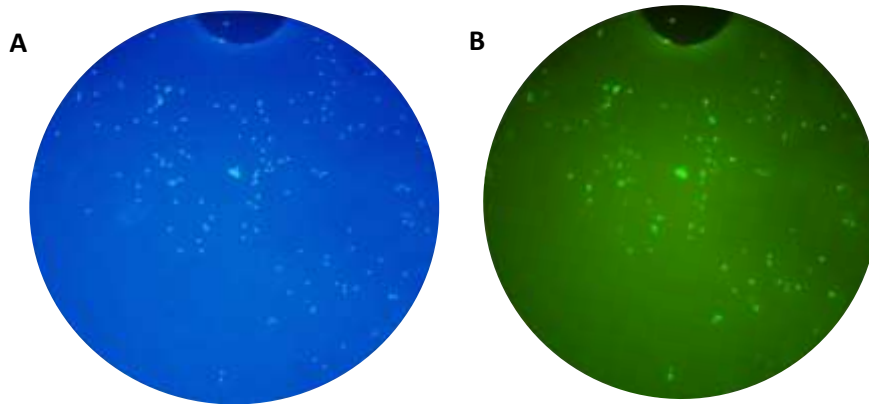
E. coli-rekin eginiko probetan egiaztatu zen, zelulak distiratsua ikusten zirela 1 ml lisozimaren ordean 2 ml gehituta. Horrez gain, fluoreszentzia gehiago igortzen zuten CARD erreakzioaren ondoren zuzenean behatu ziren zatietako bakterioek, -20°C-tan gorde eta gero azterturikoek baino.

4. Taula. Aztertutako GV 841 eta Vib-16S-1 zunden espezifikotasuna eta estaldura SILVA datu basean konprobatzean lorturiko emaitzak. Adierazten diren taxoi taldeak dira estaldura eta espezifikotasun balioak %99 eta %70 baino altuago eman dituztenak, eta guztiak Gammaproteobacteria klaseko anduiak dira.

Taxoia	Espezifikotasuna (%)	Estaldura (%)
GV 841 zunda		
<i>Aeromonadales; MB19</i>	99,3	100
<i>Vibrionales;Vibrionaceae; Catenococcus</i>	99,3	94,1
<i>Vibrionales;Vibrionaceae;Vibrio</i>	99,9	90
<i>Vibrionales</i>	100	79,1
<i>Vibrionales;Vibrionaceae</i>	100	79,1
Vib-16S-1 zunda		
<i>Alteromonadales; Alteromonadaceae;Gayadomonas</i>	99,3	100
<i>UnknownFamily;Gallaecimonas</i>	99,3	100
<i>Vibrionales;Vibrionaceae;CandidatusPhotodesmus</i>	99,3	100
<i>Pasteurellales;Pasteurellaceae;Avibacterium</i>	99,3	94,5
<i>Vibrionales;Vibrionaceae;Vibrio</i>	99,3	92,1
<i>Aeromonadales;Aeromonadaceae;Oceanisphaera</i>	99,3	91,2
<i>Alteromonadales;Alteromonadaceae;Catenovulum</i>	99,3	90,9
<i>Enterobacteriales;Enterobacteriaceae;CandidatusBenitsuchiphilus</i>	99,3	88,9
<i>Vibrionales</i>	99,9	77
<i>Vibrionales;Vibrionaceae</i>	99,9	77
<i>Enterobacteriales;Enterobacteriaceae;CandidatusRegiella</i>	99,3	73,3

3. Protokoloaren egiaztatzea *Vibrios* pp. detektatzeko

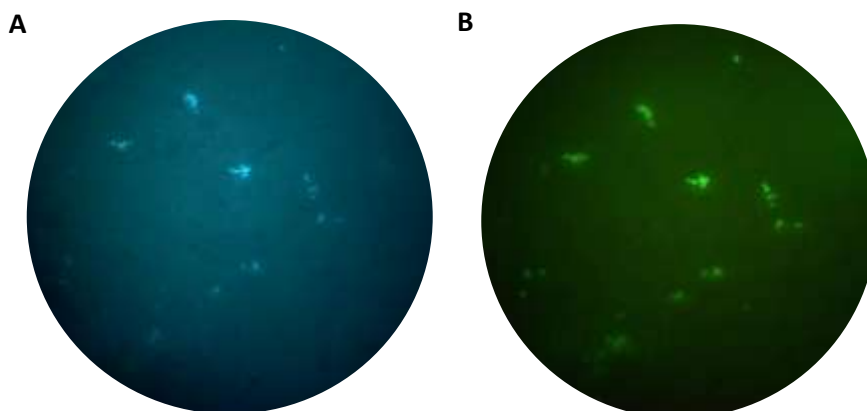
Hasteko, *Vibrio harveyi* CECT 525 esekidura erabili zen protokoloaren baliotasuna eta aukeratutako zundaren egokitasuna egiaztatzeke. Honako emaitzak eskuratu ziren: zundarekin hibridatutako bakterioek fluoreszentsia berdea igortzen zuten, HRP-ren aktibitatea eta tiraminen seinalearen anplifikazioa eraginkorra izan zela erakutsiz. Horrez gain, hibridazio portzentajea %100 izan zela ikusi zen zelula kopuru totalak behatzean, bat etorri baitziren kopuru eta kokapenean argi urdinarekin (zundarekin hibridatutako bakterioak) zein UV argiarekin (mikroorganismo totalak) behaturiko zelulak (1. Irudia).



1. Irudia. Epifluoreszentzia mikroskopioko irudiak (x1000 handipena) *V. harveyi* CECT 525 GV 841 zundarekin hibridatuta, eta DAPI-rekin eta ALEXA488-rekin tindatuta. A) UV-2A iragazkiarekin behatuta. B) B-2A iragazkiarekin behatuta.

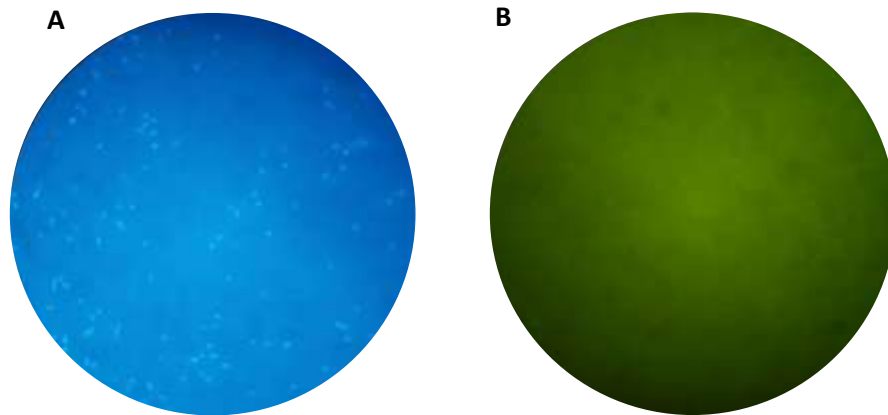
Aldi berean, esekidura berdina kontrol moduan erabili zen, peroxidasa endogenoen desaktibazioa eraginkorra zela ziurtatzeko. Kasu honetan, protokoloa zundarik gehitu gabe jarraitu zen; eta argi urdinarekin behatzean ez zen zelularik nabarmendu, bai ordea UV argiarekin kitzikatu ostean (emaitzak ez dira erakusten).

Bildumako *V. harveyi*-ekin gertatu bezala, 2. Irudiak erakusten duenez, andui basatiek ere zunda barneratu zuten eta zeluletan jalkitako tiraminak berdez ikusi ziren argi urdinarekin aztertzean. Horrez gain, gain, bat etorri ziren kopuru eta kokapenean argi urdinarekin zein UV argiarekin behaturiko bakterioak, zelula guztiek hibridatu zutela erakutsiz.



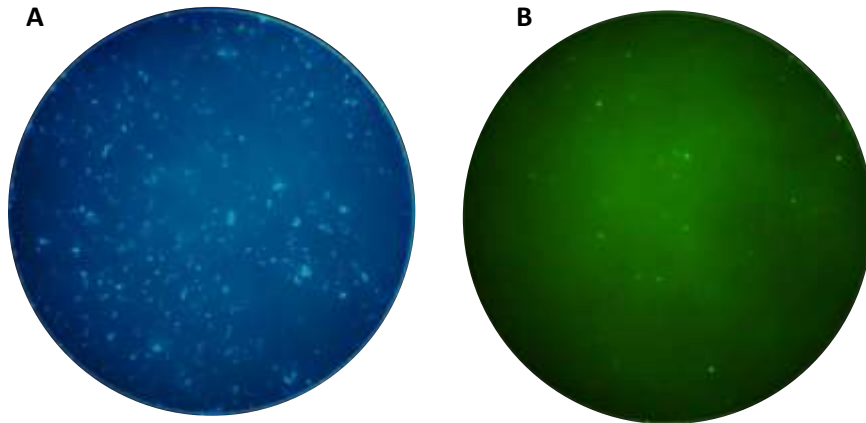
2. Irudia. Epifluoreszentzia mikroskopioko irudiak (x1000 handipena) *V. harveyi* andui basatia GV 841 zundarekin hibridatuta, eta DAPI-rekin eta ALEXA488-rekin tindatuta. A) UV-2A iragazkiarekin behatuta. B) B-2A iragazkiarekin behatuta.

Kontrol negatibotzat erabili zen bibriorik ez zuen bazilo Gram (-)-en nahastea (E esekidura). Mikroskopiaan aztertzean, ikusi zen esekidura honetako bakterioek ez zutela zundarekin hibridatu: UV argiarekin bereizten ziren DAPI-z tindaturiko baziloak, baina argi urdinarekin ez zen zelularik nabarmendu (3. Irudia).



3. Irudia. Epifluoreszentzia mikroskopioko irudiak (x1000 handipena) *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* eta *Citrobacter freundii* DAPI-rekin eta ALEXA488-rekin tindatuta. A) UV-2A iragazkiarekin behatuta. . B) B-2A iragazkiarekin behatuta.

Mikroorganismoen nahasteko zelula guztien azterketa egiterakoan (F esekidura), 4. Irudian ikusten denez, morfologia ezberdineko zelulak bereizi ziren DAPIz markatuta. Koko formadunak nagusitzen ziren bazilo formadun bakterio batzuen artean. Argi urdinera aldatzean, ordea, bazilo gutxi batzuk soilik ikusten ziren eta kokoak nagusitzen ziren lekuetan hutsuneak zeuden. Berdez ikusten diren baziloei erreparatuta, ikusten da esekidurako bazilo guztiek ez dutela zundarekin hibridatu. Hibridatu ez dutenak lagineko *E. coli*-ekin (aurrez frogatu da ez dutela hibridatzen) eta *Bacillus*-ekin bat etorriko lirateke, hauen ezaugarriak aintzat hartuta zailagoa baitute zunda barneratzea; eta, horrenbestez, fluoreszentzia askatzen dutenak *V. harveyi* CECT izango dira.



4. Irudia. Epifluoreszentzia mikroskopioko irudiak (x1000 handipena) *V. harveyi* CECT 525, *E. coli* 416, *S. aureus*, *S. cerevisiae*, *M. luteus* eta *B. subtilis* GV 841 zundarekin hibridatuta eta DAPI-rekin eta ALEXA488-rekin tindatuta. A) UV-2A iragazkiarekin behatuta. . B) B-2A iragazkiarekin behatuta.

EZTABAIDA

CARD-FISH esperimentuak egiteko *Vibrio* generoarekiko espezifikoa den GV 841 zunda erabili zen; aurrez, GV 841 eta Vib-16S-1 zunden espezifikotasuna eta estaldura SILVA datu-basean konprobatu zirela. Vib-16S-1 zundak, GV 841-k baino espezifikotasun baxuagoa erakustez gain (%92 eta %99,9), erabateko estaldura zuen *Gayadomonas*, *Gallaecimonas* eta *Candidatus Photodesmus* generoekiko. Estaldura balio oso altuak zituzten ere, *Avibacterium* eta *Oceanisphoera* generoek, beste batzuen artean.

Dena den, GV 841 zunda erabili baino lehen, kontuan hartu behar dira dituen mugak; izan ere, emaitzek adierazi zuten zundak ez duela hibridatzen *Vibrio* generoko espezie guztiekin. Oberbeckmann eta lankideek 2011. urtean ezagutzera eman zuten, *V. cholerae* eta *V. mimicus* dira aipaturiko zundak estaltzen ez dituen generoaren barneko espezie nagusiak. DNA-DNA hibridazio esperimentuek ezagutarazi dute elkarrekiko oso lotuta daudela aipaturiko bi espezie horiek, baina ez gainontzeko *Vibrio* espezieekiko (Farmer *et al.*, 2006). Horrela, *V. cholerae* eta *V. mimicus*, *Vibrio* generoarekiko taxoi ezberdintzat sailkatzea proposatu izan da taxonomia-eztabaidetan (Thompson *et al.*, 2004). Alabaina, *V. cholerae* eta *V. mimicus*-entzat espezifikoa den zunda diseinatu zuten, Vchomim1276 (5'-ACT TTG TGA GAT TCG CTC CAC CTC G-3'), eta arrakastatsua gertatu da hainbat saiakuntzatan (Schauer *et al.*, 2012). Beraz, ezagutzen diren

Vibrio espezie guztiak barne hartzen dituen ikerketaren bat egiterako orduan, komenigarria izango litzateke bi zundak (GV 841 eta Vchomim1276) uztartzea.

Horrez gain, GV 841 zundak beste muga bat du. SILVA-TestProbeko emaitzek erakutsi zuten, zundak erabateko bateragarritasuna dauka Aeromonadales ordenako MB19 familiarekiko, nahiz *Vibrionaceae* familiako *Catenococcus* generoarekiko. MB19 familiaren barruan sailkaturiko 7 anduek zebra-arrainaren hesteko mikrobiota osatzen dute (Roeselers *et al.*, 2011). Bestalde, *Catenococcus* generoaren barruan espezie bakarra deskribatu da, *C. thiocyclus*, zeina Ginea Berriko ingurune itsastar sulfuriko-hidrotermaletik isolatu zen, New Britain Island-eko Matupy Harbour-en zehazki esateko (Sorokin, 1992). Gutxi ikertu da mikroorganismo honen inguruan, baina bere morfologia dela eta, koko formakoa, mikroskopioan behatzean erraz bereiziko litzateke bidrioengandik. Gainera, hibridatu dezaketen mikroorganismoak bizi diren habitatari erreparatuz, zundaren muga hau ez zen horren esanguratsua izango ingurune itsastar planktoniko gehienetan.

Lan honen bidez agerian geratu da Pernthaler eta bere lankideek 2004. urtean argitaratu zuten protokoloak duen eraginkortasuna, *E. coli* zein *V. harveyi* CARD-FISH teknikaren bidez aztertu ahal izateko. Hala eta guztiz ere, protokoloa hobetu daiteke ikertzen den itu-mikroorganismoaren ezaugarrien arabera. Adibidez, frogatu da emaitza hobekia lortzen direla detekzio mailan, zelula-hormaren iragazkortasuna handitzen bada (Kubota, 2013). Kasu honetan, lisozimaren kontzentrazioa igota, bakterio espezifikoek igorri zuten fluoreszentsia distiratsuagoa eta nabarmenagoa zen. Era berean, zelulak hobeto nabarmentzen dira mikroskopioan CARD erreakzioa egin eta zuzenean behatzen badira, mintz zatiak -20°C-tan gorde eta gerora aztertuta baino. Horrez gain, erabilitako zundek itu-mikroorganismoekiko duten espezifikotasuna ere berretsi zen. Izan ere, *Vibrio* bakterioek fluoreszentsia nahikoa igorri zuten zundarekin hibridatutako zelulak antzemateko naiz gainontzeko mikroorganismoengandik bereizteko, kultibo puru zein mistoetan.

Behin protokoloak eta GV 418 zundak *V. harveyi* detektatzeko duten baliagarritasuna frogatuta, interesgarria izango litzateke *Vibrio* espezie desberdinekin frogatzen jarraitzea; zundak espezifikotasun berbera erakusten jarraitzen duen ikusteko eta fluoreszentsiaren intentsitate berdina askatzen den konprobatzeko. Are gehiago, eraginkortasun hori zenbakietara eraman daiteke, hasierako kontzentrazio jakineko esekidura prestatu eta CARD-FISH teknika aplikatu ostean, hibridatu duten zelulen zenbaketa eginez.

Bestalde, *V. harveyi* andui basatia eta bildumakoa mikroskopioan behatzean, ez zen desberdintasun nabarmenik hauteman biek igorritako fluoreszentsia-intentsitateen artean. Izan ere, bakterioen erribosoma kopurua hazkuntza medioko elikagai kopuruarekiko proportzionala da (Kaplan *et al.*, 1975; Kramer *et al.*, 2002), eta Hoshino eta lankideek 2008. urtean aipatu bezala, askatzen den fluoreszentsia bakterio-zeluletako erribosoma kopuruaren menpekkoa baita. Halaber, ingurumen laginetan ohikoa izaten da mantenugai eskasia eta ingurune-baldintza kaxkarretan hazitako mikroorganismoak aurkitzea. CARD-FISH egoera horretan dauden mikroorganismoak aztertzeko metodo paregabetzat hartu arren (Pernthaler *et al.*, 2002a), hau ziurtatzeko beharrezkoa izango litzateke ingurumen laginekin probatzea, horretarako, esperimentu-kontrolak burutuz.

Horrez gain, epifluoreszentsia mikroskopioak detekzio- eta kuantifikazio-muga altuak ditu ($10^6 \pm 10^1$ zel/ml) hazkuntza-medioekin konparatuz (Pernthaler *et al.*, 2002b). Beraz, gerta liteke ikertzen ari garen ingurunean itu-mikroorganismoaren dentsitatea baxuegia izatea, mikroskopio bidez detektatu ahal izateko. Iragazketa-bolumena emendatzea ez litzateke arazo honen irtenbide egokia izango, hondoko fluoreszentsia handitu daitekeelako eta uretako partikulek mintza buxatu dezaketelako. (Kirschner *et al.*, 2012). Horren aurrean, zelulen kontaketa automatikoa egin daiteke, esaterako fluxu-zitometriaren (Füchslin *et al.*, 2010) edo solido-fase zitometriaren bidez (Joux eta Lebaron, 2000). Teknologia hauetan iragazketa-bolumen txikiagoak erabili daitezke, honela hondopartikula fluoreszenteek sorturiko interferentzia arazoak murriztuz. Emaidza arrakastatsuak lortu dira solido-fase zitometria *V. cholerae*-ren ugaritasuna ikertzeko erabilia (Schauer *et al.*, 2015), baita fluxu-zitometria bakterioen kontzentrazioak neurtzeko erabilia ere (Travers *et al.*, 2017).

ONDORIOAK

Lan honi esker frogatu da, bai GV 841 zunda eta bai erabilitako CARD-FISH protokoloa aproposak direla *Vibrio harveyi* detektatzeko, eta gainontzeko mikroorganismoetatik bereizteko, lagin mistoekin aritzean. Beraz, bibrioen zenbaketak egiteko baliozko metodoa izango litzateke, adibidez, klima-aldaketak mikroorganismo hauen ugaritasunean izan duen eragina aztertzeko. Hala ere, erabilitako protokoloak eta zundak badituzte zenbait muga, lorturiko emaitzak interpretatzeko orduan kontutan hartu beharrekoak. Eraginik handieneko mugak dira, batez ere, GV 841 zundak *Vibrio* guztiak ez detektatzea eta detekzioa ahalbidetzeko itu-mikroorganismoen atari-dentsitate bat gainditu beharra. Honenbestez, CARD-FISH teknika detekzio-muga murriztea ahalbidetuko duten metodo berriekin konbinatzeak, bidea emango du fidagarritasun handiagoko detekzio eta zenbaketa lanak egiteko.

Hau guztia kontutan harturik, CARD-FISH teknika ur-lagin naturaletako *Vibrio* spp.-ak detektatzeko erabili baino lehen, beste frogapen batzuk egin beharko lirateke. Adibidez, komenigarria izango litzateke protokoloaren baliagarritasuna egiaztatzen jarraitzea *Vibrio* espezie desberdinekin, bildumakoekin nahiz basatiekin. Horrez gain, aurrera begira, ekarpen handiak egingo lituzke *Vibrio* spp.-entzat espezifikoa den zunda unibertsala diseinatzeak.

BIBLIOGRAFIA

- Alfreider, A., Pernthaler, J., Amann, R., Sattler, B., Glockner, F., Wille, A., & Psenner, R. (1996). Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake by in situ hybridization. *Applied Environmental Microbiology*, 62, pp.2138-2144.
- Amann, R., Fuchs, B. M., & Behrens, S. (2001). The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridisation. *Current Opinion in Biotechnology*, 12, pp.231-236.
- Barbieri, E., Falzano, L., Fiorentini, C., Pianetti, A., Baffone, W., Fabbri, A., Matarrese, P., Casiere, A., Katouli, M., Kuhn, I., Mollby, R., Bruscolini, F., & Donelli, G. (1999). Occurrence, diversity, and pathogenicity of halophilic *Vibrio* spp. and non-O1 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic coast. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:2748-2753.
- Barcina, I., & Arana, I. (2009). The viable but non-culturable phenotype: a crossroads in the life-cycle of non-differentiating bacteria?. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 8(3), pp.245-255.
- Cabral, J. (2010). Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(10), pp.3657-3703.
- Case, R., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W., & Kjelleberg, S. (2006). Use of 16S rRNA and rpoB Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1), pp.278-288.
- DeLong, E. F., Wickham G. S., & N. R. Pace. (1989). Phylogenetic strains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science*, 243, pp.1360-1363.
- DeLong, E., Taylor, L., Marsh, T., & Preston, C. (1999). Visualization and enumeration of marine planktonic archaea and bacteria by using polyribonucleotide probes and fluorescent in situ hybridization. *Applied Environmental Microbiology*, 65, pp.5554-5563.
- Euzéby, J. P. (2017). List of prokaryotic names with standing in nomenclature-Genus *Vibrio*. Eskuragarria hemen: <http://www.bacterio.net/vibrio.html>
- Farmer, J.J. 3rd, & Hickman-Brenner, F.W. 2006, The *Genera Vibrio* and *Photobacterium*, in *The Prokaryotes*. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H. & Stackebrandt, E. (eds.). Springer-Verlag, pp. 508-563.
- Gomez-Gil, B., Soto-Rodríguez, S., García-Gasca, A., Roque, A., Vázquez-Juarez, R., Thompson, FL., & Swings, J. (2004). Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology*, 150, pp.1769-1777.
- Heidelberg, J., Heidelberg, K., & Colwell, R. (2002). Seasonality of Chesapeake Bay Bacterioplankton Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), pp.5488-5497.
- Hoshino, T., Yilmaz, L. S., Noguera, D. R., Daims, H., & Wagner, M. (2008). Quantification of target molecules needed to detect microorganisms by fluorescence in situ hybridization (FISH) and catalyzed reporter deposition-FISH. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, pp.5068-5077.

- Houghton, J. T., Ding, Y. D. J. G., Griggs, D. J., Noguera, M., Van der Linden, P. J., Dai, X., & Johnson, C. A. (2001). Climate change 2001: the scientific basis. *The Press Syndicate of the University of Cambridge*.
- Kirschner, A., Rameder, A., Schrammel, B., Indra, A., Farnleitner, A., & Sommer, R. (2012). Development of a new CARD-FISH protocol for quantification of *Legionella pneumophila* and its application in two hospital cooling towers. *Journal of Applied Microbiology*, 112(6), pp.1244-1256.
- Kramer, J.G., & Singleton, F.L. (1992). Variations in rRNA content of marine *Vibrio* spp. during starvation-survival and recovery. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(1), pp.201-207.
- Kubota K. (2013). CARD-FISH for Environmental Microorganisms. Technical Advancement and Future Applications. *Microbes and Environments*, 28(1), pp.3-12.
- Levitus, S., Antonov, J., Boyer, T., & Stephens, C. (2000). Warming of the world ocean. *Science*; 287, pp.2225-2229.
- Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J.D., & Faucher, S. P. (2014). The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 5, pp.72-91.
- Maixner, F., Noguera, D. R., Anneser, B., Stoecker, K., Wegl, G., Wagner, M., & Daims, H. (2006). Nitrite concentration influences the population structure of Nitrospira-like bacteria. *Environmental Microbiology*, 8, pp.1487-1495.
- Martinez-Urtaza, J., Bowers, J. C., Trinanes, J., & DePaola, A. (2010). Climate anomalies and the increasing risk of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* illnesses. *Food Research International*, 43, pp.1780-1790.
- Molina de Araluze, K. (2015). Establecimiento de las bases para el diseño de un protocolo de cuantificación de *Vibrio* spp. en agua de mar mediante FISH. *Errebisio bibliografikoa. Master amaierako lana, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea*.
- Noguera, I., & Blanch, A.R. (2007). Identification of *Vibrio* spp. with set of dichotomous keys. *Journal of Applied Microbiology*, 150, pp.175-185.
- Oberbeckmann, S., Wichels, A., Wiltshire, K., & Gerdt, G. (2011). Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* in the German Bight over a seasonal cycle. *Antonie van Leeuwenhoek*, 100(2), pp.291-307.
- Ogayar, E. (2015). Comparación del efecto de la temperatura en la supervivencia de vibrios de colección y aislados del litoral vizcaíno. *Master amaierako lana, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea*.
- Oliver, J. (2005). The viable but non-culturable state in bacteria. *The Journal of Microbiology*, 43, pp.93-100.
- Oliver, J., Pruzzo, C., Vezzulli, L., & Kaper, J. (2013). *Vibrio* Species. In Doyle M, Buchanan R (ed), *Food Microbiology*. ASM Press, Washington, pp.401-439.

- Ouverney, C. C., & J. A. Fuhrman. (1997). Increase in fluorescence intensity of 16S rRNA in situ hybridization in natural samples treated with chloramphenicol. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, pp.2735-2740.
- Pace, N. (1996). New perspective on the natural microbial world: *Molecular microbial ecology*, *Asm News*, 62, pp.463-470.
- Paz, S., Bisharat, N., Paz, E., Kidar, O., & Cohen, D. (2007). Climate change and the emergence of *Vibrio vulnificus* disease in Israel. *Environmental Research*, 103(3), pp.390-396.
- Pernthaler, A., C. M. Preston, J. Pernthaler, E. F. DeLong, & R. Amann. (2002a). Comparison of fluorescently labeled oligonucleotide and polynucleotide probes for the detection of pelagic marine bacteria and archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, pp.661–667.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J., & Amann, R. (2002b). Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, pp.3094–3101.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J., & Amann, R. (2004). Sensitive multi-color fluorescence in situ hybridization for the identification of environmental microorganisms. *Molecular microbial ecology manual*, eds. G.A. Kowalchuk, F.J. Bruijin, I.M. Head, A.D.L. Akkermans & J.D. Elsas, 2nd edn, Springer, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp.711-725.
- Pernthaler, J., Pernthaler, A., & Amann, R. (2003). Automated enumeration of groups of marine picoplankton after fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:2631–2637.
- Pruesse E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B. M., Ludwig, W., Peplies, J., & Glockner, F. (2007). SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research*, 35(21), pp.7188-7196.
- Regnault, B., Martin-Delautre, S., Lejay-Collin, M., Lefèvre, M., & Grimont, P. (2000). Oligonucleotide probe for the visualization of *Escherichia coli*/ *Escherichia fergusonii* cells by in situ hybridization: specificity and potential applications. *Research in Microbiology*, 151(7), pp.521-533.
- Roeselers, G., Mittge, E., Stephens, W., Parichy, D., Cavanaugh, C., Guillemin, K., & Rawls, J. (2011). Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *The ISME Journal*, 5(10), pp.1595-1608.
- Romalde, J.L, Diéguez, A. L., Lasa, A., & Balboa, S. (2014). New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: a review. *Frontiers in Microbiology*, 4, pp.131-141.
- Schauer, S., Jakwerth, S., Bliem, R., Baudart, J., Lebaron, P., Huhulescu, S., Kundi, M., Herzig, A., Farnleitner, A., Sommer, R., & Kirschner, A. (2015). Dynamics of *Vibrio cholerae* abundance in Austrian saline lakes, assessed with quantitative solid-phase cytometry. *Environmental Microbiology*, 17(11), pp.4366-4378.
- Sorokin, D. (1992). *Catenococcus thiocyclus* gen. nov. sp. nov.- a new facultatively anaerobic bacterium from a near-shore sulphidic hydrothermal area. *Journal of General Microbiology*, 138(11), pp.2287-2292.

- Thompson, F., Iida, T., & Swings, J. (2004b). Biodiversity of Vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3), pp.403-431.
- Thompson, J., Randa, M., Marcelino, L., Tomita-Mitchell, A., Lim, E., & Polz, M. (2004a). Diversity and Dynamics of a North Atlantic Coastal *Vibrio* Community. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), pp.4103-4110.
- Travers, M., Tourbiez, D., Parizadeh, L., Haffner, P., Kozic-Djellouli, A., Aboubaker, M., Koken, M., Dégremont, L., & Lupo, C. (2017). Several strains, one disease: experimental investigation of *Vibrio aestuarianus* infection parameters in the Pacific oyster. *Crassostreagigas. Veterinary Research*, 48(1).
- Vezzulli, L., Brettar, I., Pezzati, E., Reid, P., Colwell, R., Höfle, M., & Pruzzo, C. (2012). Long-term effects of ocean warming on the prokaryotic community: evidence from the Vibrios. *The ISME Journal*, 6(1), pp.21-30.
- Vezzulli, L., Colwell, R., & Pruzzo, C. (2013). Ocean Warming and Spread of Pathogenic Vibrios in the Aquatic Environment. *Microbial Ecology*, 65(4), pp.817-825.
- Wilhartitz, I., Mach, R., Teira, E., Reinthaler, T., Herndl, G., & Farnleitner, A. (2007). Prokaryotic community analysis with CARD-FISH in comparison with FISH in ultra-oligotrophic ground- and drinking water. *Journal of Applied Microbiology*, 103(4), pp.871-881.
- Xu, H., Roberts, N., Singleton, F., Attwell, R., Grimes, D., & Colwell, R. (1982). Survival and viability of non-culturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbiological Ecology*, 8, pp.313-323.
- Yumoto, I., Iwata, H., Sawabe, T., Ueno, K., Ichise, N., Matsuyama, H., Okuyama, H., & Kawasaki, K. (1999). Characterization of a facultatively psychrophilic bacterium, *Vibrio rumoiensis* sp. nov., that exhibits high catalase activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, pp.67-72.
- Zhang, X., Li, K., Wu, S., Shuai, J., & Fang, W. (2015). Peptide nucleic acid fluorescence in-situ hybridization for identification of *Vibrio* spp. in aquatic products and environments. *International Journal of Food Microbiology*, 206, pp.39-44.

ERANSKINAK

1. Eranskina. Prestatu beharreko Soluzioak/Nahasteak

- **PFA%4**

100 ml prestatzeko:

- 60 ml MilliQ 60°C
- 4 g PFA
- 33 ml 3xPBS
- pH=7,2
- MilliQ 100 ml arte gehitu eta iragazi

- **Lisozima-soluzioa**

20 ml prestatzeko:

- 2 ml EDTA 0,5 M
- 2 ml TRIS/HCl 1M
- 16 ml MilliQ
- 200 mg lisozima gehitu

- **Hibridazio-bufferra**

50 ml prestatzeko:

- 3,6 mL NaCl 5M (29.22 g NaCl/100 ml)
- 400 µl Tris/HCL 1 M pH=8 (14.18 g TRIS + 100 mL HCl)
- 20 µl SDS %20 (p/bol)
- X ml MilliQ(1E. Taula) nahastu guztiz disolbatu arte.
- 2 g sulfato dextrano
- X ml Formamida (1E. Taula)
- 2 ml BlockingReagent %10 (100ml Azido maleiko-buffer (1,16 g azido maleiko, 876,6 mg NaCl, 100 ml MilliQ, pH=7,5), 10 g BlockingReagent)).

E1. Taula. Zunda bakoitzaren hibridazio tenperatura hobezina, hibridazio-bufferrera gehitu beharreko formamida kontzentrazioa (% FA, (bol/bol)) eta hori prestatzeko beharreko formamida eta MilliQ bolumenak. Formamida % horrek baldintzatuko du hibridazio-efizientzia tenperatura hobezin horretan.

ZUNDA	Hibridazio T (°C)	% Formamida (FA)	Formamida ml	MilliQ ml
GV 841	49	30	6	8
Colinsitu	52	22	5	9

- **Garbiketa-bufferra**

50 ml prestatzeko

- 0,5 ml EDTA, 1 ml TRIS/HCl 1 M
- X ml NaCl 5M (2E. Taula)
- 25 µl SDS%20
- Gehitu MilliQ 50 ml arte

E2. Taula. Zunda bakoitzaren garbiketa tenperatura hobezina, garbiketa-bufferrera gehitu beharreko formamida kontzentrazioa (% FA, (bol/bol)) eta horren arabera 5M NaCl bolomena. 5M NaCl kopuruak baldintzatuko du hibridazio-efizientzia tenperatura hobezin horretan.

ZUNDA	Garbiketa T (°C)	% Formamida (FA)	5M NaCl bol. (µl)
GV 841	46	30	640
Colinsitu	37	22	1205

- **Anplifikazio-bufferra**

50ml prestatzeko:

- 2 ml 20xPBS, 16 ml NaCl 5M
- 400 µl BlockingReagent %10
- 31,6 ml MilliQ
- 4 g Dextran-Sulfato gehitu eta 40-60°C berotu disolbatu arte
- 4°C-tan gorde daiteke aste batzuetan

- **Tiraminak berreraikitzea**

- Stock Tindagai aktiboa (ALEXA488)
 - o 1 mg succinimidyl ester eta 100 µl dimetilformamida nahastu
 - o Stock tiramina-HCl

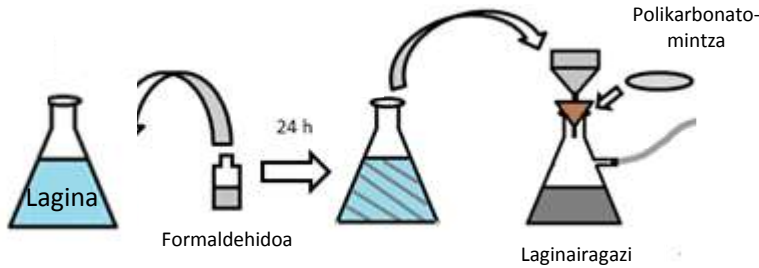
- 10 µl trietilamina, 1 ml dimetilformamida eta 10 mg tiramina HCl nahastu
- ERREAKZIOA
 - 100 µl Stock aktibo
 - 25,2 µl tiramina-HCl
 - 6-12 orduz inkubatu, giro tenperaturan eta ilunpetan
 - Soluzioa etanol absolutuarekin diluitu, 1 mg/ml-ko amaierako kontzentrazioa eskuratzeko. (1000 µl - 125,5 µl = 874,8 µl etanol absolutu)
 - 20 µl-tako alikuotak egin eppendorf hodietan eta aluminiozko paperez estali
 - -80°C-tan gorde
 - Hodiak ireki eta goiko partea parafilmez estali. Orratz batekin zulatu liofilizatu dadin
 - Liofilizatu eta giro tenperaturan edo lehorgailuan gorde
- ERABILERA:
- Tiraminak 20 µl dimetilformidarekin (20 mg IPBA/ml dimetil-formamida) berreraikitzen dira

- **DAPI-Mix**

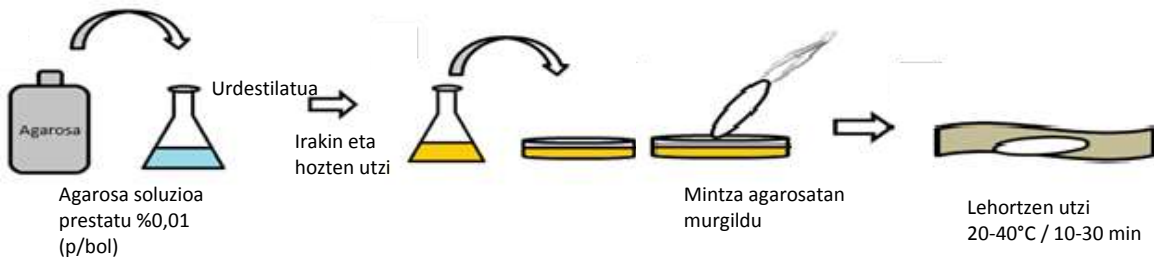
5,5 ml Citifluor, 1 ml DAPI dun Vectashield (1,5 µg/ml) eta 500 µl DAPI (11 µg/ml) nahastu eta ilunpetan mantendu.

2. Eranskina. Protokoloan jarraitu beharreko pausuen eskema.

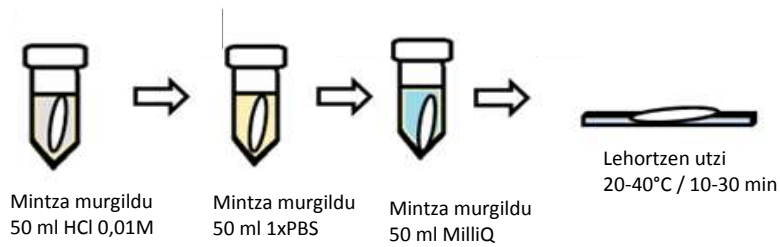
1. Zelulak finkatzea eta iragaztea



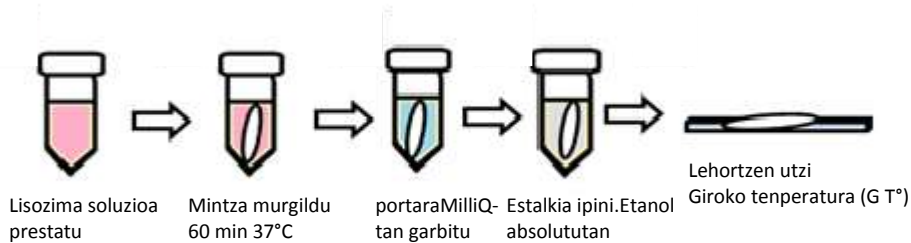
2. Zelulak mintzera eranstea



3. Peroxidasa endogenoen desaktibazioa



4. Liozima bidezko iragazkortzea



E1. Irdia. CARD-FISH protokoloan jarraitu beharreko pausuen irudikapena, eskema moduan adierazita. Molina de Araluze, K. (2015)-tik hartua eta moldatua.

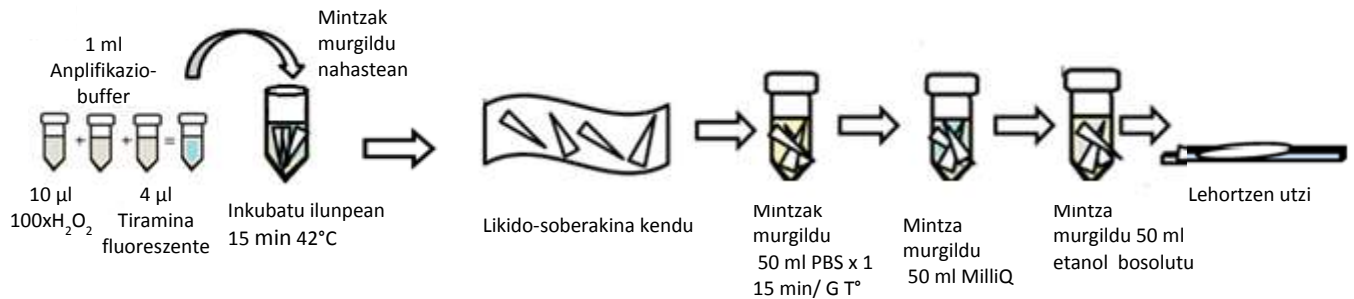
5. Hibridazioa



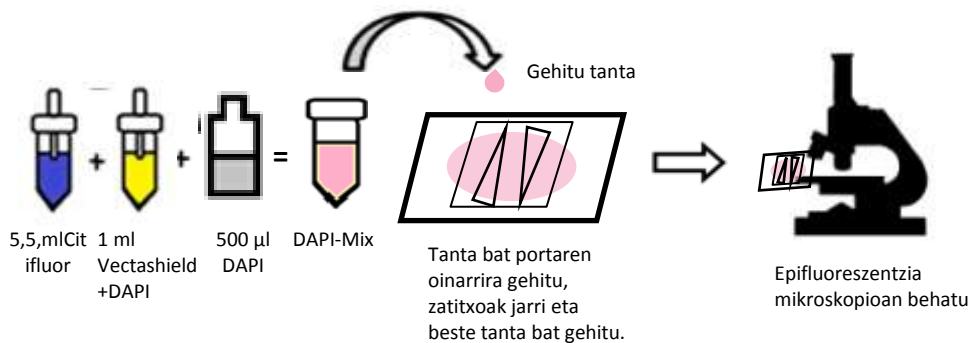
6. Garbiketa



7.- CARD erreakzioa (*Catalyzed Reporter Deposition*)



8. Mikroskopia behaketa



E1. Irudia.(JARRAIPENA) CARD-FISH protokoloan jarraitu beharreko pausuen irudikapena, eskema moduan adierazita. Molina de Araluze, K. (2015)-tik hartua eta moldatua.